



2004

Expressão dos microRNAs let-7a e miR-21 em Carcinomas Epidermóides e Adenocarcinomas do Pulmão

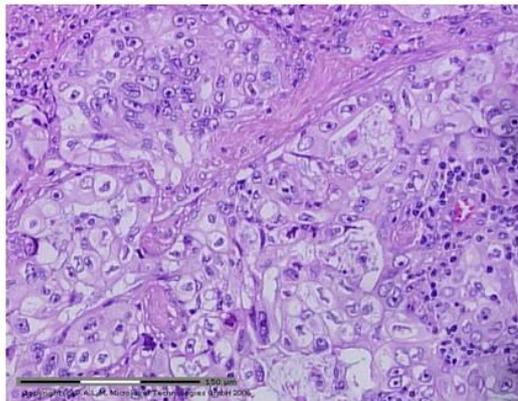
Catarina S.P. Gomes



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Expressão dos microRNAs let-7a e miR-21 em Carcinomas Epidermóides e Adenocarcinomas do Pulmão



Catarina Sofia dos Santos Pedreira Gomes

2011



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Expressão dos microRNAs let-7a e miR-21 em Carcinomas Epidermóides e Adenocarcinomas do Pulmão

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Maria da Graça dos Santos Pratas do Vale (Universidade de Coimbra, FCTUC) e do Professora Doutora Lina Maria Rodrigues Carvalho (Universidade de Coimbra, FMUC)

Catarina Sofia dos Santos Pedreira Gomes

2011

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado decorre de uma experiência única que passou pelo patamar profissional, sem dúvida, mas pela componente humana também. Como tal, agradeço:

Às orientadoras deste projecto, Professora Doutora Maria da Graça dos Santos Pratas Vale que aceitou ser a minha orientadora interna (pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) e que juntamente com a, orientadora externa Professora Doutora Lina Carvalho (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), pela oportunidade de desenvolver a tese, pelo apreço e dedicação na sua orientação, pelo apoio, a partilha do saber, disponibilidade e amizade que sempre me dispensaram

À Dra. Maria Silva apoio técnico e científico, pelas valiosas contribuições para o trabalho, pela disponibilidade sempre manifestada, pela confiança que depositou em mim, pela paciência e pela amizade

Ao Instituto de Anatomia Patologia da Universidade e a toda a sua equipa, pelo à-vontade na adaptação, pelas excelentes condições e ambiente proporcionado, pela ajuda técnico-científica.

Ao Dr. Paulo Santos, Dra. Isabel Velada e pela sua ajuda na disponibilização do equipamento técnico para a realização da análise de expressão genética e consequente interpretação essencial para a realização deste projecto.

À Professora Doutora Isabel Luci, coordenadora do Mestrado em Biologia pela disponibilidade e paciência demonstrada ao longo desta etapa.

A todos os colegas, amigos e professores que desde o pré-escolar até hoje que fizeram parte da minha vida partilhando todo o seu saber académico e empírico.

À família, sem ela não estaria certamente aqui. Por isso agradeço às minhas Tias Paula e Irene e prima Joana pelos miminhos que me mandavam aos fim-de-semana e que adoçaram os meus dias.

Agradeço também ao meu padrinho de baptismo Dr. Carlos Guerra pelo apoio e sorrisos demonstrados quando teve conhecimento que uma das suas afilhadas tinha escolhido elaborar pesquisa no campo da oncobiologia, (área que também lhe suscita interesse a nível profissional).

E *"last but not least"* agradecer o apoio dado ao longo desta etapa aos meus pais Pedro Gomes e Teresa Gomes e irmão Filipe Gomes, pelo apoio incondicional, por proporcionarem-me excelentes condições de estudo, permitindo-me assim explorar novos caminhos.

