FLAVIA MAZIERO ANDREGHETTO

**Estudo funcional de microRNAs associados ao carcinoma epidermoide em
cultura de células orais**

São Paulo

2011

FLAVIA MAZIERO ANDREGHETTO

**Estudo funcional de microRNAs associados ao carcinoma epidermoide em
cultura de células orais**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Dra Patrícia Severino

São Paulo

2011

Andreghetto FM. Estudo funcional de microRNAs associados ao carcinoma epidermoide em cultura de células orais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha mãe, pessoa que tanto amo, por ter acreditado que eu pudesse seguir os seus passos e viver o seu sonho. Você é minha maior inspiração.

Ao meu pai e meu irmão amados, que sempre me incentivaram e apoiaram minhas decisões.

Ao meu noivo, Bruno, pelo companheirismo, cumplicidade, apoio e amor, que foram essenciais nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a sua concretização.

À minha orientadora Dra Patricia Severino, agradeço pela oportunidade de fazer parte do seu grupo e por acreditar que eu pudesse desenvolver este projeto. Agradeço ainda a atenção, dedicação, paciência e incentivo, que foram com certeza, fundamentais para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, agradeço pela receptividade no Programa de Patologia Bucal e por toda colaboração dispendida.

À Dra Fátima Klingbeil, que com tanto carinho cultivou os queratinócitos e compartilhou seus conhecimentos para que esse projeto pudesse acontecer, agradeço a atenção e colaboração.

À Dra. Luciana Marti, agradeço pela atenção e principalmente pela realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À Prof. Dra. Mônica Mathor, agradeço por disponibilizar a cultura primária de queratinócitos e por compartilhar sua experiência com o nosso grupo.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, agradeço por conceder as linhagens celulares de CECP.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, agradeço pela disponibilidade da estrutura física para a realização deste trabalho bem como pelo suporte financeiro concedido no início deste trabalho.

Às queridas amigas Ana Carolina Moulatlet e Renata Soares, pessoas muito especiais pela amizade, companheirismo e convívio dentro e fora do laboratório. Vocês são conquistas que levarei para sempre comigo.

À todos os colegas e amigos do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, em especial Alex, Andrea, Anna Coló, Carla, Eliane, Fernanda, Jaila, Janaína, Lis, Luis, Natália, Marta, Pedro e Vanessa, agradeço pelas conversas, discussões bem fundamentadas e, sobretudo, por me fazerem rir nos momentos mais difíceis.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal, Néia e Zilda, agradeço por sempre estarem a disposição quando preciso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pelo suporte financeiro concedido para que eu pudesse me dedicar de forma integral ao mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço o auxílio financeiro através do projeto de pesquisa 2009/04166-5.

À minha família, agradeço pelos ensinamentos e carinho. Amo vocês!

À todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste mestrado.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer".

Amyr Klink

Andreghetto FM. Estudo funcional de microRNAs associados ao carcinoma epidermoide em cultura de células orais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

RESUMO

Estudos funcionais *in vitro* são essenciais para a compreensão do papel de miRNAs, pequenas moléculas de RNA que desempenham papel importante na regulação gênica, no câncer. Neste estudo analisamos a viabilidade de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), queratinócitos orais provenientes de culturas primárias e queratinócitos imortalizados, como modelos para estudos funcionais de miRNAs previamente identificados como desregulados nesse tipo de carcinoma: miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a. Com este fim avaliamos inicialmente a expressão dos quatro miRNAs em todos os tipos celulares propostos através de reações em cadeia da polimerase em tempo real específicas. As linhagens celulares de carcinoma epidermoide de boca foram previamente caracterizadas quanto ao seu perfil de sequências de DNA do tipo STR (do inglês *Short Tandem Repeats* ou repetições curtas em sequência) com o objetivo de confirmar a identidade da linhagem. Foram realizados ensaios para a super-expressão e inibição da expressão destas quatro moléculas na linhagem SCC25 e em queratinócitos orais derivados de cultura primária e, uma vez constatado o sucesso da transfecção, avaliamos, para cada caso, a expressão de alvos (mRNAs) validados na literatura. O impacto destas intervenções em proliferação celular, um importante processo desregulado em câncer, também foi avaliado. Os resultados apontam diferenças significativas na expressão dos miRNAs entre linhagens celulares passíveis de serem utilizadas como modelos para estudos

funcionais em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Ressaltam-se diferenças entre linhagens de carcinoma de língua e de faringe, bem como diferenças expressivas entre a linhagem de queratinócitos orais imortalizados e queratinócitos orais normais provenientes de culturas primárias. Conclui-se que cada modelo celular possui características particulares que os tornam mais ou menos adequados para um determinado estudo. A inibição da expressão de genes alvo em função da super-expressão do miRNA regulador foi observada apenas em parte das situações avaliadas. Este resultado decorre do fato que um alvo é regulado por diferentes miRNAs, bem como por diversos outros fatores genéticos e/ou epigenéticos, que podem variar de acordo com modelo estudado. Este resultado ressalta o fato de que seleção cuidadosa das linhagens é fundamental para conclusões precisas em estudos funcionais. A super- expressão de miRNA-10b e miRNA-196a afetou significativamente a progressão do ciclo celular tanto em SCC25 quanto em queratinócitos orais em cultivo, sugerindo um possível papel em CECP relacionado ao controle da proliferação celular.

Palavras-chave: microRNA, carcinoma epidermoide oral, linhagens celulares, queratinócitos, expressão gênica.

Andreghetto FM. Functional studies of microRNAs associated with oral squamous carcinoma in cell culture [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

ABSTRACT

Functional *in vitro* studies are fundamental for the comprehension of the role of microRNAs, small noncoding RNA molecules that function as posttranscriptional regulators, in cancer. The aim of this study was to determine the applicability of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human oral keratinocytes as models for functional studies of microRNAs previously identified as deregulated in squamous cell carcinomas of the head and neck: miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a. The expression level of the four microRNAs was assessed in cell lines and in primary cultures of oral keratinocytes using specific real-time polymerase chain reactions. The identity of oral squamous cell carcinoma cell lines was confirmed by means of STR (Short Tandem Repeats) profiling. We performed gain-of-function and loss-of-function experiments in a HNSCC cell line, SCC25, as well as in normal human keratocytes. After successful transfection, we evaluated the expression of selected target genes. Significant differences in microRNA gene expression were observed between squamous cell carcinoma cell lines, particularly between cells lines from distinct sub-sites, and between primary culture of human keratinocytes and the immortalized keratinocyte cell line. Thus, each cell model possesses a characteristic phenotype; while one may be useful for a particular study, it may be inappropriate for another. The down-regulation of selected target genes was not observed after the over-expression of all miRNAs studied, an expected result

since gene targets might be regulated by more than one microRNA, as well as by genetic and epigenetic mechanisms which are not common among all cell types. There is, therefore, an imperative for cautious selection of suitable cell lines for functional studies in cancer. Finally, the over-expression of miR-10b and miR-196a clearly interfered with cell cycle progression, suggesting a possible role in cell proliferation control for these molecules in HNSCC.

Keywords: microRNA, oral squamous cell carcinoma, cell lines, keratinocytes, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Esquema da transfecção reversa. As células encontram-se em suspensão no momento do experimento, permitindo maior exposição ao complexo de transfecção (agente de transfecção e ácido nucléico). Esse método reduz o tempo de experimento e contribui para a eficiência da transfecção. Fonte: Modificado de Life Technologies™ (www.lifetechnologies.com).....33
- Figura 5.1 - STRs utilizados para caracterização de linhagens celulares. (A) Padrão de STRs esperados para a linhagem SCC4 (B) Representação dos loci de STRs THO1 e D13S317 identificados em SCC4.. 43
- Figura 5.2 - STRs utilizados para caracterização de linhagens celulares. (A) Padrão de STRs esperados para a linhagem SCC9 (B) Representação dos loci de STRs THO1 e D13S317 identificados em SCC9... 44
- Figura 5.3 - STRs utilizados para caracterização de linhagens celulares. (A) Padrão de STRs esperados para a linhagem SCC25 (B) Representação dos loci de STRs THO1 e D13S317 identificados em SCC25..... 44
- Figura 5.4 - Avaliação da integridade do RNA extraído de células (A) FL, BHKFL, BHKHD, BHK3, SCC4, SCC25, SCC9 (B) HaCaT e (C) FaDu. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1,5%. O padrão de tamanho molecular utilizado apresenta o tamanho de fragmentos de DNA dupla fita em pares de bases. FL: *feeder-layer* (camada de sustentação); BHKFL: queratinócitos cultivados sobre camada de sustentação; BHKHD: queratinócitos em confluência; BHK3: queratinócitos cultivados em alta densidade..... 45
- Figura 5.5 - Gráfico de dispersão representando a média do *fold-change* entre a expressão de miRNAs em queratinócitos confluentes (BHK3) e subconfluentes (BHKFL). O eixo vertical mostra a expressão normalizada de BHKFL e o eixo horizontal mostra o valor correspondente em BHK3. O intervalo representado no gráfico corresponde ao *fold-change* de 2.0 entre os níveis de expressão dos dois grupos comparados. A normalização foi realizada com o gene de referência *RNU48*..... 46
- Figura 5.6 - *Fold-change* entre a expressão de miRNAs em células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (SCC4, SCC9, SCC25, FaDu), HaCaT e queratinócitos orais normais (BHK3). Os dados apresentados são a media do log2 *fold-change* entre a expressão em células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e queratinócitos. SCC4, SCC9, SCC25: linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de língua; FaDu: linhagem celular derivada de lesão primária de carcinoma epidermoide hipofaringe; HaCaT: linhagem de célula epidérmica transformada espontaneamente; BHK3:

queratinócitos em confluência. A normalização foi realizada com o gene de referência <i>RNU48</i>	48
Figura 5.7 - Avaliação do nível de expressão de miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a em linhagem SCC25 após ensaio de super-expressão . Os dados apresentados são a média do log2 <i>fold-change</i> entre a expressão do miRNA em células SCC25 transfectadas com moléculas precursoras (PreMir) e transfectadas com o controle negativo de transfecção (Oligo-). Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. *As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas ($p < 0.001$, <i>Student's t test</i>).	50
Figura 5.8 - Avaliação do nível de expressão de miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a em queratinócitos após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do log10 <i>fold-change</i> entre a expressão do miRNA em células transfectadas com moléculas precursoras (PreMir) e transfectadas com o controle negativo da transfecção (Oligo-). Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. *As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas ($p < 0.001$, <i>Student's t test</i>).	51
Figura 5.9 - Avaliação da contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA extraído da linhagem SCC25 e queratinócitos após ensaio de super-expressão. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1.5%. O marcador de peso molecular utilizado foi 100pb DNA Ladder (Invitrogen). PremiR7: células transfectadas com moléculas precursoras do miRNA-7; Pre negativo: células transfectadas com controle negativo; Controle: células cultivadas sem a presença de precursores	52
Figura 5.10 - Avaliação das curvas de amplificação (A) e dissociação (B) para os primers <i>KLF4</i> (vermelho), <i>HDCA4</i> (amarelo) e <i>EGFR</i> (verde) na linhagem SCC25. Diluição da amostra: 1:2, concentração final dos primers: 200nM.	56
Figura 5.11 - Avaliação da expressão dos genes (A) <i>MET</i> , <i>FOXP1</i> , <i>HDAC4</i> , <i>PTK9</i> (B) <i>EGFR</i> (C) <i>KLF4</i> , <i>HOXD10</i> e (D) <i>ANXA1</i> , alvos preditos do miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a, respectivamente, em linhagem SCC25 após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do <i>fold-change</i> entre a expressão dos genes em células transfectadas com moléculas precursoras (PreMiR) e transfectadas com o controle negativo da transfecção (Oligo-). Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas ($*p < 0.05$, <i>Student's t test</i>)..	57

- Figura 5.12 - Avaliação da expressão dos genes (A) *MET*, *FOXP1*, *HDAC4*, *PTK9* (B) *EGFR* (C) *KLF4*, *HOXD10* e (D) *ANXA1*, alvos preditos do miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a, respectivamente, em queratinócitos orais após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do *fold-change* entre a expressão dos genes em queratinócitos transfectados com moléculas precursoras (PreMiR) e transfectadas com o controle negativo da transfecção. Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas (* $p < 0.05$, *Student's t test*). 58
- Figura 5.13 - Representação de um campo visual do microscópio para avaliação da proliferação celular por imunofluorescência (detecção de Ki67) em SCC25 após transfecção com precursores de miRNAs. A Ki-67, uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, foi detectada em verde (FITC), e o núcleo celular foi identificado por DAPI, com marcação em azul. (A,B,C) Controle Negativo; (D,E,F) transfectados com precursor do miR-1; (G,H,I) transfectados com precursor do miR-7; (J,K,L) transfectados com precursor do miR-10b; (M,N,O) transfectados com precursor do miR-196a. Aumento: 40x. 60
- Figura 5.14 - Avaliação da porcentagem de células SCC25 em proliferação (identificadas por detecção de Ki67) após super-expressão de miR-1, miR-7, miR-10b e miR-196a, em comparação com os controles negativos de transfecção. Significância estatística: * $p < 0.001$ (*Student's t-test*). 61
- Figura 5.15 - Representação de um campo visual do microscópio para avaliação da proliferação celular por imunofluorescência (detecção de Ki67) de queratinócitos após transfecção com precursores de miRNAs. A Ki-67, uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, foi detectada em verde (FITC), e o núcleo celular foi identificado por DAPI, com marcação em azul. (A,B,C) Controle Negativo; (D,E,F) transfectados com precursor do miR-1; (G,H,I) transfectados com precursor do miR-7; (J,K,L) transfectados com precursor do miR-10b; (M,N,O) transfectados com precursor do miR-196a. Aumento: 40x. 62
- Figura 5.16 - Avaliação da porcentagem de queratinócitos em proliferação (identificadas por detecção de Ki67) após super-expressão de miR-1, miR-7, miR-10b e miR-196a, em comparação com os controles negativos de transfecção. Significância estatística: ** $p < 0.001$; * $p < 0.1$ (*Student's t-test*). 63
- Figura 5.17 - Porcentagem de células SCC25 nas fases G0/G1, S e G2/M após transfecção com os miRNAs miR-10b e miR-196a 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - STRs avaliados pelo kit AmpF/STR Identifiler (Life Technologies) e utilizados pela ATCC para caracterização das linhagens celulares selecionadas para esse projeto.....	32
Tabela 4.2 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para avaliação da expressão de genes alvo preditos para miRNAs e do gene referência utilizado para a normalização dos níveis de expressão.	39
Tabela 5.1 - Genes alvo confirmados para miRNA-1, autores da validação e <i>sites</i> de algoritmo <i>PicTar</i> confirmados e <i>TargetScan</i>	53
Tabela 5.2 - Genes alvo confirmados para miRNA-7, autores da validação e <i>sites</i> de algoritmo <i>PicTar</i> e <i>TargetScan</i>	54
Tabela 5.3 - Genes alvo confirmados para miRNA-10b, autores da validação e <i>sites</i> de algoritmo <i>PicTar</i> e <i>TargetScan</i>	54
Tabela 5.4 - Genes alvo confirmados para miRNA-196a, autores da validação e <i>sites</i> de algoritmo <i>PicTar</i> e <i>TargetScan</i> ..	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
ANXA1	Do inglês, <i>annexin A1</i> / Anexina 1
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
Ct	Do inglês, <i>cycle threshold</i> / Limiar do ciclo
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> / Ácido etileno diamino tetracético
EGFR	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i> / Receptor do fator de crescimento epidermal
<i>Fold-change</i>	Razão entre a expressão gênica de duas condições distintas
FOXP1	Do inglês, <i>forkhead box P1</i> / Forkhead box P1
GENCAPO	Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço
HDAC4	Do inglês, <i>histone deacetylase 4</i> / Histona deacetilase 4
HOXD10	Do inglês, <i>homeobox D10</i> / Homeobox D10
HPRT	Do inglês, <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> / Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
KLF4	Do inglês, <i>Kruppel-like factor 4</i> / Fator do tipo Kruppel 4
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MET	Do ingles, <i>Proto-oncogene met</i> / Proto-oncogene met (receptor fator de crescimento de hepatócitos)
PBS	Do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> / Tampão fosfato-salino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pH	Cologarítmo de concentração hidrogênionica de uma solução (potencial hidrogênionico)
Primer	Oligonucleotídeo iniciador

<i>PTK9</i>	Do inglês, <i>protein tyrosine kinase 9</i> / Proteína tirosina-quinase 9
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Do inglês, <i>messenger RNA</i> / RNA mensageiro
RISC	Do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i> / Complexo de silenciamento induzido por RNA
STR	Do inglês, <i>Short tandem repeat</i> / Pequenas repetições em tandem

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
cm	Centímetro
g	Força centrífuga relativa (=RCF)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
U	Unidade enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Cultivo de queratinócitos orais e linhagens celulares	27
4.1.1 Cultivo dos fibroblastos murinos para a confecção da camada de sustentação (<i>feeder-layer</i>) e preparação da camada de sustentação para o cultivo de queratinócitos	27
4.1.2 Propagação dos queratinócitos sobre a camada de sustentação (<i>feeder-layer</i>)	28
4.1.3 Cultivo dos queratinócitos em alta densidade	29
4.1.4 Cultivo de uma linhagem imortalizada de queratinócitos orais	29
4.1.5 Cultivo de Linhagens Celulares derivadas de CECF	30
4.2 Extração de DNA e análise de STRs	30
4.3 Transfecção celular	32
4.3.1 Ensaio de Super-expressão	32
4.3.2 Ensaios para inibição da expressão	34
4.4 Avaliação da citotoxicidade e eficiência da transfecção	34
4.5 Extração de RNA	35
4.6 Síntese de cDNA total	36
4.7 Síntese de cDNA para miRNAs específicos	36
4.8 Busca de alvos preditos in silico e validados na literatura	37
4.9 PCR em Tempo Real para detecção de contaminação de amostras de RNA por DNA genômico	37
4.10 PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs e seus alvos	38
4.11 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência e citometria de fluxo	40
4.12 Análises estatísticas dos resultados da PCR em tempo real	42

5 RESULTADOS	43
5.1 Seleção de linhagens celulares: análise de STRs e avaliação da expressão basal de miRNAs	43
5.2 Transfecção celular	48
5.2.1 Avaliação da citotoxicidade e eficiência no ensaio de transfecção	49
5.2.2 Transfecção de precursores de miRNAs em linhagens celulares – ensaios de super-expressão	49
5.2.3 Transfecção de precursores de miRNAs em queratinócitos derivados de cultura primária – ensaio de super-expressão	50
5.2.4 Transfecção de inibidores de miRNAs em linhagens celulares e queratinócitos derivados de cultura primária	51
5.3 Teste de contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA	52
5.4 Busca de alvos preditos <i>in silico</i> e validados na literatura	53
5.5 Avaliação da expressão de genes alvos preditos para miRNAs	55
5.6 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência e citometria de fluxo	59
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificadoras, com cerca de 22 nucleotídeos, que desempenham papel significativo como moléculas reguladoras da expressão gênica e têm sido associadas com diversos processos celulares relacionados a carcinogênese e progressão tumoral (Lagos-Quintana et al., 2001; Stefani; Slack, 2008). Predições bioinformáticas estimam que os miRNAs regulem mais de 30% dos genes codificadores de proteínas (Lewis et al., 2003).

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum do mundo, sendo que mais de 90% desses carcinomas são epidermóides (Vermorken et al., 2008; Jemal et al., 2010). Esse tumor tem início na superfície epitelial da mucosa que reveste as vias aero-digestivas (cavidade oral, fossas nasais, seios paranasais, faringe e a laringe). Estudos epidemiológicos mostram uma forte relação entre o carcinoma de cabeça e pescoço e fatores carcinógenos, especialmente tabaco e álcool (Farshadpour et al., 2011; Basu et al., 2008). Apesar de diversos avanços para tratamento do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, a taxa de sobrevivência global em 5 anos está entre as mais baixas dentre os principais tipos de cânceres, não apresentando melhora nas últimas três décadas (Jemal et al., 2007). Atualmente, o planejamento terapêutico está baseado principalmente no sítio do tumor primário e na presença ou ausência de metástases no momento do diagnóstico (Greenman et al., 2000).

A ação dos miRNAs no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é ainda pouco conhecida, apesar de estudos recentes já apontarem para sua relação com o prognóstico da doença (Li et al., 2009; Gee et al., 2010). Acredita-se que a compreensão do papel destas moléculas possa contribuir para uma melhor caracterização molecular da doença.

De uma forma geral, para a compreensão do papel de miRNAs no câncer tornam-se essenciais os estudos funcionais *in vitro*. Estudos funcionais com miRNAs podem ser realizados com ferramentas semelhantes a aquelas utilizadas para genes que codificam proteínas. A super-expressão de miRNAs permite a identificação de fenótipos associados com o ganho de função enquanto que a inibição gênica permite a identificação de fenótipos associados com a perda de função. Com a

combinação dessas duas ferramentas torna-se possível identificar não somente genes regulados por miRNAs mas também processos celulares afetados por miRNAs específicos.

Neste trabalho, avaliamos a viabilidade de utilização de algumas linhagens celulares e células derivadas de cultura primária como modelos para estudos funcionais para os quatro miRNAs previamente identificados como desregulados em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço - miRNA-1, miRNA-7 miRNA-10b e miRNA-196a. Ainda não se conhece o papel destes miRNAs no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, apesar de presentes na literatura no contexto de outros tipos de câncer (Yan et al., 2009; Li et al., 2009, Gabriely et al., 2011; Saydam et al., 2011). Foram realizados ensaios para a super-expressão e inibição da expressão destas moléculas e, uma vez constatado o sucesso da transfecção, avaliamos para cada caso a expressão de alvos (mRNAs) validados na literatura e/ou preditos *in silico*. O impacto destas intervenções em proliferação celular, um importante processo desregulado em câncer, também foi avaliado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os miRNAs (miRNAs) constituem uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento, que desempenham papel significativo como moléculas reguladoras (Lagos-Quintana et al. 2001). Estima-se que cerca de 30% dos genes humanos identificados possam ser alvos de miRNAs (Brennecke et al., 2005). O efeito do miRNA depende de sua interação com mRNA codificadores em regiões de complementaridade parcial. Esse mecanismo ainda não está completamente compreendido, mas sabe-se que essa interação leva ao silenciamento gênico por meio do bloqueio da tradução da sequência codificadora alvo, sem efeitos no acoplamento do mRNA com os ribossomos ou no início da tradução (Kim, 2004). Alguns miRNAs possuem complementaridade com as suas sequências alvo no mRNA e, nesse caso, levam à degradação da molécula de forma semelhante ao que realizam os siRNAs (Yekta et al., 2004). A interação entre miRNAs e seus alvos constitui um sistema complexo onde um único miRNA pode interagir e regular diversos alvos e, por outro lado, diversos miRNAs podem controlar um mesmo alvo (Griffiths-Jones et al., 2005).

Aproximadamente 30% dos genes que codificam miRNAs estão localizados em sítios frágeis ou em regiões genômicas associadas ao câncer, um indício de seu papel importante na patogênese da doença (Laganà et al., 2010). Os miRNAs podem funcionar como oncogenes ou supressores de tumor, e já se sabe que miRNAs participando da regulação de processos relacionados com tumorigênese, tais como a proliferação celular e processos apoptóticos (Zhang et al., 2007; Lu et al., 2005; Sun et al., 2009).

Acredita-se que o perfil de expressão de miRNA possa vir a se tornar um biomarcador útil para o diagnóstico do câncer, e pode-se também pensar em miRNAs como ferramentas tanto para prognóstico quanto para terapias em câncer (Gao et al., 2010; Chung et al., 2010; Feber et al., 2011). Gao e colaboradores (2010), em um estudo do perfil de expressão gênica global com 47 amostras pareadas de pacientes com câncer de pulmão, mostrou a relação entre o aumento da expressão do miRNA-21 com pior prognóstico. Os baixos níveis de expressão do miRNA-15b, miR-34c e miRNA-361 foram associados ao baixo risco de recidivas após cirurgia de ressecção curativa em carcinoma hepatocelular (Chung et al.,

2010). Feber e colaboradores (2011) ao estudarem o perfil de expressão gênica global de amostras de pacientes com carcinoma de esôfago em associação com estadiamento do tumor, observaram que o aumento da expressão do miRNA-143 e miRNA-145 estavam relacionados ao pior prognóstico da doença.

miRNA e os tumores epidermóides de cabeça e pescoço

O carcinoma de cabeça e pescoço é uma das neoplasias mais comuns no mundo, sendo considerado um dos principais problemas de saúde pública (Ferlay et al., 2001; Ministério da Saúde, 2003). Essas neoplasias são mais frequentes no sexo masculino do que no feminino. No Brasil, no ano de 2012, foram estimados 14.170 novos casos de câncer oral, sendo 9.990 homens afetados e 4.180 mulheres, conferindo a esse carcinoma a sétima posição entre as neoplasias mais frequentes no país (Instituto Nacional do Câncer, 2012). A grande maioria dos tumores de cabeça e pescoço são carcinomas epidermóides (CECP), com início na superfície epitelial da mucosa que reveste as vias aerodigestivas (cavidade oral, fossas nasais, seios paranasais, faringe e a laringe). Os pacientes com tumores em estágios precoces geralmente exibem poucos sintomas, o que resulta em atraso no diagnóstico e diminuição de sobrevida (Wulfkuhle et al., 2003). Existe ainda pouca consistência com relação à evolução da doença, uma vez que pacientes com lesões precocemente diagnosticadas podem apresentar evolução desfavorável e pacientes com tumores extensos podem conseguir controlar a doença. Atualmente, o planejamento terapêutico está baseado principalmente no sítio do tumor primário e na presença ou ausência de metástases no momento do diagnóstico (Greeman et al., 2000). Variáveis microscópicas como a gradação histológica, invasão vascular e perineural, padrão de invasão, desmoplasia e infiltrado peritumoral também podem ser utilizadas para esse tipo de decisão, porém não existem dados consistentes quanto ao impacto de cada uma delas no resultado da terapia, ou na evolução da doença (Edge; Compton, 2010).

Mesmo com os esforços em pesquisa, a taxa de sobrevida de 50% em cinco anos não sofreu grandes alterações nas últimas três décadas (Pignon et al., 2000; Carvalho et al., 2005; Jemal et al., 2007). A complexidade anatômica e etiológica dessa doença justifica as dificuldades encontradas tanto na escolha da terapia, quanto no

desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas ou técnicas para o diagnóstico e prognóstico da doença (Shibuya et al., 2002; Barnes et al., 2001). Ao lado disso, apesar dos principais fatores de risco para o CECP serem conhecidos (tabaco e álcool), e da disponibilidade de dados na literatura sobre genes com papel importante na tumorigênese de CECP, existem poucas informações disponíveis sobre mecanismos moleculares precisos, assim como não existe consenso sobre características moleculares representativas desse tipo de tumor.

Resultados de grupos que analisaram esses tumores sob o ponto de vista dos padrões de expressão gênica global, dentre eles o nosso, corroboram com as dificuldades encontradas na clínica, uma vez que ressaltam a grande heterogeneidade molecular entre subsítios em CECP (Mendez et al., 2002; Ziober et al., 2006, Severino et al., 2008). O estudo de miRNAs abre uma outra frente para análises, possivelmente capaz de integrar idéias já apresentadas até o momento, ou de encontrar novas abordagens para a compreensão desse tipo de câncer.

Entretanto, resultados relativos a padrões de expressão de miRNAs em CECP são escassos. Lajer e colaboradores (2011) caracterizaram o perfil de expressão de miRNAs em tumores frescos de carcinoma epidermoide oral e de faringe e identificaram possíveis moléculas características de CECP. Nohata e colaboradores (2011 b) estudaram o perfil de expressão gênica global dos miRNAs em tumores de CECP e em seguida realizaram um estudo funcional para validar os achados. Observaram que o miRNA-375 encontrava-se pouco expresso nos tumores quando comparado ao tecido adjacente. O restabelecimento da expressão gênica por estudo de super-expressão, mostrou significativa diminuição da proliferação e indução da apoptose destas células. Este miRNA regula negativamente os genes *AEG-1/MTDH* envolvidos nesta doença. No trabalho de Lee e colaboradores (2010) foi observado que o miRNA-204 era pouco expresso em tumores de CECP quando comparado ao tecido adjacente. Em estudo de ganho-de-função com linhagens deste tumor, observaram redução da adesão celular, migração e invasão, indicando que o miRNA-204 possa funcionar como um supressor de tumor em CECP.