Índice Geral

Abreviaturas e Siglas	1
Resumo	3
Abstract.....	4
Capítulo 1 - Introdução.....	5
1.1. Epidemiologia do cancro do pulmão.....	6
1.2. Biogénese e Mecanismos de Acção dos microRNAs	7
1.3. microRNAs no carcinoma do pulmão	9
1.4. Objectivos	10
Capítulo 2 – Material e Métodos	11
2.1. Material.....	12
2.2. Métodos	17
2.2.1. Selecção das amostras.....	17
2.2.2. Microdissecção a Laser (MDL)	17
2.2.3. Extracção de RNA	19
2.2.4. Transcrição Reversa.....	19
2.2.5. Quantificação de RNA.....	20
2.2.6. Primers.....	20
2.2.7. qPCR	20
2.2.8. Análise Estatística	21

Capítulo 3 – Resultados	22
3.1.1. Expressão de miR-21	23
3.1.2. Análise da Expressão de Let7a	26
Capítulo 4 – Discussão/Conclusão	28
Capítulo 5 – Perspectivas Futuras Para os Estudos dos miRNA	33
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas	35

Índice de Figuras

Figura 1 - Lista dos dez tipos de cancro – novos casos estimados e mortes estimadas por cancro - EU, 2007.....	6
Figura 2 - Biogénese do miRNA.....	8
Figura 3 – Distribuição do Género na Amostra de acordo com o Tipo Histológico.....	16
Figura 4 – Gráfico Da Distribuição de Idades na Amostra	16
Figura 5 – Sistema de microdissecção a laser computadorizado PALM	17
Figura 6 – Dissecção de Tumor com Sistema de microdissecção a laser computadorizado PALM	18
Figura 7 – kit <i>miRNeasy FFPE Kit</i> (Qiagen, Hilden, Germany) para tecidos parafinados	19
Figura 8 – Fluxograma do Protocolo Experimental do RT-qPCR em Tempo Real.....	21
Figura 9 – Expressão de miR-21	24
Figura 10 – Análise dos níveis de expressão do miR-21 em carcinoma epidermóide..	25
Figura 11 – Perfil de expressão de miR-21 em NSCLC (escala logarítmica).....	26

Índice de Tabelas

Tabela I - Classificação TNM/2010	12
Tabela II - Agrupamento TNM 7ª edição 2009 – <i>Lung Cancer</i> /IASLC	14
Tabela III – Caracterização Clínica e Patológica da Amostra em Estudo.	15
Tabela IV – Média das Idades e Género dos Casos em Estudo	15
Tabela V - Análise de comparação das classificações patológicas resultantes da expressão de miR-21	25
Tabela VI - Análise de comparação das classificações patológicas resultantes da expressão de let7a.....	27

Abreviaturas e Siglas

miRNA – microRNA

miR21 - microRNA 21

let-7a - *lethal-7*

3'-UTR - (*Untranslated Region*) Região 3' transcrita e não traduzida

CE – Carcinoma Epidermóide

ADC – Adenocarcinoma

Cq – Ciclo de quantificação

FFPE - tecidos fixados em formol e inclusos em parafina

MDL – Microdessecção a laser

mRNA –RNA mensageiro

PALM - *Photoactivated localization microscope*

pre-miRNA –microRNA precursor

pri-miRNA - microRNA primario

qRT-PCR – *quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction*; Reacção em cadeia pela polimerase em tempo real

Ran-GTP - *RAs-related Nuclear protein Guanosine-5'-triphosphate dependent*

RISC - RNA-induced silencing complex

RNA – Acido ribonucleico

RNAi - Ácido ribonucleico interferência

stRNA – *Small temporal RNA*

poli(A) – poliadenina

TNM – Tumor primário, Nódulos linfáticos regionais, Metástases à distância

TMA - *Tissue MicroArrays*

WHO – World Health Organization

Resumo

O cancro do pulmão é a principal causa de morte por cancro no Mundo, com uma elevada taxa de incidência nos continentes Europeu e Americano. Esta doença apresenta uma reduzida taxa de sobrevivência sendo geralmente diagnosticada em estádios avançados. Sendo por isso necessário aprofundar o conhecimento sobre este tipo de cancro e otimizar as técnicas de diagnóstico e prognóstico e possíveis terapias alvo.