Nosso grupo estudou anteriormente a expressão de miRNAs em tumores de pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e suas respectivas margens cirúrgicas com amostras do grupo GENCAPO (Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço, <http://ctc.fmrp.usp.br/ClinicalGenomics/cp/>), no contexto do projeto FAPESP 05/51467-0, por meio da análise de padrões de expressão gênica global por

microarrays. Aqui, abordamos quatro miRNAs que apresentaram expressão desregulada no estudo mencionado: miRNA-1, miRNA-10b, miRNA-7 e miRNA-196a. O miRNA-1 e o miRNA-10b apresentaram baixa expressão em tecidos de CECP comparados com o tecido livre de tumor, enquanto o miRNA-7 e miRNA-196a apresentaram alta expressão em CECP. Nesse trabalho pretendemos estabelecer um sistema para a avaliação do papel de miRNAs selecionados a partir dos resultados da análise de padrões de expressão global dessas moléculas em queratinócitos derivados de cultura primária.

Estudos funcionais com miRNAs e seleção celular

Para a compreensão do papel de miRNAs no câncer tornam-se essenciais os estudos funcionais *in vitro*. Estudos funcionais com miRNAs podem ser realizados com ferramentas semelhantes a aquelas utilizadas para genes que codificam proteínas. A super-expressão de miRNAs permite a identificação de fenótipos associados com o ganho de função enquanto que a inibição gênica permite a identificação de fenótipos associados com a perda de função. Com a combinação dessas duas ferramentas torna-se possível identificar não somente genes regulados por miRNAs mas também processos celulares afetados por miRNAs específicos.

Um passo inicial fundamental neste tipo de abordagem consiste na seleção do modelo celular mais adequado. O cultivo celular é um modelo muito utilizado por permitir uma análise do comportamento celular isolado da multiplicidade de processos biológicos que ocorrem *in vivo*. O uso de linhagens certificadas por fontes autorizadas garante a qualidade das conclusões obtidas; entretanto, laboratórios de pesquisa comumente mantêm diversas linhagens celulares para uso próprio. Uma vez que acidentes de contaminação cruzada podem ocorrer durante o manuseio destas células (Alston-Roberts et al., 2010), procedimentos rigorosos de controle de qualidade se fazem necessários. Neste trabalho nós utilizamos o perfil de STRs (do inglês, *Short Tandem Repeats* ou repetições curtas em sequência) para avaliar a identidade das linhagens celulares utilizadas (Oldroyd et al., 1995). Os STRs são regiões do genoma humano compostos por repetições de pequenas sequências de dois a seis nucleotídeos (por exemplo, “AT”), que podem ter diferentes números de

repetições (por exemplo, “ATATATAT = AT₄). Esse número de repetições em cada *locus* é uma característica hereditária e pode ser usada para identificar o DNA de cada indivíduo. Existem *loci* de STRs caracterizados em cada cromossomo humano e o uso de múltiplos *loci* podem identificar indivíduos com um alto grau de certeza, tornando esse método muito útil para testes de identificação forense ou paternidade, bem como para a caracterização de linhagens celulares.

Linhagens celulares comerciais (ou estabelecidas) oferecem um nível melhor de reprodutibilidade e, conseqüentemente, de padronização, quando comparadas às culturas primárias. Entretanto, culturas primárias têm a vantagem de não possuírem as alterações genéticas associadas à obtenção de linhagens imortalizadas ou as alterações relacionadas ao câncer presentes nas linhagens de carcinoma.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propõe a estabelecer um sistema para a avaliação do papel de miRNAs no carcinoma epidermoide, por meio de estudos funcionais em queratinócitos derivados de culturas primárias e linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Especificamente, pretende-se atingir os seguintes objetivos:

- Padronizar o cultivo de queratinócitos orais e células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço em meio de cultura adequados aos experimentos propostos;
- Avaliar a metodologia de transfecção para super-expressão e inibição da expressão de miRNAs em queratinócitos orais derivados de cultura primária, e em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, por meio da utilização de precursores para miRNAs e moléculas inibidoras da atividade de miRNAs.
- Padronizar técnica de PCR em tempo real para avaliar o sucesso das abordagens;
- Avaliar proliferação celular após super-expressão dos miRNAs, por imunofluorescência;
- Avaliar a expressão de genes alvos validados para os miRNAs estudados, de acordo com relatos da literatura, por PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (Anexo B) e da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A e B).

4.1 Cultivo de queratinócitos orais e linhagens celulares

4.1.1 Cultivo dos fibroblastos murinos para a confecção da camada de sustentação (*feeder-layer*) e preparação da camada de sustentação para o cultivo de queratinócitos

A camada de sustentação, denominada de *feeder-layer*, para o cultivo dos queratinócitos orais derivados de cultura primária era composta por uma linhagem de fibroblastos murinos do tipo 3T3-Swiss albino (ATCC/catálogo número CCL-92). Para a confecção desta camada, as células foram incubadas a 37°C em incubadora úmida com 5% de CO₂ até atingirem a sub-confluência, ou seja, até preencherem 70% a 80% da área total da garrafa de cultura. Quando as células atingiram a sub-confluência, foram submetidas a tratamento enzimático com solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Gibco: 25.300-054) por 5 minutos, sendo separadas em suspensão, e irradiadas para a preparação da camada de sustentação. As células foram expostas à fonte de irradiação de ⁶⁰Co, tipo *Gamma Cell*, com atenuador de 90%, para irradiação a 60 Gy, e foram então semeadas em garrafas próprias para cultura celular, em concentração de $3 \times 10^4/\text{cm}^2$.

O preparo da camada de sustentação ocorreu no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) sob a supervisão da Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor.

4.1.2 Propagação dos queratinócitos sobre a camada de sustentação (*feeder-layer*)

Os queratinócitos orais foram obtidos a partir de culturas primárias de fragmentos de mucosa bucal, provenientes de pacientes doadores voluntários, submetidos a cirurgias, tais como: remoção de terceiros molares, aumento de coroa clínica, ulectomia, ocorridos em clínicas e ambulatório na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram previamente informados e assinaram os respectivos termos de doação. Esse trabalho obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) sob o nº 087/CEP-IPEN/SP. O cultivo dos queratinócitos foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor e com a Dra. Maria Fátima Guarizo Klingbeil.

Os queratinócitos foram cultivados sobre camada de sustentação em um meio de cultura composto de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, New York, NY, USA), F-12 Nutrient Mixture (HAM, Gibco, New York, NY, USA) (2:1), suplementado com 10% de soro bovino Fetal Clone III (Hyclone, Logan, Utah, USA), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg /ml), gentamicina (50 µg /ml), anfotericina B (2.5 µg /ml), glutamina (4 mM), adenina (0.18 mM) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), insulina (5 µg /ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), hidrocortisona (0.4 µg /ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), toxina colérica (0.1 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), triiodotironina (20 pM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e fator de crescimento epidermal (EGF) (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (Benassi et al., 1993).

Para manutenção dos queratinócitos, quando estes atingiram a subconfluência, procedeu-se a tripsinização dessas células: as células foram primeiramente tratadas por 5 minutos com solução de EDTA 0,04% e posteriormente por mais 10 a 15 minutos com solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Gibco: 25.300-054), neutralizando em seguida a função enzimática da tripsina com meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (2.5 µg/mL) e centrifugando a 1000xg durante 5 minutos. Em seguida, todo o meio de cultura foi aspirado, deixando no fundo do tubo o precipitado celular. Essas células foram ressuspensas no meio cultura descrito acima. As células foram contadas em câmara hemocitométrica sob microscópio de

luz invertida, e novamente semeadas (6×10^3 células/cm²) sobre nova camada de sustentação, em garrafas próprias para cultura de células. O conjunto queratinócitos/camada de sustentação foi mantido em cultura, em atmosfera úmida à 37°C com 5% de CO₂, com troca de meio a cada dois dias.

A partir da primeira troca de meio, foi adicionado EGF ao meio de cultura (do inglês, *epidermal growth factor*) (R&D Systems 236 EG), na concentração de 10 ng/mL.

4.1.3 Cultivo dos queratinócitos em alta densidade

O cultivo em alta densidade foi utilizado para o crescimento das células após o ensaio de transfecção. Para isso, foi necessário semear quantidade de células superior (1.2×10^5 células/cm²) às quantidades necessárias para os cultivos feitos sobre camada de sustentação. O meio de cultura utilizado neste caso foi o mesmo descrito anteriormente no item 4.1.2. As células foram mantidas em atmosfera úmida à 37°C com 5% de CO₂.

4.1.4 Cultivo de uma linhagem imortalizada de queratinócitos orais

Cultivamos células HaCaT, uma linhagem imortalizada de queratinócitos orais obtida através de transformação espontânea, fornecida para este estudo pelo Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. Estas foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, Gibco, Germany), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Essas células foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

4.1.5 Cultivo de Linhagens Celulares derivadas de CECF

Linhagens celulares humanas derivadas de carcinoma epidermoide de língua, SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25, e FaDu (células derivadas de carcinoma epidermoide de lesão primária de hipofaringe) foram generosamente doadas por Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr e Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, originalmente disponíveis via ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*). Após descongelamento, as células foram cultivadas em 10ml de 2/3 de meio Eagle Dulbecco (Gibco: 11.965-092) e 1/3 de meio Ham F12 (Gibco: 11065-047), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone: Fetal Clone III SH 30.109-03), 1% de solução antibiótica-antimicótica e 1% de L-glutamina (4mM) (Gibco BRL: 21.051-040). As culturas foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido e o meio de cultura trocado a cada 2-3 dias. Ao atingirem confluência de 70%, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com 3ml de PBS 1X estéril com pH 7,2 e dispostas a 2ml de tripsina a 0,05% durante 5 minutos na estufa para destacá-las da placa de cultura. Após os 5 minutos de exposição a tripsina, adicionou-se 2ml de meio DMEM e F12 acrescido de FBS para inativação da enzima. As células em suspensão foram centrifugadas a temperatura ambiente a 1000xg por 4 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado, o precipitado de células foi ressuspensionado em 3ml de meio de cultura. Aliquotas de 1×10^6 células foram distribuídas em placas de Petri e mantidas na estufa até atingirem aproximadamente 80% de confluência, sendo então utilizadas para os experimentos de transfecção celular, para a extração de DNA ou para extração de RNA.

4.2 Extração de DNA e análise de STRs

Com o objetivo de confirmar a identidade das linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço utilizadas neste estudo, realizamos uma análise do perfil de STRs. A mesma técnica não pôde ser realizada para as

linhagens FaDu e HaCaT pois o perfil padrão para estas células não estava disponível.

Para esta análise, o DNA das células (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) foi isolado com o kit de extração *Puregene Isolation Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. De forma resumida, adicionou-se 300 µl de solução de lise ao *pellet* de células (cerca de 1×10^5 células). Em seguida, adicionou-se 100 µl de solução específica do kit para a precipitação protéica e centrifugou-se. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um novo tubo contendo 300 µl de isopropanol. As amostras foram misturadas por inversão e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1ml de etanol a 70% e centrifugou-se. O *pellet* secou a temperatura ambiente e o DNA foi ressuscitado em 50 µl de solução hidratante. O DNA extraído foi amplificado por PCR, de acordo com o manual do kit *AmpFLSTR Identifiler*[®] (Life Technologies[™]). De forma resumida, amostras contendo 0.05–0.125ng/µl de DNA foram amplificadas por uma reação contendo 9,5 µl de *AmpFLSTR Identifiler PCR mix*, 0,5 µl de *AmpliTaQ Gold DNA polimerase*, e 5,0 µl de *primer AmpFLSTR Identifiler*, com volume total de 25 µl. As amplificações foram realizadas no GeneAmp[®] PCR System 9700 (Life Technologies[™]), com um período de ativação enzimática de 11 minutos a 95 °C, seguido por 28 ciclos de 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e extensão final a 60 °C por 1 hora. Adicionou-se 25 µl de formamida e 0,5 µl do padrão de peso GeneScan 500 LIZ a 1 µl do produto de PCR. Os *loci* analisados foram: amelogenina, D7S820, D5S818, TPOX, CSFPO1, vWA, D13S317, TH01 e D16S539 (Tabela 4.1). A escolha destes marcadores teve como base as características disponibilizadas pela ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*) para nossas linhagens, conforme Tabela 4.1. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese capilar em condições de desnaturação no equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) e os resultados analisados pelo software de análise GeneMapper 3.7 (Life Technologies) no Laboratório de Técnicas Especiais do Hospital Israelita Albert Einstein.

Tabela 4.1 - STRs avaliados pelo kit AmpF/STR Identifier (Life Technologies™) e utilizados pela ATCC para caracterização das linhagens celulares selecionadas para esse projeto.

<div> Linhagens celulares STRs AmpFℓSTR® Identifier™ kit </div>	SCC4	SCC9	SCC15	SCC25
D7S820	9,11	8	10,11	12
CSF1PO	11	11	10,13	10
TH01	9,3	8,9	9,9,3	8
D13S317	11,13	9	9,14	13
D16S539	12	10,11	12,15	11,12
vWA	15,17	17	15,17	17,19
TPOX	8	9,11	8	8,12
Amelogenin	X,Y	X,Y	X,Y	X
D5S818	13	12	12	12

4.3 Transfecção celular

4.3.1 Ensaio de super-expressão

Para os ensaios de super-expressão utilizamos o *Pre-miR™ miRNA Starter Kit* (Ambion). Foram realizados experimentos para a super-expressão de quatro miRNAs. Para tanto utilizamos precursores sintéticos dessas moléculas (*Pre-miR™ miRNA Precursors, Ambion*), desenhados para mimetizar moléculas de miRNA maduros endógenos. Duas linhagens celulares (SCC4 e SCC25) e queratinócitos normais foram submetidos à transfecção reversa com *hsa-miR1 miRNA Precursor*, *hsa-miR7 miRNA Precursor*, *hsa-miR10b miRNA Precursor* e *hsa-miR196a miRNA Precursor*, bem como com um controle negativo (*Pre-miR Negative Control 1*) na presença do agente de transfecção *siPORT® NeoFx™*, seguindo recomendações do fabricante. Na transfecção reversa as células são misturadas com o complexo de

transfecção (precursores e agente de transfecção) enquanto aderem à placa (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Esquema da transfecção reversa. As células encontram-se em suspensão no momento do experimento, permitindo maior exposição ao complexo de transfecção (agente de transfecção e ácido nucléico). Esse método reduz o tempo de experimento e contribui para a eficiência da transfecção. Fonte: Modificado de Life Technologies™ (www.lifetechnologies.com).

Conforme sugestão do kit, foram testadas as concentrações de 50nM e 100nM de moléculas precursoras no ensaio de transfecção. Para o agente de transfecção, *siPORT® NeoFx™*, foram testadas as concentrações mínima, intermediária e máxima. Também foram testadas concentrações celulares variáveis: 1.2×10^5 e 2.4×10^5 em placa de 6 *wells*, e 2×10^4 e 4×10^4 células em placa de 24 *wells*.