Os microRNAs são compostos por pequenos RNAs que podem actuar nas vias de sinalização podendo conduzir ao silenciamento dos seus genes-alvo. Encontram-se diferencialmente expressos em neoplasias humanas, mas o seu papel em estádios específicos de progressão maligna ainda é desconhecido.

O objectivo deste estudo foi identificar perfis de expressão microRNA (miRNA) em carcinomas epidermóides (CE) e adenocarcinomas (ADC) do pulmão, a fim de tentar compreender o seu papel na tumorigénese. Para o efeito, foi analisada a expressão de microRNA let7a e miR-21 por qRT-PCR em 12 tumores primários de pulmão e respectivos nódulos linfáticos metastáticos.

Foi possível verificar o aumento da expressão de miR-21 em ambos, adenocarcinomas e carcinomas epidermóides sendo esta mais relevante em metástases dos carcinomas epidermóides. A expressão do let7a não se mostrou significativa do ponto de vista estatístico. Os nossos resultados são preliminares podendo os perfis de expressão de miRNA serem importantes nos tipos de carcinomas do pulmão analisados, sendo necessários mais estudos futuros.

Palavras-Chave: miRNA, cancro do pulmão, miR-21, let-7a

Abstract

Lung cancer is the leading cause of death from cancer worldwide and has one of the highest incidence in Europe and America. This disease presents a low survival rate (about 5 years) and is usually diagnosed in advanced stages. Hence it becomes important to improve the knowledge about this cancer and optimize diagnosis and prognosis techniques, as well as target therapies.

MicroRNA (miRNA) are a class of small cellular RNA, acting as agents of the interference pathway and can lead to silencing of their cognate target genes. They are differentially expressed in human cancers and the precise role of microRNA in specific stages of malignant progression is still unknown.

The aim of this study was to identify microRNA expression profiles in Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinomas of the lung in order to try to understand its role in tumorigenesis. For that purpose, we performed a microRNA qRT-PCR in 12 primary lung tumors and their related metastatic lymph nodes.

It was possible to identify an increased expression of miR-21 in both Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinoma with relevance also in the metastases from Squamous Cell Carcinoma. Concerning let-7a there were no statistically valued results, our results are preliminary and miRNA expression profiles can be important in the studied types of lung carcinoma needing further studies.

Key-words: miRNA, lung cancer, miR-21, let-7a,

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Epidemiologia do cancro do pulmão

O cancro do pulmão representa uma das neoplasias mais frequentes a nível mundial sendo responsável pela maior taxa de mortalidade por malignidade em ambos os sexos. Apesar dos avanços registados no diagnóstico, estadiamento e tratamento do cancro do pulmão, a sobrevida global não aumentou significativamente durante as últimas duas décadas, permanecendo inferior a 15% aos 5 anos [Carvalho et al 2009].

Nos Estados Unidos, o *Cancer Statistics 2007* (Figura 1) revela-nos que o cancro do pulmão ocupa a segunda posição na lista de novos casos de cancro, tanto no sexo masculino como no sexo feminino, a seguir ao cancro da próstata e cancro da mama, respectivamente. Por sua vez, quando se analisa o número de mortes estimadas por cancro, verifica-se que o cancro do pulmão representa a principal causa de morte em ambos os sexos.