4.3.2 Ensaio para inibição da expressão

Para os ensaios de inibição utilizamos o *Anti-miR™ miRNA inhibitor* (Ambion). Foram realizados experimentos para inibição do miRNA-7 que apresentava alta expressão nas células testadas. Para tanto, utilizamos inibidores sintéticos dessas moléculas (*Anti-miR™ miRNA inhibitors*, Ambion), que são fitas simples de ácidos nucleicos desenhados especificamente para se ligar e inibir moléculas endógenas de miRNA. A linhagem celular (SCC25) e queratinócitos normais foram submetidos à transfecção reversa com *hsa-antimiR7 miRNA inhibitor*, bem como com um controle negativo (*Anti-miR Negative Control*) na presença do agente de transfecção *siPORT® NeoFx™*, seguindo recomendações do fabricante. O método para transfecção foi reversa, assim como nos ensaios de super-expressão, representado na Figura 4.1. As concentrações finais de 50nM e 100nM foram utilizadas para os inibidores na presença de quantidades variáveis do agente de transfecção *siPORT® NeoFx™*, mínima, intermediária e máxima, conforme instruções do kit. Também foram testadas concentrações celulares distintas: 1.2×10^5 e 2.4×10^5 células 2×10^4 em placa de 6 wells e 4×10^4 em placa de 24 wells, bem como tempos distintos para a coleta e análise de expressão gênica.

4.4 Avaliação da citotoxicidade e eficiência da transfecção

Para análise da citotoxicidade da transfecção utilizamos o protocolo do kit *Pre-miR™ miRNA Starter* (Ambion). Como uma primeira investigação realizamos um ensaio de super-expressão do miRNA-1 nas linhagens SCC4 e SCC25. Foram testadas as concentrações finais de 50nM e 100nM para as moléculas precursoras e o agente de transfecção nas concentrações mínima, intermediária e máxima sugeridas pelo kit, em placas com 6 e 24 poços (Corning® Life Sciences). Na prática são comparados os níveis de expressão de um gene de expressão constitutiva, também chamado gene de referência (neste estudo foram utilizados os genes para RNA ribossomal 18S e o gene *HPRT*) entre as células transfectadas com um controle negativo (*Pre-miR Negative Control*) e as células não transfectadas. De

acordo com o protocolo, a transfecção com o controle negativo não deve afetar a expressão gênica: qualquer alteração na expressão do gene de referência nas culturas transfectadas pode ser atribuída à citotoxicidade. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor da razão, menor a citotoxicidade das condições.

Quanto a eficiência da transfecção, o protocolo do kit *Pre-miR™ miRNA Starter* (Ambion), sugere analisar o nível de inibição de alvos validados para os miRNAs estudados. A avaliação da expressão do gene *PTK9* após super-expressão do miRNA-1 é sugerida, pois trata-se de um alvo validado em células HeLa. Apesar do gene *PTK9* não ter sido validado nas células utilizadas neste projeto, buscamos avaliar também a sua expressão na tentativa de interpretar a eficiência dos ensaios de transfecção. Para tanto, calculou-se o OBF (do inglês, *Optimum Balance Factor* ou fator de balanço ótimo) com a multiplicação do valor do fator de citotoxicidade pela porcentagem de inibição do alvo, ou seja $OBF = (CT\ Neg\ \#1 \div CT\ não\ transfectados) \times (100 - 100 \times 2^{-\Delta\Delta CT})$. A porcentagem de inibição do gene alvo $\geq 60\%$ indica boa eficiência da transfecção.

4.5 Extração de RNA

Após 72 horas da transfecção realizou-se a extração de RNA total por *miRVana miRNA isolation Kit* (Ambion), seguindo as instruções do fabricante. O meio de cultura foi aspirado e posteriormente as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Adicionou-se 400 µl de solução de lise. Agitou-se vigorosamente por 10 segundos no vórtex, a fim de obter um lisado homogêneo. Adicionou-se 50µl de *miRNA Homogenate Additive* e levou-se ao vórtex por 15 segundos. Deixou-se a mistura no gelo por 10 minutos. Adicionou-se 500 µl de Ácido-Fenol:Clorofórmio e agitou-se vigorosamente no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo e então adicionou-se 1.25x volume recuperado após a centrifugação de etanol 100% à temperatura ambiente. Para cada amostra foi montada uma coluna em um tubo coletor. Em seguida, 700 µl da mistura foram pipetados na coluna e centrifugados 15 segundos à 10000xg. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a mistura

lisado/etanol fosse filtrada. Aplicou-se 700µl de *miRNA Wash Solution 1* à coluna e centrifugou-se por 10 segundos à 10000xg. Descartou-se o líquido e 500µl de *miRNA Wash Solution 2/3* foram aplicados à coluna e centrifugados 10 segundos à 10000xg. O último passo foi repetido e, após descartar o líquido, centrifugou-se 1 minuto para remover resíduos líquidos do filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados de 80 a 100 µl de solução de eluição pré-aquecida a 95°C. Centrifugou-se 30 segundos para recuperar o RNA.

O RNA extraído foi avaliado quanto à sua qualidade e concentração por meio do espectrofotômetro NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare). As amostras de RNA foram, também, submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio a 1%, para análise da integridade através da visualização das duas bandas de RNA ribossômico 28S e 18S.

4.6 Síntese de cDNA total

A síntese de cDNA total foi realizada a partir de 1 µg de RNA total pelo kit *High Capacity cDNA RT* (Life Technologies™). Para cada reação utilizou-se 2 µL *10x RT Buffer*, 0,8 µL *25x dNTP Mix*, 2 µL *10x RT Random Primers* e 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, amostra e água livre de nuclease para completar 20 µL. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) sob as condições de 10 min a 25°C, 2 horas a 37°C e 5 min a 85°C .

4.7 Síntese de cDNA para miRNAs específicos

A partir de 100ng de RNA total foi efetuada a síntese de cDNA por *TaqMan miRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies™) utilizando-se *primers* específicos para os miRNAs miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b, miRNA-196a e para o gene de referência *RNU48*, pequenos RNAs nucleares (Guan et al., 2010).

Para cada reação de cDNA utilizou-se 20x *RT primer*, 100mM *dNTP*, *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50U/ μ L), 10x *RT Buffer*, *RNAse inhibitor* (20U/ μ L), amostra adequada e água livre de nuclease para completar um volume de 15 μ L. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) sob as condições de 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min.

4.8 Busca de alvos preditos *in silico* e validados na literatura

A busca por alvos preditos para os miRNAs estudados foi feita por dois métodos. O primeiro foi uma busca em dados literários por meio de artigos científicos disponíveis no *PubMed* pertencente ao site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

No segundo método foram utilizados programas disponíveis na internet para a predição de alvos, o *TargetScan 5.1* (www.targetscan.org) e o *PicTar* (<http://pictar.mdc-berlin.de>). O modo de predição de alvos de miRNAs do TargetScan é baseado na energia livre de ligação (ΔG), na conservação entre as diferentes espécies (Lewis et al., 2005; Grimson et al., 2007; Friedman et al., 2009) e na complementaridade da região *seed* (região de sete a oito nucleotídeos na extremidade 5' do miRNA que confere especificidade ao seu RNAm alvo). Além de basear-se na termodinâmica e na complementaridade da região *seed*, o PicTar utiliza-se também de uma previsão combinatória para alvos comuns em um grupo de miRNAs expressos (Krek et al., 2005).

4.9 PCR em Tempo Real para detecção de contaminação de amostras de RNA por DNA genômico

Para a avaliação de uma possível contaminação do RNA extraído com DNA genômico, foi utilizado um *primer* para o gene *HPRT* que detecta uma sequência de 74 pares de base em material do tipo cDNA e/ou 242 pares de bases em DNA genômico.

A PCR em tempo real para a detecção da expressão do gene *HPRT* foi realizada por *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) utilizando o *primer* específico para o *HPRT* (Coló et al., 2011) (Tabela 4.2), seguindo as instruções do fabricante.

4.10 PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs e seus alvos

Avaliação da expressão de miRNAs por PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada por *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (*Life Technologies*), seguindo instruções do fabricante. Foram utilizadas reações específicas para miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a, além do *RNU48*, pequeno RNA nuclear utilizado como gene referência para normalizar a expressão dos miRNAs (Duan et al., 2010). Os ensaios seguiram estritamente as recomendações do fabricante, contendo *TaqMan 2X Master Mix*, *TaqMan 20X RT primer*, cDNA (sem diluição) e água livre de nuclease. As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos, em duplicata, levadas ao Termociclador 7500 Real Time PCR Systems (*Life Technologies™*), e submetidas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 min, e 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, com volume final de 20µL.

Avaliação da expressão de alvos de miRNAs

A reação de PCR em tempo real para detecção dos níveis de expressão do gene alvo *PTK9* foi realizada pelo protocolo *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (*Life Technologies*), seguindo estritamente as recomendações do fabricante. O gene de referência utilizado para normalizar a expressão do *PTK9* foi o *18S*, RNA estrutural presente nos ribossomos de eucariotos (Fitch et al., 1995).

Para detecção dos genes alvo *MET*, *FOXP1*, *HOXD10*, *KLF4* e *HDAC4* foram

utilizados *primers* previamente validados pelo fabricante OriGene (Rockville, USA), e para os genes *EGFR* e *ANXA1* foram utilizados *primers* previamente validados pelo fabricante Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany), cedidos pelo Prof. Dr. Holger Brueggemann (Max Planck Institute for Infection Biology) (Tabela 4.2). Como gene de referência utilizamos o *HPRT*, desenhado pelo software *Primer Express 3.0* (Life Technologies™) (Coló et al., 2011). As sequências e o número de acesso no NCBI estão citados na Tabela 2. As reações foram realizadas em duplicata com volume final de 20µL, de acordo com o protocolo SYBR® Green Master Mix® (*Life Technologies*), *primers* na concentração final na reação de 200nM, e cDNA (diluição de 1:2). As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos e levadas ao Termociclador 7500 Real Time PCR Systems (Life Technologies™), a 95°C por 10 min; 45 ciclos a 95°C por 15 s e a 60°C por 1 min, seguido da curva de dissociação.

Para a otimização das reações de amplificação utilizamos cDNA de ovário fornecido pela empresa Origene.

Tabela 4.2: Sequência dos *primers* utilizados para avaliação da expressão de genes alvo preditos para miRNAs e do gene referência utilizado para a normalização dos níveis de expressão

<u>Gene</u>	<u>Fabricante e Número de Acesso</u>	<u>Sequência Foward</u>	<u>Sequência Reverse</u>
<u>MET</u>	OriGene (NM_000245)	5'TGCACAGTTGGTCCTGCCATGA 3'	5'CAGCCATAGGACCGTATTTTCGG 3'
<u>EGFR</u>	Eurofins MWG Operon (NM_201284)	5'TCCTCTGGAGGCTGAGAAA 3'	5' GGGCTCTGGAGGAAAAGAAA 3'
<u>KLF4</u>	OriGene (NM_004235)	5'CATCTCAAGGCACACCTGCGAA 3'	5'TCGGTCGCATTTTTGGCACTGG 3'
<u>HOXD10</u>	OriGene (NM_002148)	5'TGGCTGAGGTCTCCGTGTCCA 3'	5'GCACCTCTTCTTCTGCCACTC 3'
<u>FOXP1</u>	OriGene (NM_032682)	5'CAAAGAACGCCTGCAAGCCATG 3'	5'GGAGTATGAGGTAAGCTCTGTGG 3'
<u>HDAC4</u>	OriGene (NM_006037)	5'AGGTGAAGCAGGAGCCATTGA 3'	5'GGTAGTTCCTCAGCTGGTGGAT 3'
<u>ANXA1</u>	Eurofins MWG Operon (NM_000700)	5'GGGACCACCTTTGGATGACT 3'	5'AGTTCTTTGCAAGAAGGTAGAGAT3'
<u>HPRT</u>	IDT DNA(NM_000194)	5'CCCACGAAGTGTTGGATATAAGC 3'	5'GGGCATATCCTACAACAACTTGTC 3'

Análise dos resultados da PCR em tempo real

A análise dos resultados da PCR em tempo real foi semiquantitativa, segundo o modelo matemático desenvolvido por Ptaffl (2001) e conhecido como “método $\Delta\Delta Ct$ ”. O cálculo baseia-se na comparação dos valores de Ct (do inglês, *cycle threshold*), expresso em unidades arbitrárias, entre dois grupos de amostras no momento em que a PCR atinge a fase exponencial de amplificação. De acordo com este modelo, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{fold-change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$\Delta Ct = Ct \text{ do gene-alvo} - Ct \text{ do gene referência}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$

$\Delta Ct_1 = \text{amostra de interesse}$

$\Delta Ct_2 = \text{amostra do grupo controle}$

Para uma melhor ilustração da diferença entre os níveis de expressão dos miRNAs entre queratinócitos ainda na presença de camada de sustentação e confluentes, construiu-se um gráfico de dispersão com o auxílio do programa *RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.4* (Sabioscience). A quantificação relativa da expressão foi realizada conforme descrição acima. O intervalo representado no gráfico corresponde à um *fold-change* de 2.0 entre os níveis de expressão dos dois grupos comparados. Os valores acima ou abaixo da linha mediana representando possuem expressão aumentada ou diminuída, respectivamente, quando os dois grupos são comparados.

4.11 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência e citometria de fluxo

Para imunofluorescência, a cultura de células transfectada com o precursor para miRNA e os controles de transfecção foram cultivados, em duplicatas, em Lab-Tek Chamber Slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) ou lamínulas

de vidro. As células foram fixadas com metanol, bloqueadas com soro bovino em PBS (3%), e incubadas por 1h com Ki67 anti-humano (Monoclonal Mouse, clone MIB-1, DAKO, Denmark A/5), diluído 1:400. As células foram lavadas com PBS e incubadas em temperatura ambiente por 45 minutos com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (1:50) (Novocastra Laboratories, UK), em sala escura. Após lavagem, as câmaras contendo as células foram montados com VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Ind. Buelingame, CA 94010). Os resultados foram analisados por microscopia de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). A porcentagem de células apresentando marcação positiva para Ki67 foi determinada através da contagem do número de células Ki67 positivas em relação ao número total de células contadas. A contagem foi realizada manualmente em toda a área do *chamber* ou da lamínula.

Para a citometria de fluxo, realizada em colaboração com a Dra. Luciana Marti, pesquisadora do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, as células foram marcadas com o kit CycleTEST PLUS DNA (BDIS, San Jose, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O método envolve a dissolução dos lipídeos de membrana com detergente não iônico, eliminação de proteínas do citoesqueleto celular com tripsina, a digestão do RNA com a enzima RNase e a estabilização da cromatina com espermina. Em seguida, é necessário realizar a marcação com Iodeto de Propídeo, que é um corante que se intercala ao DNA celular. O resultado da fluorescência emitida pelo Iodeto de Propídeo é avaliado em um gráfico do tipo histograma e o conteúdo de DNA distribui as células em “G1+G0”, “S” e “G2+M”. A discriminação entre as diferentes fases do ciclo é feita pela intensidade de fluorescência, sendo que a fase “G2+M” sempre apresenta o dobro de fluorescência que a fase “G1+G0”, pois o DNA nesta fase encontra-se duplicado, enquanto a distância entre “G1+G0” e “G2+M”, apresenta uma quantidade intermediária de DNA sendo caracterizada como a fase de síntese, “S”.

De forma resumida, cerca de 5×10^5 células foram centrifugadas e ressuspendidas em 250µl da Solução A (tampão com detergente e tripsina), após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente foi adicionado 250µl da Solução B (tampão com inibidor de tripsina, contendo RNase), seguido por incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200µl da Solução C (Iodeto de Propídeo), e incubou-se por 10 minutos no escuro a 4°C. Após a incubação as

células foram filtradas em filtro de nylon de 50µm e em seguida adquiridas por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados pelo software FlowJo (Treestar).

4.12 Análises estatísticas dos resultados da PCR em tempo real

O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar os resultados obtidos pela PCR em tempo real. A significância estatística foi determinada comparando-se os valores de ΔCt entre as células transfectadas com precursores ou inibidores sintéticos de miRNAs específicos e controles de transfecção. Os valores apresentados nos gráficos são médias do *fold-change*. A partir dos valores da duplicata do *fold-change* foi calculado o desvio padrão. Os *p* valores menores do que 0.05, foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção de linhagens celulares: análise de STRs e avaliação da expressão basal de miRNAs

As linhagens celulares de carcinoma epidermoide de língua (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) foram analisadas quanto ao perfil de STRs em 9 *loci* gênicos. A escolha teve como base o padrão fornecido pela ATCC (Tabela 4.2) e os STRs disponíveis no kit *AmpFLSTR Identifier*[®] (Life Technologies). As três linhagens celulares (SCC4, SCC9 e SCC25) apresentaram o padrão de STRs descrito pela ATCC, indicando que essas células provavelmente mantêm as características da linhagem original. Os resultados desta análise para as linhagens estão ilustrados a seguir (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3). Ao analisar a linhagem SCC15 observou-se que o padrão observado diferia do apresentado pela ATCC e, em função disso, a linhagem SCC15 não foi incluída nos experimentos posteriores.

Figura 5.1 – STRs utilizados para caracterização de linhagens celulares. (A) Padrão de STRs esperados para a linhagem SCC4 (B) Representação dos loci de STRs TH01 e D13S317 identificados em SCC4.

Figura 5.2 – STRs utilizados para caracterização de linhagens celulares. (A) Padrão de STRs esperados para a linhagem SCC9 (B) Representação dos loci de STRs THO1 e D13S317 identificados em SCC9.

Figura 5.3 – STRs utilizados para caracterização de linhagens celulares. (A) Padrão de STRs esperados para a linhagem SCC25 (B) Representação dos loci de STRs THO1 e D13S317 identificados em SCC25.

O primeiro passo na escolha de linhagens adequadas para os experimentos de ganho e perda de função foi a análise de expressão basal dos miRNAs de interesse nessas células. Para esta análise, inicialmente avaliamos a integridade do RNA extraído das linhagens celulares e dos queratinócitos em gel de agarose (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Avaliação da integridade do RNA extraído de células (A) FL, BHKFL, BHKHD, BHK3, SCC4, SCC25, SCC9 (B) HaCaT e (C) FaDu. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1,5%. O padrão de peso molecular utilizado apresenta o tamanho de fragmentos de DNA dupla fita em pares de bases. FL: *feeder-layer* (camada de sustentação); BHKFL: queratinócitos cultivados sobre camada de sustentação; BHKHD: queratinócitos em confluência; BHK3: queratinócitos cultivados em alta densidade

Quanto à cultura primária de queratinócitos orais, foram realizados experimentos para verificar se a presença da camada de sustentação (*feeder-layer*) poderia interferir nos níveis de expressão dos miRNAs de interesse para este estudo. Assim, analisamos a expressão relativa dos miRNAs em queratinócitos sobre camada de sustentação abundante (BHKFL) e em cultura confluenta de queratinócitos, ou seja, sobre pouca camada de sustentação (BHK3) (Figura 5.5). Em BHKFL os queratinócitos estavam subconfluentes e ocupavam cerca de 70% da placa de cultura, enquanto que em BHK3 eles ocupavam praticamente toda a placa. Observa-se que a expressão dos miRNAs estudados permaneceu constante ou aumentou à medida que a quantidade de camada de sustentação diminuiu. Comparamos ainda a expressão desses miRNAs entre fibroblastos irradiados e não irradiados e observamos que a expressão na camada de sustentação não é nula.

Optamos, então, por realizar os experimentos subsequentes em condições do tipo BHK3.

Figura 5.5 - Gráfico de dispersão representando a média do *fold-change* entre a expressão de miRNAs em queratinócitos confluentes (BHK3) e subconfluentes (BHKFL). O eixo vertical mostra a expressão normalizada de BHKFL e o eixo horizontal mostra o valor correspondente em BHK3. O intervalo representado no gráfico corresponde ao *fold-change* de 2.0 entre os níveis de expressão dos dois grupos comparados. A normalização foi realizada com o gene de referência *RNU48*

O nível de expressão basal dos quatro miRNAs de interesse em linhagens celulares de carcinoma epidermoide em comparação com os queratinócitos orais pode ser observado na Figura 5.6. A expressão do miR-196a apresenta-se significativamente mais expressa em linhagens tumorais quando comparada à expressão em células normais; ressalta-se entretanto, que a expressão também foi maior na linhagem imortalizada de queratinócitos orais (HaCaT), indicando que essa linhagem celular não seria um modelo adequado de célula não-tumoral para esse miRNA. O mesmo padrão pode ser observado para o miR-10b: originalmente pouco

expresso em tumores comparados com tecido livre de tumor ele também aparece menos expresso em linhagens tumorais comparadas com os queratinócitos orais normais. A expressão em HaCaT mais uma vez não se equipara à expressão dos queratinócitos orais normais provenientes de culturas primárias.

Resultados menos consistentes, ressaltando características intrínsecas das células tumorais, foram obtidos para miRNA-7 e miRNA-1, respectivamente super-expresso e pouco expresso em tumores. Para miRNA-7, as linhagens derivadas de carcinoma de língua apresentaram a super-expressão esperada quando comparadas aos queratinócitos orais normais, enquanto que FaDu, a linhagem de carcinoma de orofaringe, não apresentou esse mesmo resultado. Interessante notar que HaCaT foi a linhagem que mais expressou esse miRNA, enquanto esperava-se expressão inferior àquela das linhagens tumorais. Para o miRNA-1 a exceção foi a linhagem SCC4, com expressão bastante semelhante aos queratinócitos orais normais, e mesmo superior, quando o esperado seria expressão inferior. O nível de expressão de miRNA-1 foi superior em HaCaT comparada com as demais linhagens tumorais, dessa vez em acordo com esperado para o miRNA.

Figura 5.6 - *Fold-change* entre a expressão de miRNAs em células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (SCC4, SCC9, SCC25, FaDu), HaCaT e queratinócitos orais normais (BHK3). Os dados apresentados são a média do log2 fold-change entre a expressão em células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e queratinócitos. SCC4, SCC9, SCC25: linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de língua; FaDu: linhagem celular derivada de lesão primária de carcinoma epidermoide hipofaringe; HaCaT: linhagem de célula epidérmica transformada espontaneamente; BHK3: queratinócitos em confluência. A normalização foi realizada com o gene de referência *RNU48*

5.2. Transfecção celular

Os ensaios de transfecção tiveram dois objetivos: ganho e perda de função relacionadas a super-expressão e inibição da expressão de miRNAs, respectivamente. Para o ensaio de super-expressão, foram utilizados precursores de miRNAs desenhados para mimetizar moléculas de miRNA maduros endógenos. E no ensaio de inibição, inibidores sintéticos dessas moléculas, que são fitas simples de ácidos nucleicos desenhados especificamente para se ligar e inibir moléculas endógenas de miRNA.

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade e eficiência no ensaio de transfecção

Para estabelecer condições ideais para os ensaios de transfecção, investigamos, em um primeiro momento, a citotoxicidade do agente de transfecção. Testou-se o procedimento de transfecção com a linhagem SCC4 e SCC25, segundo descrição no item 4.3.1. O grau de citotoxicidade foi calculado a partir da razão entre o valor de Ct do gene utilizado como gene de referência, o *18S*, das amostras transfectadas com o controle negativo e das amostras não transfectadas ($Ct \text{ Neg \#1} \div Ct \text{ não transfectado} = \text{fator de citotoxicidade}$). Os valores calculados, tanto para SCC4 quanto para SCC25, mostrou-se próximo a 1 para todas as condições avaliadas, indicando baixa citotoxicidade do ensaio.

Quanto a avaliação da eficiência de transfecção, o kit utilizado sugere calcular a eficiência em função da porcentagem de inibição do gene alvo. A avaliação da expressão do gene *PTK9* após super-expressão do miRNA-1 foi validada em células HeLa. Na linhagem SCC25 e queratinócitos observamos que mesmo super-expressando o miRNA-1 com sucesso, não foi possível inibir a expressão do gene *PTK9* (item 4.3.1). A regulação de um gene alvo por um miRNA varia de acordo com o contexto estudado. O fato de um gene ter sido validado como alvo para microRNA em uma determinada situação não significa que o mesmo resultado será obtido em um contexto diferente. Por este motivo, neste estudo, adotamos a diferença de expressão de miRNAs significativa entre células transfectadas com moléculas precursoras e células transfectadas com controles como uma indicação de que a transfecção foi eficiente.

5.2.2 Transfecção de precursores de miRNAs em linhagens celulares – ensaios de super-expressão

Para a padronização dos ensaios de transfecção, transfectamos a linhagem SCC4 e linhagem SCC25, escolhida como nosso modelo de estudo, com moléculas precursoras para miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a com o intuito de estabelecer as melhores concentrações para a super-expressão destas moléculas.

Testamos diversas concentrações tanto para o agente de transfecção como para os precursores, assim como quantidades distintas de células por poço (placa de 24 wells). As melhores situações para super-expressão de miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a em SCC25 estão apresentadas na Figura 5.7. Os resultados para SCC4 foram semelhantes. Não foram observadas alterações na morfologia das células transfectadas.

Figura 5.7 - Avaliação do nível de expressão de miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a em linhagem SCC25 após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do $\log_2$ fold-change entre a expressão do miRNA em células SCC25 transfectadas com moléculas precursoras (PreMir) e transfectadas com o controle negativo de transfecção (Oligo-). Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. *As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas ($p < 0.001$, Student's *t* test)

5.2.3 Transfecção de precursores de miRNAs em queratinócitos derivados de cultura primária – ensaio de super-expressão

Conforme anteriormente explicado, os queratinócitos foram inicialmente cultivados sobre camada de sustentação devido à qualidade das células obtidas. No entanto, para a transfecção, as células foram coletadas quando em confluência e, após transfecção foram plaqueadas em alta densidade. Em cada poço (placa do tipo 24 wells) foram semeadas $1,2 \times 10^5$ células, uma densidade calculada de acordo com

a experiência prévia do laboratório da Dra. Monica Beatriz Mathor para o sucesso do cultivo em alta densidade. A exemplo dos resultados obtidos com as linhagens celulares, o fator de citotoxicidade foi sempre baixo. Os resultados finais obtidos após transfecção são apresentados na Figura 5.8. Não foram observadas alterações na morfologia das células transfectadas.

Figura 5.8 - Avaliação do nível de expressão de miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a em queratinócitos após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do log10 *fold-change* entre a expressão do miRNA em células transfectadas com moléculas precursoras (PreMir) e transfectadas com o controle negativo da transfecção (Oligo-). Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. *As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas ($p < 0.001$, *Student's t test*)

5.2.4 Transfecção de inibidores de miRNAs em linhagens celulares e queratinócitos derivados de cultura primária

Escolhemos um miRNA, o miR-7, para avaliação do protocolo para inibição, tanto na linhagem SCC25 quanto em queratinócitos derivados de cultura primária. A exemplo dos ensaios realizados com a super-expressão, avaliamos diversas concentrações para inibidores, agente de transfecção, quantidades de células e tempos de coleta de RNA para análise da expressão gênica. Não obtivemos sucesso para a inibição significativa deste miRNA na linhagem celular. Os mesmos testes foram realizados para a cultura de queratinócitos, mas não conseguimos inibir a expressão significativamente em nenhuma das situações avaliadas. Por este motivo não realizamos outros ensaios com as células submetidas a este protocolo.

5.3 Teste de contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA

Antes da análise da expressão de alvos validados na literatura para os miRNAs super-expressos, verificamos a possível contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA extraídas da linhagem tumoral SCC25 e da cultura primária de queratinócitos. Com este fim, realizamos um ensaio de PCR em tempo real com um par de *primers* para o gene *HPRT* capaz de detectar uma sequência de 74 pares de base em cDNA e 242 pares de bases em DNA genômico.

Os resultados mostraram que fragmentos acima de 100 pares de bases estavam ausentes, indicando que não havia contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA. A Figura 5.9 ilustra este resultado para os experimentos com o miR-7.

Figura 5.9 - Avaliação da contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA extraído da linhagem SCC25 e queratinócitos após ensaio de super-expressão. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1.5%. O marcador de peso molecular utilizado foi 100pb DNA Ladder (Invitrogen). PremiR7: células transfectadas com moléculas precursoras do miRNA-7; Pre negativo: células transfectadas com controle negativo; Controle: células cultivadas sem a presença de precursores

5.4 Busca de alvos preditos *in silico* e validados na literatura

Alvos para miR-1

O miRNA-1 apresenta 584 alvos identificados pelo *TargetScan* e 535 pelo *PicTar*, dentre eles, alvos com sítios conservados e pouco conservados. Os alvos validados para o miRNA-1, até o momento, estão listados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Genes alvo confirmados para miRNA-1, autores da validação e *sites* de algoritmo *PicTar* confirmados e *TargetScan*.

miRNA	Genes	Tecido/linhagens celulares	Autores	Predição
miRNA-1	<i>G6PD</i>	Linhagem de câncer de mama	Lewis et al. (2003)	Sem predição
	<i>BDNF</i>	Linhagem de câncer de mama	Lewis et al. (2003)	PicTar
	<i>BCL2</i>	Cardiomiócitos	Tang et al. (2009)	Sem predição
	<i>HDAC4</i>	Linhagem de câncer de pulmão	Nasser et al. (2008)	PicTar e TargetScan
	<i>KCNJ2</i>	Estudo <i>in vivo</i> (cardiomiócitos)	Yan et al. (2007)	Sem predição
	<i>GJA1</i>	Estudo <i>in vivo</i> (cardiomiócitos)	Yan et al. (2007)	PicTar e TargetScan
	<i>KCNE1</i>	Linhagem de músculo cardíaco	Luo et al. (2007)	Sem predição
	<i>HSPA1A</i>	Cardiomiócitos	Xu et al. (2007)	Sem predição
	<i>HSPD1</i>	Cardiomiócitos	Xu et al. (2007)	PicTar
	<i>HCN2, HCN4</i>	Cultura primária de miócitos	Luo et al. (2008)	Sem predição
	<i>MET, FOXP1, Pim-1</i>	Linhagem de câncer de pulmão	Nasser et al. (2008)	PicTar e TargetScan
	<i>CNN3, LARP4, TAGLN2, ATP6V1B2</i>	Linhagem de câncer de mama	Takane et al. (2010)	Sem predição
	<i>PTK9</i>	Linhagem de câncer de mama	Lim et al. (2005)	TargetScan
	<i>MET</i>	Linhagem humana de rhabdomyosarcoma	Yan et al. (2009)	PicTar e TargetScan
	<i>TAGLN2</i>	Linhagem de CECp	Nohata et al. (2011a)	TargetScan

Alvos para miR-7

Para o miRNA-7 possui 302 alvos identificados pelo *TargetScan* e 349 pelo *PicTar*. Os alvos confirmados até o momento estão representados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Genes alvo confirmados para miRNA-7, autores da validação e *sites* de algoritmo *PicTar* e *TargetScan*

miRNA	Genes	Tecido/linhagens celulares	Autores	Predição
miRNA-7		Linhagem celular de glioblastoma	Kefas et al. (2008)	Sem predição
	<i>IRS1</i>	Linhagem celular de glioblastoma	Kefas et al. (2008)	PicTar e TargetScan
	<i>IRS2</i>	Linhagem celular de glioblastoma	Kefas et al. (2008)	TargetScan
	<i>EGFR</i>	Linhagem celular de glioblastoma	Kefas et al. (2008)	TargetScan
	<i>PAK1</i>	Linhagem celular de câncer de mama	Reddy et al. (2008)	Sem predição
	<i>SNCA</i>	Linhagem celular de neuroblastoma	Junn et al. (2009)	Sem predição
	<i>CD98</i>	Linhagem celular epitelial	Nguyen et al. (2011)	Sem predição

Alvos para miR-10b

Foram identificados 186 alvos identificados pelo *TargetScan* e 181 pelo *PicTar*, para miRNA-10b. Os alvos confirmados, até o momento, estão representados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Genes alvo confirmados para miRNA-10b, autores da validação e *sites* de algoritmo *PicTar* e *TargetScan*

miRNA	Genes	Tecido/linhagens celulares	Autores	Predição
miRNA-10b	<i>HOXD10</i>	Linhagem de câncer de mama	Ma et al. (2007)	PicTar e TargetScan
	<i>KLF4</i>	Linhagem celular de câncer de esôfago	Tian et al. (2010)	PicTar e TargetScan

Alvos para miR-196a

O miRNA-196a apresenta 211 alvos identificados pelo *TargetScan* e 127 pelo *PicTar*. A Tabela 5.4 está representando os alvos confirmados até o momento.

Tabela 5.4 - Genes alvo confirmados para miRNA-196a, autores da validação e sites de algoritmo *PicTar* e *TargetScan*

miRNA	Genes	Tecido/linhagens celulares	Autores	Predição
miRNA-196a	<i>HOXB8</i>	Linhagem celular de câncer de mama e de leucemia	Yekta et al. (2008) e Kawasaki et al. (2004)	Sem predição
	<i>HOXC8</i>	Linhagem celular de mama e linhagem de células-tronco mesenquimais	Yekta et al. (2008) e Kim et al. (2009)	PicTar e TargetScan
	<i>HOXD8, HOXA7</i>	Linhagem celular de câncer de mama	Yekta et al. (2008)	PicTar
	<i>ANXA1</i>	Linhagem celular de adenocarcinoma de esôfago, câncer de mama e de origem endometrial	Luthra et al. (2008)	PicTar
	<i>KRT5, S100A9, SPRR2C</i>	Linhagem celular de adenocarcinoma de esôfago	Maru et al. (2009)	Sem predição

Ressalta-se a pequena quantidade de alvos comprovadamente sob a ação dos miRNAs aqui estudados quando comparada com a lista extensa de alvos preditos, uma realidade para todos os miRNAs listados em bancos de dados. Escolheu-se os genes *MET*, *FOXP1*, *HDAC4* e *PTK9* para miRNA-1 por apresentarem as confirmações experimentais mais precisas no momento do desenho deste estudo; *EGFR* para miRNA-7, devido à importância deste gene para CECP; *KLF4* e *HOXD10* para miRNA-10b, por serem os dois únicos genes com validações precisas no momento do desenho dos nossos experimentos; e *ANXA1* para miRNA-196a, por ser um gene com possível papel em CECP (Garcia Pedrero et al., 2004).

5.5 Avaliação da expressão de genes alvos preditos para miRNAs

As reações de PCR em tempo real foram padronizadas com um cDNA validado pela empresa Origene, variando as concentrações de cDNA e *primer*. Definimos a

concentração de 200 nM (concentração final na reação) para os *primers* e o cDNA com diluição 1:2.

A expressão basal dos genes alvo selecionados foi então avaliada na linhagem SCC25 e em queratinócitos orais derivados de cultura primária. Pudemos observar amplificação adequada com os *primers* *MET*, *FOXP1*, *HDAC4*, *EGFR*, *KLF4*, *HOXD10* e *ANXA1* tanto para a linhagem SCC25 quanto para os queratinócitos. As curvas de amplificação apresentaram valores de Ct que variaram entre 15 e 26 ciclos e as curvas de dissociação apenas um pico, conforme representado na Figura 5.10, assim como temperatura conforme os valores esperados de *Tm*. Observamos ainda uma amplificação tardia nas reações que não continham cDNA (“branco”), com curva de dissociação bastante distinta daquela esperada para as amplificações corretas. Este padrão era esperado, e estavam de acordo com experimentos de padronização prévia fornecidos pela empresa que comercializa os *primers* e cDNA controle. A Figura 5.10 ilustra reações para os genes *KLF4*, *HDAC4* e *EGFR*.

Figura 5.10 - Avaliação das curvas de amplificação (A) e dissociação (B) para os *primers* *KLF4* (vermelho), *HDCA4* (amarelo) e *EGFR* (verde) na linhagem SCC25. Diluição da amostra: 1:2, concentração final dos *primers*: 200nM

Após a análise da expressão basal dos genes alvo na linhagem SCC25 e nos queratinócitos, avaliamos o impacto da super-expressão de miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a na linhagem SCC25 e em queratinócitos orais sobre a expressão desses genes (Figuras 5.11 e 5.12).

Figura 5.11 - Avaliação da expressão dos genes (A) *MET*, *FOXP1*, *HDAC4*, *PTK9* (B) *EGFR* (C) *KLF4*, *HOXD10* e (D) *ANXA1*, alvos preditos do miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a, respectivamente, em linhagem SCC25 após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do *fold-change* entre a expressão dos genes em células transfectadas com moléculas precursoras (PreMiR) e transfectadas com o controle negativo da transfecção (Oligo-). Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas (* $p < 0.05$, Student's *t* test)

Os alvos preditos para o miRNA-1 são o *MET*, *FOXP1*, *HDAC4* e *PTK9*. Na linhagem SCC25, pudemos observar uma sutil diminuição da expressão dos genes *FOXP1* e *HDAC4*, porém sem significância estatística. Conforme já apresentado no item 5.2.1, o gene *PTK9* não apresentou alteração significativa nos níveis de expressão gênica (*fold-change* -1.0). Já o gene *MET* apresentou diminuição da expressão em 2,3 vezes, diminuição estatisticamente significativa (*t* test $p < 0.05$).

Para o miRNA-7 foi testado o gene alvo *EGFR*. A expressão deste gene não foi alterada de forma significativa (*fold-change* -1.0).

Os alvos validados e selecionados para o miRNA-10b são o *KLF4* e *HOXD10*. Foi possível observar diminuição da expressão tanto do gene *KLF4* quanto do gene *HOXD10*, porém apenas para o *KLF4* este resultado foi estatisticamente significativo, *fold-change* 2,5 (*t* test $p < 0.05$).

O gene *ANXA1* foi testado como alvo predito para miRNA-196a. Notou-se uma sutil diminuição da expressão deste gene alvo, porém sem significância estatística (*fold-change* -1,3).

Em queratinócitos, nenhum dos alvos avaliados para o miRNA-1 (*MET*, *FOXP1*, *HDAC4* e *PTK9*) apresentou alteração significativa na expressão após super-expressão do miRNA (Figura 5.12).

Os alvos preditos para o miRNA-7 e miRNA-196a são *EGFR* e *ANXA1*, respectivamente. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão destes genes (*fold-change* -1.0).

Os alvos preditos testados para o miRNA-10b são o *KLF4* e *HOXD10*. Pudemos observar diminuição de 6 vezes na expressão do gene *HOXD10*, um resultado estatisticamente significativo (*t test* $p < 0.05$).

Figura 5.12 - Avaliação da expressão dos genes (A) *MET*, *FOXP1*, *HDAC4*, *PTK9* (B) *EGFR* (C) *KLF4*, *HOXD10* e (D) *ANXA1*, alvos preditos do miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a, respectivamente, em queratinócitos orais após ensaio de super-expressão. Os dados apresentados são a média do *fold-change* entre a expressão dos genes em queratinócitos transfectados com moléculas precursoras (PreMiR) e transfectadas com o controle negativo da transfecção. Controle: células cultivadas sem a presença de precursores. As diferenças de expressão entre células transfectadas e controles são significativas (* $p < 0.05$, *Student's t test*).

5.6 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência e citometria de fluxo

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados com o marcador de proliferação celular Ki67, para a linhagem celular SCC25 e para os queratinócitos, após confirmação da super-expressão do miR-1, miR-7, miR-10b e miR-196a. As Figuras 5.13 e 5.15 ilustram alguns ensaios e os gráficos apresentados nas Figuras 5.14 e 5.16 resumem os resultados. A proteína Ki67 encontra-se expressa em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0, ou seja, em células quiescentes. A super-expressão de miR-7, miR-10b e miR-196a, mas em particular a super-expressão de miRNA10b e miRNA-196A, apresentou impacto significativo sobre a progressão do ciclo celular, uma vez que após 72h horas do ensaio de transfecção encontrávamos sempre uma porcentagem menor de células expressando a proteína Ki67 nas culturas de células que super-expressavam miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a. Interessante notar que não havia impacto no número de células contadas, ou na morfologia celular, indicando um efeito ainda bastante precoce na cultura.

Por citometria de fluxo, avaliamos a distribuição das células que super-expressavam os miRNAs, bem como os seus respectivos controles, quanto a fase do ciclo celular. Observamos que na cultura dos controles havia uma porcentagem inferior de células em G0/G1 (55%) quando comparadas com as células 10b e 196a (60- 64%); também observamos que em controles havia uma porcentagem superior de células em G2/M (10,1%) quando comparadas com as células super-expressando os miRNAs (4,4 – 5%). Apesar de pouco expressivos em termos estatísticos, estes resultados confirmam que a super-expressão destes 2 miRNAs interferem na proliferação das células, conforme observado através da detecção de Ki67. A Figura 5.17 ilustra os resultados para miR-10b e miR-196a.

Figura 5.13 - Representação de um campo visual do microscópio para avaliação da proliferação celular por imunofluorescência (detecção de Ki67) em SCC25 após transfecção com precursores de miRNAs. A Ki-67, uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, foi detectada em verde (FITC), e o núcleo celular foi identificado por DAPI, com marcação em azul. (A,B,C) Controle Negativo; (D,E,F) transfectados com precursor do miR-1; (G,H,I) transfectados com precursor do miR-7; (J,K,L) transfectados com precursor do miR-10b; (M,N,O) transfectados com precursor do miR-196a. Aumento: 40x

Figura 5.14 - Avaliação da porcentagem de células SCC25 em proliferação (identificadas por detecção de Ki67) após super-expressão de miR-1, miR-7, miR-10b e miR-196a, em comparação com os controles negativos de transfeccção. Significância estatística: * $p < 0.001$ (*Student's t-test*)

Figura 5.15 - Representação de um campo visual do microscópio para avaliação da proliferação celular por imunofluorescência (detecção de Ki67) de queratinócitos após transfecção com precursores de miRNAs. A Ki-67, uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, foi detectada em verde (FITC), e o núcleo celular foi identificado por DAPI, com marcação em azul. (A,B,C) Controle Negativo; (D,E,F) transfectados com precursor do miR-1; (G,H,I) transfectados com precursor do miR-7; (J,K,L) transfectados com precursor do miR-10b; (M,N,O) transfectados com precursor do miR-196a. Aumento: 40x

Figura 5.16 - Avaliação da porcentagem de queratinócitos em proliferação (identificadas por detecção de Ki67) após super-expressão de miR-1, miR-7, miR-10b e miR-196a, em comparação com os controles negativos de transfecção. Significância estatística: **p<0.001; *p<0.1 (*Student's t-test*)

Figura 5.17 - Porcentagem de células SCC25 nas fases G0/G1, S e G2/M após transfecção com os miRNAs miR-10b e miR-196a

6 DISCUSSÃO

Linhagens celulares são muito utilizadas em pesquisa como modelos para o estudo de mecanismos moleculares em patologias, e em particular no estudo do câncer. Estudos recentes identificaram problemas de contaminação cruzada detectados através da caracterização por STRs realizados com linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço (Schweppe et al., 2008). O monitoramento contínuo das linhagens celulares, para fins de controle de qualidade é necessário. Este trabalho partiu, portanto, desta avaliação inicial para que conclusões subsequentes fossem confiáveis e reproduzíveis. Para as três linhagens derivadas de carcinoma de língua escolhidas para este estudo os padrões de STRs mostraram-se idênticos ao esperado, conforme dados fornecidos pela ATCC. Estes resultados não garantem que alterações genéticas decorrentes do número de passagens destas células mantidas por laboratórios de pesquisa não interfiram nos resultados encontrados, mas atestam a identidade original da linhagem e a pureza da cultura.

Estudos funcionais *in vitro* podem apresentar resultados distintos conforme as células utilizadas, uma vez que as características genéticas das linhagens associadas à expressão dos genes de interesse são desconhecidas. Torna-se portanto indispensável avaliar múltiplas possibilidades para a escolha do melhor modelo. Demonstramos aqui diferenças quanto à expressão de miRNAs entre linhagens celulares comumente utilizadas como modelos para CECp: SCC4, SCC9, SCC25 e FaDu. Diferenças comportamentais entre as linhagens abordadas neste estudo foram observadas por diversos autores. O grupo de Kim e colaboradores (2010) observou que a linhagem SCC4 apresentou menores níveis de proliferação e sobrevivência celular quando comparada às linhagens celulares SCC9 e SCC25, após tratamento com celecoxibe (uma droga anti-inflamatória). Chou e colaboradores (2004) mostrou que, em contraste com as células SCC9, a involucrina (proteína marcadora de diferenciação epidérmica) não foi induzida por hipóxia em células SCC4 pouco diferenciadas. No trabalho de Liang e colaboradores (2010) o tratamento com extrato de corais marinhos apresentou grande potencial inibitório de crescimento celular e indução de diferenciação em SCC25, diferenciação moderada em SCC9 e pouca diferenciação em SCC4. Esses estudos ressaltam a importância da escolha do modelo adequado para estudos em linhagens celulares.

Sabe-se que a expressão gênica em camada de sustentação utilizada para manutenção de queratinócitos orais não é nula: a irradiação dos fibroblastos é adequada para controlar a proliferação celular mas a ação sobre outros genes é indeterminada (Pollard; Lydersen, 1972). Apesar da pequena variação na expressão de miRNAs em BHKFL e BHK3 (Figura 5.5), identificamos expressão dos miRNAs nos fibroblastos irradiados. Consideramos, portanto, que a expressão de miRNAs em queratinócitos é melhor avaliada em condições do tipo BHK3, ou seja, em culturas confluentes.

Comparamos a expressão dos quatro miRNAs de interesse entre a cultura primária de queratinócitos e a linhagem celular imortalizada HaCaT. Esta linhagem tem sido amplamente utilizada na literatura como modelo para queratinócitos por se tratar de uma linhagem de fácil propagação e de fenótipo próximo ao normal. Identificamos diferenças importantes no padrão de expressão destes miRNAs entre as duas culturas celulares. Nossos resultados sugerem que a utilização da cultura primária, apesar da limitação do seu tempo de vida e da maior complexidade para sua manutenção em cultivo, deve ser considerada para estudos que visam resultados associados ao fenótipo celular normal.

A desregulação de genes oncogenes e supressores de tumor, além da expressão aberrante de miRNAs, têm sido relacionado ao desenvolvimento do câncer. Em um estudo anterior do nosso grupo com amostras de tumor, foi observado que o miRNA-1 e miRNA-10b apresentavam baixa expressão e o miRNA-7 e miRNA-196 apresentavam alta expressão em CECP. Outros grupos observaram o mesmo para o miRNA-1 em tumores de pulmão, fígado e próstata (Nasser et al., 2008; Datta et al., 2008; Ambis et al., 2008). O miRNA-7 apresentou alta expressão em tumores sólidos (Volinia et al., 2006). A diminuição da expressão do miRNA-10b foi observada em tumores de mama livre de metástase comparado a tumor de mama na presença de metástase (Iorio et al., 2005; Ma et al., 2007). E foi observada alta expressão do miRNA-196a em tumores de glioblastoma (Guan et al., 2010). Alguns estudos, por outro lado, relataram super-expressão do miRNA-1 e o miRNA-10b em glioblastoma e tumores de mama na presença de metástase, respectivamente (Yan et al., 2009; Ma et al., 2007), assim como baixa expressão do miRNA-7 e o miRNA-196 em tumores de Schwannoma e melanoma, respectivamente (Saydam et al., 2011; Muller; Bosserhoff, 2011). Porém, nenhum dos grupos estudou as células que foram analisadas neste trabalho. Acredita-se que

esse seja um perfil de expressão de miRNAs específico a essas células. Para os experimentos de ganho e perda de função, buscamos um agente de transfecção que apresentasse baixa toxicidade, fácil manuseio e rapidez no desenvolvimento do experimento. Para isso, utilizamos os ensaios de transfecção com um agente lipossomal. Ele possui o princípio de fundir-se a membrana sem auxílio de vírus, o que diminui a citotoxicidade do experimento, além da facilidade do seu manuseio que consiste da junção do agente transfectador com os oligonucleotídeos desejados formando um complexo, e coleta rápida dos resultados por não necessitar de plaqueamento prévio. Os resultados de citotoxicidade obtidos com os experimentos mostraram-se de fato baixo e obtivemos sucesso com as transfecções do tipo reversa. Mediante o sucesso da super-expressão e da baixa citotoxicidade desempenhadas pelo complexo de transfecção nas células, não tornou-se necessário a realização dos experimentos com outro agente transfectador.

Com relação aos ensaios de inibição, utilizamos oligonucleotídeos do tipo anti-senso capazes de ligação à molécula de miRNA, com seu conseqüente bloqueio. O desenho dos experimentos foi semelhante aos realizados para a super-expressão, com taxas de citotoxicidade também muito baixas. O fato de não ter sido possível detectar a inibição do miRNA, ou o aumento da expressão do seu alvo, pode ser conseqüência do efeito temporário desta inibição. Talvez não tenhamos sido capazes de detectar a inibição a tempo, mas não podemos descartar a possibilidade de que a inibição não tenha sido suficiente para poder ser detectada. Continuaremos a trabalhar para adequar a tecnologia para este fim, mas avaliaremos, no futuro, outras alternativas.

Alguns estudos funcionais para miRNAs foram realizados com células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. No estudo de Li e colaboradores (2009) foi observado que a inibição de miRNA-21 induziu apoptose em linhagens celulares de carcinoma de língua. Já Wong e colaboradores (2008) demonstraram que linhagens de carcinoma de língua que passaram a super-expressar miR-133a/b em estudo funcional apresentaram menores taxas de proliferação e aumento de apoptose. Uma revisão recente destaca a importância dos miRNAs para o câncer de cabeça e pescoço, bem como estudos funcionais realizados em linhagens celulares (Tran et al., 2010). Nossos resultados indicam que o impacto da super-expressão ou da inibição da expressão de um determinado

miRNA pode variar de acordo com a célula utilizada como modelo de estudo, podendo interferir, portanto nas conclusões obtidas.

A transfecção com precursores do miRNA-1, miRNA-7, miRNA-10b e miRNA-196a aumentou a expressão destes miRNAs tanto em linhagens celulares quanto queratinócitos derivados de cultura primária. Alguns trabalhos já observaram o sucesso da super-expressão de miRNAs em linhagens de câncer (Nasser et al., 2008; Duan et al., 2010; Lim et al., 2005; Nohata et al., 2011a; Lee et al., 2011; Xiong et al., 2011; Tran et al., 2010; Luthra et al., 2008).

Neste estudo, os resultados mostraram que o ganho de função do miRNA-1 em queratinócitos manteve a taxa de proliferação celular inalterada. Por outro lado, a super-expressão de miRNA-10b e miRNA-196a tanto em queratinócitos como na linhagem SCC25 parece ter um impacto importante na proliferação celular, uma vez que o número de células de G0 era significativamente maior após a super-expressão destes genes. Torna-se necessária a realização de estudos adicionais para a compreensão dos mecanismos por trás desta ação sobre a proliferação celular. Microarranjos de DNA podem ser soluções interessantes para a compreensão dos processos desregulados com a super-expressão destas moléculas e vêm sendo amplamente utilizados para este fim.

Os miRNAs contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer controlando a expressão de genes alvos. Por conta disso, buscamos avaliar genes alvos que participassem de vias oncogênicas. Buscamos, *in silico*, genes alvo para os miRNAs aqui estudados, mas escolhemos avaliar a expressão de genes previamente estudados na literatura e, portanto, com maiores chances de realmente serem regulados pelos miRNAs estudados. Em todos os casos, o número de alvos preditos por algoritmos matemáticos é enorme quando comparado ao número de alvos efetivamente validados, e os alvos preditos nem sempre são os mesmos quando consideramos mais de um algoritmo de predição. Isso se deve ao fato de que esses programas ainda não apresentam eficiência adequada para a predição de interações miRNA-mRNA, e a complexidade do sistema de regulação.

Os genes preditos como alvos para os miRNAs avaliados neste trabalho ainda são pouco estudados no contexto de CECP. Porém, a seleção destes alvos foi baseada na confirmação de sua ação em processos relacionados com o câncer. Conseguimos observar uma possível ação dos miRNAs super-expressos sobre os

alvos estudados em linhagem SCC25 para miRNA-1 (*MET*) e miRNA-10b (*KLF4*), e em queratinócitos orais para miRNA-10b (*HOXD10*).

A super-expressão do miRNA-1 e a redução significativa da expressão do gene alvo *MET* em células de câncer de pulmão (Nasser et al., 2008), sugeriu que esse miRNA desempenha importante papel funcional na patogênese da doença, uma vez que *MET* (fator de transcrição epitelial mesenquimal) é um proto-oncogene que está frequentemente super-expresso em cânceres humanos.

Da mesma maneira, o gene *KLF4* foi anteriormente confirmado como alvo do miRNA-10b, pelo estudo de ganho-de-função em linhagem de cancer de esôfago (Tian et al., 2010). *KLF4* (do inglês, Kruppel like factor 4) é uma proteína que pertence a família de fatores de transcrição Kruppel, que desempenha papel na regulação do ciclo celular, diferenciação, resposta a danos no DNA e inibição por contato (Shields et al., 1996; Zhang et al., 2000). *KLF4* tem função supressora de tumor e a perda da expressão deste gene tem sido observada em alguns cânceres, incluindo coloretal, estômago e esôfago (McConnell et al., 2007). O gene *KLF4* também regula a expressão de p21 e p53 (Tian et al., 2010).

O *HOXD10* é gene alvo confirmado por estudo de ganho-de-função para miRNA-10b em linhagem de câncer de mama. *HOXD10* codifica um fator de transcrição com domínio homeobox de ligação ao DNA e está relacionado ao desenvolvimento embrionário e processos neoplásicos (Ma et al., 2007). Um estudo recente destaca o papel de miRNA-10b na proliferação celular em câncer, sendo um dos mecanismos discutidos a regulação de *HOXD10* (Gabriely et al., 2010).

Quando a complementariedade entre miRNA e sítio alvo é completa, o silenciamento do gene é eficaz e ocorre através da degradação da molécula de mRNA (Yekta et al., 2004). Entretanto, a maioria dos alvos preditos em animais é parcialmente complementar e nem sempre será possível observar diferenças nos níveis de expressão gênica, e sim nos níveis protéicos (Jackson; Standart, 2007). Como a análise de proteínas não fazia parte do escopo deste projeto, estas análises serão realizadas em experimentos futuros, visando conclusões mais completas sobre os efeitos destes miRNAs.

7 CONCLUSÕES

- O cultivo de queratinócitos orais e células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço adotado foi adequado para fornecer células em quantidade e qualidade suficientes para o estudo.
- Obtivemos sucesso com a metodologia de transfecção para super-expressão de miRNAs em queratinócitos orais derivados de cultura primária, e em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço.
- A inibição de miRNAs através de transfecção reversa e utilização de oligonucleotídeos do tipo anti-senso não foi eficaz. Novos métodos serão avaliados no futuro com o intuito de padronizarmos uma técnica complementar ao ganho de função gênica.
- A super-expressão de miR-10b e miR-196a teve impacto significativo sobre a progressão do ciclo celular tanto em linhagem SCC25 como em queratinócitos orais, uma vez que um número significativamente maior de células de G0 foi observado após a super expressão destas moléculas.
- Genes alvo para os miRNAs aqui estudados foram selecionados a partir de dados da literatura, e foi observada uma possível ação de miRNA-1 sobre *MET* e de miRNA-10b sobre *KLF4* em linhagem SCC25, e miRNA-10b sobre *HOXD10* em queratinócitos orais.

REFERÊNCIAS

Alston-Roberts C, Barallon R, Bauer S, Butler J, Capes-Davis A, Dirks W, Elmore E, Furtado M, Kerrigan L, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Steuer AF, Storts DR, Sykes G, Taraporewala Z, Thomson J. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):441–8.

Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F. Genomic Profiling of MiRNA and Messenger RNA Reveals Deregulated MicroRNA Expression in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 2008;68(15): 6162–70.

Barnes L, Verbin R, Guggenheimer J. Cancer of the oral cavity and oropharynx. Em Barnes L (ed): *Surgical Pathology of the Head and Neck*, 2001;2:370-438.

Basu R, Mandal S, Ghosh A, Poddar TK. Role of tobacco in the development of head and neck squamous cell carcinoma in an eastern Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008;9(3):381-6.

Benassi L, Marconi A, Seignani C, Vaschieri C, Zambruno G. Metodiche di coltura di cheratinociti umani normali. In: Zambruno G, Canceda R, De Luca M, Andreassi L. *Coltura di cheratinociti umani normali e loro applicazione. Workshop di biologia cellulare e immunologia della cute*. Modena: Università deli Studi di Modena; 1993. p. 5-23.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005;114:806-16.

Chou S-C, AzumaY, Varia M A and Raleigh J A. Evidence that involucrin, a marker for differentiation, is oxygen regulated in human squamous cell carcinomas. *British Journal of Cancer*. 2004;90:728–35.

Chung GE, Yoon JH, Myung SJ, Lee JH, Lee SH, Lee SM, Kim SJ, Hwang SY, Lee HS, Kim CY. High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2010;23(1):113-9.

[†] De acordo com o Estilo Vancouver.

Coló AE, Simoes AC, Carvalho AL, Melo CM, Fahham L, Kowalski LP, Soares FA, Neves EJ, Reis LF, Carvalho AF. Functional microarray analysis suggests repressed cell-cell signaling and cell survival-related modules inhibit progression of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med Genomics*. 2011;4-33.

Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Schmittgen TD, Ghoshal K, Jacob ST. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 2008;68:5049–58.

Duan Z, Choy E, Nielsen GP, Rosenberg A, Iafrate J, Yang C, Schwab J, Mankin H, Xavier R, Hornicek FJ. Differential expression of miRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. *J Orthop Res*. 2010; 28(6):746-52.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.

Farshadpour F, Kranenborg H, Calkoen EV, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ, Terhaard CH. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: Influence of smoking and drinking. *Head Neck*. 2011;33(6):817-23.

Feber A, Xi L, Pennathur A, Gooding WE, Bandla S, Wu M, Luketich JD, Godfrey TE, Litle VR. MicroRNA prognostic signature for nodal metastases and survival in esophageal adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2011;91(5):1523-30.

Ferlay J, Bray F, Pissani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0 IARC Cancer Base No5 (IARC Press, Lyon 2001).

Fitch DH, Bugaj-Gaweda B, Emmons SW. 18S ribosomal RNA gene phylogeny for some Rhabditidae related to Caenorhabditis. *Mol Biol Evol*. 1995;12(2):346-58.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.

Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, Ligon KL, Kesari S, Esau C, Stephens RM, Tannous BA, Krichevsky AM. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res*. 2011;71(10):3563-72.

Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S, Shu Y. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(6):399-408.

Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, Rodrigo JP. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol.* 2004;164(1):73-9.

Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, Homer J, Corbridge R, Cox G, West CM, Ragoussis J, Harris AL. hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer.* 2010;116(9):2148-58.

Greenman J, Homer JJ, Stafford N. Markers in cancer of the larynx and pharynx. *Clin Otolaryngol.* 2000;25:9-18.

Griffiths-Jones S, JG Russell, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research.* 2005;34(1):140-44.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 2007;27(1):91-105.

Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K, Sasaki T. MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 2010;16(16):4289-97.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2010. [17 out. 2011]. Disponível em: URL: <http://www.inca.org.br>.

Iorio V M, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MiRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(16):7065-70.

Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE.* 2007;2007(367):re1. Review.

Jemal A, Siegel R, Murray T, XU J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:34-66.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277-300.

Junn E, Lee KW, Jeong BS, Chan TW, Im JY, Mouradian MM. Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):13052-7.

Kawasaki H, Taira K. MicroRNA-196 inhibits HOXB8 expression in myeloid differentiation of HL60 cells. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2004;(48):211-2.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* 2008;68(10):3566-72.

Kim V N. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* 2004;14(4):156-9.

Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res.* 2009;24(5):816-25.

Kim Y-Y, Lee E-J, Kim Y-K, Kim S-M, Park J-Y, Myoung H and Kim M-J. Anti-cancer effects of celecoxib in head and neck carcinoma. *Molecules and Cells.* 2010;29(2):185-94.

Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37(5):495-500.

Laganà A, Russo F, Sismeiro C, Giugno R, Pulvirenti A, Ferro A. Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material. *PLoS One.* 2010;5(6):e11166.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.

Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs E, Rossing M, Specht L, Therkildsen MH, Nauntofte B, Dabelsteen S, von Buchwald C. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*. 2011;104(5):830-40.

Lee Y, Yang X, Huang Y, Fan H, Zhang Q, Wu Y, Li J, Hasina R, Cheng C, Lingen MW, Gerstein MB, Weichselbaum RR, Xing HR, Lussier YA. Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(4):e1000730.

Lee KM, Choi EJ, Kim IA. miRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling. *Radiother Oncol*. 2011;101(1):171-6.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-798.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15–20.

Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zeng C, Yao Y, Zhang P, Song E. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):3998-4008.

Liang C-H, Wang G-H, Hung WJ, Lin R-J, Cheng D-L, Cho T-H. Apoptosis effect of *Sinularia leptoclados*, *S. depressan* and *S. inflata* extracts in human oral squamous cell carcinomas. *J Taiwan Inst of Chem Engineers*. 2010;41(1):86-91.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some MicroRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-73.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-38.

Luo X, Xiao J, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions. *J Cell Physiol.* 2007;212(2):358-67.

Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B, Wang Z. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20045-52.

Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, Broaddus RR, Rashid A, Albarracin CT. MiRNA-196a targets annexin A1: a miRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene.* 2008;27:6667–78.

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* 2007;449:682-88.

Maru DM, Singh RR, Hannah C, Albarracin CT, Li YX, Abraham R, Romans AM, Yao H, Luthra MG, Anandasabapathy S, Swisher SG, Hofstetter WL, Rashid A, Luthra R. MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1940-8.

Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, Weymuller EA, Jr, Maronian NC, Zhao LP, Chen C. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer.* 2002;95:1482–94.

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2012. <http://www.inca.gov.br/inca/>.

McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays.* 2007;29(6):549-57. Review. Erratum in: *Bioessays.* 2007 Sep;29(9):946.

Mueller DW, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. *Int J Cancer.* 2011;129(5):1064-74.

Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, Wang B, Suster S, Jacob ST, Ghoshal K. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 2008;283(48):33394-405.

Nguyen HT, Dalmasso G, Torkvist L, Halfvarson J, Yan Y, Laroui H, Shmerling D, Tallone T, D'Amato M, Sitaraman SV, Merlin D. CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1733-47.

Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, Fuse M, Kikkawa N, Yoshino H, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Okamoto Y, Seki N. miR-1 as a tumor suppressive miRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2011a;2(1-2):29-42.

Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Sakurai D, Fujimura L, Kawakami K, Chiyomaru T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumor suppressive miRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Hum Genet*. 2011b;56(8):595-601.

Oldroyd NJ, Urquhart AJ, Kimpton CP, Millican ES, Watson SK, Downes T, Gill PD. A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. *Electrophoresis*. 1995;16(3):334-7.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*. 2000;355(9208):949-55.

Pollard EC, Lydersen BK. The action of ionizing radiation on the synthesis of RNA and two inducible enzymes in *Escherichia coli*. *Radiat Res*. 1972;50(2):293-300.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*. 2008;68(20):8195-200.

Saydam O, Senol O, Würdinger T, Mizrak A, Ozdener GB, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Krichevsky AM, Saydam N, Brenner GJ, Breakefield XO. miRNA-7 attenuation in Schwannoma tumors stimulates growth by upregulating three oncogenic signaling pathways. *Cancer Res*. 2011;71(3):852-61.

Schweppe RE, Kloppner JP, Korch C, Pugazhenth U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4331–41.

Severino P, Alvares AM, Michaluart P Jr, Okamoto OK, Nunes FD, Moreira-Filho CA, Tajara EH; Head and Neck Genome Project GENCAPO. Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites. *BMC Res Notes*. 2008;1:113.

Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*. 2002;2:37.

Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem*. 1996;271(33):20009-17.

Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):219-230.

Sun R, Fu X, Li Y, Xie Y, Mao Y. Global gene expression analysis reveals reduced abundance of putative microRNA targets in human prostate tumours. *BMC Genomics*. 2009;10:93.

Takane K, Fujishima K, Watanabe Y, Sato A, Saito N, Tomita M, Kanai A. Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals. *BMC Genomics*. 2010;11:101.

Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z, Huang G. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J*. 2009;50(3):377-87.

Tian Y, Luo A, Cai Y, Su Q, Ding F, Chen H, Liu Z. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2010;285(11):7986-94.

Tran N, O'Brien CJ, Clark j, Rose B. Potential role of micro-RNAs in head and neck tumorigenesis. *Head Neck*. 2010;32(8):1099-111.

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1116-27.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambros S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-61.

Wong TS, Liu XB, Chung-Wai AH, Po-Wing AY, Wai-Man R, Ignace W W. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through miRNA profiling. *Int J Cancer*. 2008;123(2):251–7.

Wulfkühle JD, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF 3rd, Liotta L. Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2003;532:59-68. Review.

Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, Qu J, Tu L. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29596-604.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304(5670):594-6.

Yekta S, Tabin CJ, Bartel DP. MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nat Rev Genet*. 2008;9(10):789-96. Review.

Xiong S, Zheng Y, Jiang P, Liu R, Liu X, Chu Y. MiRNA-7 Inhibits the Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells through Targeting BCL-2. *Int J Biol Sci*. 2011;7(6):805-14.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007; 302:1-12.

Ziober AF, Patel KR, Alawi F, Gimotty P, Weber RS, Feldman MM, Chalian AA, Weinstein GS, Hunt J, Ziober BL. Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5960–71.

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Odontologia

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CEP/FOUSP/OF.174/11

DECLARAÇÃO

Informamos que diante do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein – Processo CEP/Einstein nº09/1101 **CAAE:0115.0.028.000-09**, estamos cientes da aprovação em 12 de setembro de 2011, do projeto de pesquisa: "**Caracterização de redes de regulação de microRNAs associados ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço por microarrays e estudos funcionais em cultura de células**", de responsabilidade dos Pesquisadores Flávia Maziero Andreghetto e Renata Machado Soares Dra. Mônica Beatriz Mathor, Dra. Maria de Fátima Guarizo Klingbeil, Prof. Dr. Décio Dos Santos Pinto Júnior e Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, sob orientação da Dra. Patrícia Severino, não havendo nenhuma oposição por parte deste CEP, com relação a sua realização.

São Paulo, 27 setembro de 2011.

Profa. Dra. **Marcia Turolia Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Israelita Albert Einstein

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 25 de junho de 2009

Processo CEP/Einstein nº 09/1101

CAAE: 0081.0.028.000-09

Título: Caracterização de redes de regulação de microRNAs associados ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço por microarrays e estudos funcionais em cultura de células.

Investigador Responsável: Patrícia Severino

Ilma. Sra.

Patrícia Severino

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein **analisou e aprovou** o projeto de pesquisa supracitado, bem como a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aproveitamos a oportunidade para orientar o pesquisador sobre os seguintes itens:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2d).
- O Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res.CNS 196 Item III. 3z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. item III.2.e).
- Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em novembro de 2009.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Pinus
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

1. Resumo apresentado no Signaling 2010 – Cell Death, Cancer and the Immune System

MICRORNA-7 AND CELL-SIGNALING DEREGLATION IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Renata Machado Soares¹, Flavia Maziero Andreghetto¹, Holger Brueggemann², Flavio Borges³, Ana Carolina Bernardini Moulatlet¹, Pedro Michaluart⁴, Marcos Brasilino de Carvalho⁵, Victor Wunsh-Filho³, GENCAPO⁶, Eloiza Helena Tajara⁷, Patricia Severino¹

¹ Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil; ² Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany; ³ Faculdade de Saude Publica, Universidade de Sao Paulo, Brazil; ⁴ Hospital das Clinicas, Universidade de Sao Paulo, Brazil; ⁵ Hospital Heliópolis, Sao Paulo, Brazil; ⁶ GENCAPO: Brazilian Head and Neck Genome Project; ⁷ Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto, Brazil.

Introduction: MicroRNAs are endogenous, noncoding RNAs that regulate gene expression by degrading or destabilizing the RNA message or by inhibiting protein translation. They are believed to integrate networks wherein variation in the expression level of one microRNA could set up broad changes involving distinct pathways. MiR-7 has been shown to regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, a matter of great interest to the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) clinical setting. Its activation is one of the mechanisms for resistance to radiotherapy and chemotherapy.

Objective: Evaluate the possible role of miR-7 in the regulation of signaling pathways associated with HNSCC.

Methodology: Tumor and cancer free surgical margins were collected from patients submitted to surgical resection of primary tumor. The expression level of miR-7 in tumor versus surgical margins was evaluated by means of quantitative real time-PCR. MiR-7 gene targets were selected by current computational approaches to microRNA target prediction and their impact in HNSCC was studied using Gene Ontology term enrichment analysis and Protein Information Resource.

Results and Conclusions: MiR-7 expression is up-regulated in HNSCC versus surrounding tissue. Most predicted miR-7 gene targets are involved in transcription regulation, and many are phosphoproteins. Modification by phosphorylation is a key mechanism in cancer, causing and sustaining or at times preventing the disease. We suggest that the deregulation of miR-7 in HNSCC could impact a broad network of

pathways, with EGFR signaling being just one of them. An in depth understanding of the cross talk between these pathways is needed for the development of novel strategies for targeting multiple molecular components that will eventually lead to more effective treatment of this disease.

Financial Support: FAPESP (05/51467-0 and 09/04166-5) and Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IEP.PE.08-0125).

2. Resumo apresentado no International Cell Death Society Symposium, 2011 – Apresentação Oral

MICRORNA-10B IS DOWN-REGULATED IN HEAD AND NECK CANCER AND COULD IMPACT CANCER DEVELOPMENT THROUGH KLF4 SIGNALING, Andreghetto FM*(1,2), Soares RM(1), Klingbeil MFG(2), Pinto-Junior DS(2), Nunes FD(2), Severino P@ (1,2), (1) Center for Experimental Research, Albert Einstein Research and Education Institute, Sao Paulo, Brazil; (2) School of Dentistry, Department of Oral Pathology, University of Sao Paulo, Brazil.

MicroRNAs belong to a class of endogenous small noncoding RNAs that regulate gene expression through targeting mRNAs. Current evidence implicates aberrant microRNA expression patterns in human malignancies. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) constitutes the sixth most common malignancy worldwide and little progress has been made in treating this disease during the past decade. The role of microRNAs in HNSCC is largely unknown. In a previous study we detected down-regulation of miR-10b in HNSCC samples compared with tumor-free tissue. MiR-10b has been implicated in tumor progression, and recently in cell death: the up-regulation of miR-10b contributes to adipose tissue-derived stem cell apoptosis. In this study we over-expressed miR-10b in a squamous cell carcinoma cell line using synthetic precursors and assessed the result using gene expression analysis by means of DNA microarray. Apoptosis-related genes were among the most deregulated. KLF4, a member of the Krüppel-like factor family of transcription regulators, is a validated target for miR-10b and was down-regulated in cells over-expressing miR-10b. KLF4 seems to target key cell cycle regulators, such as p21 and p53, through complex mechanisms, and its role as oncogene or tumor

suppressor depends on the context. Recently associated with poor prognosis in HNSCC, we believe that a better understanding of KLF4 regulation, including the study of related microRNAs, could help targeting this oncogenic pathway for the treatment of this disease. Financial support: FAPESP 2009/04166-5

ANEXO D – Publicação científica

einstein

São Paulo, 15 de agosto de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o artigo intitulado “Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e em cultura primária de queratinócitos orais” de autoria de Flavia Maziero Andreghetto, Maria Fatima Guarizo Klingbeil, Renata Machado Soares, Roberta Sitnik, Déciodos Santos Pinto Junior, Monica Beatriz Mathor, Fabio Daumas Nunes e Patricia Severino foi aceito para publicação na revista **einstein**.

Conceição Aparecida de Mattos Segre
Editora Executiva da revista **einstein**