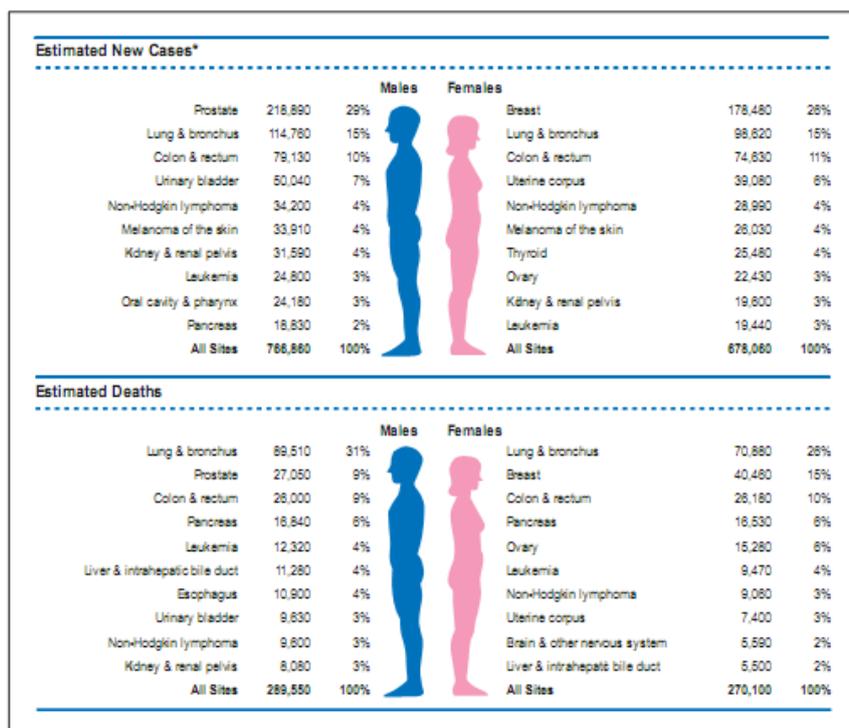


Figura 1 - Lista dos dez tipos de cancro – novos casos estimados e mortes estimadas por cancro - EU, 2007 (Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 2007, 57;43-66)

Em Portugal estima-se uma incidência de 34/100000 com 28/100000 novos casos para o homem e 6/100000 para a mulher [Carvalho et al 2009, Parente Barbara et al 2006/2007].

O tabaco é o principal factor etiológico do cancro do pulmão, sendo responsável por 85-90% dos casos dado que o fumo do tabaco apresenta na sua composição mais de 4000 substâncias químicas, das quais cerca de 100 são comprovados mutagêneos e carcinogêneos – como as nitrosaminas ou hidrocarbonetos policíclicos [Freedman et al 2008].

Para além do tabagismo, reconhecem-se como factores de risco para esta neoplasia o tabagismo passivo, a exposição ocupacional a agentes carcinogêneos, como os asbestos e o radão, a predisposição genética, factores ligados ao sexo, factores dietéticos e estados de imunossupressão [Travis *et al* 2004].

1.2. Biogénese e Mecanismos de Acção dos microRNAs

O primeiro miRNA, lin-4, foi descoberto em 1993, sendo inicialmente descrito como stRNA (*small temporal RNA*) por ser expresso de forma transiente, e regular temporalmente no desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* [Bartel et al 2004]. O mecanismo de actuação dos miRNAs, no momento de sua descoberta, foi associado à actividade antisense de lin-4 que inibia a expressão de lin-14. Entretanto, hoje reconhece-se que os miRNAs actuam ligando-se à região 3' não traduzida (UTR) dos mRNAs alvo, inibindo a tradução proteica (Figura 2).

Inicialmente; os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II formando longos transcritos primários (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli(A). O pri-miRNA é processado ainda no núcleo pela DROSHA, uma enzima RNase III, formando um

segmento de cerca de 70 nucleótidos em forma de grâncho (hairpin), precursor do miRNA (pré-miRNA). Este é exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/ Ran-GTP, onde sofre novo processamento por outra RNase III, DICER, gerando um duplex miRNA: miRNA, com 18 a 25 nucleótidos de comprimento. Em seguida, o duplex associa-se ao complexo multiproteico RISC (do inglês RNA-induced silencing complex), retendo somente a cadeia madura do miRNA, que direcciona a ligação à região 3' não traduzida dos mRNAs alvos.

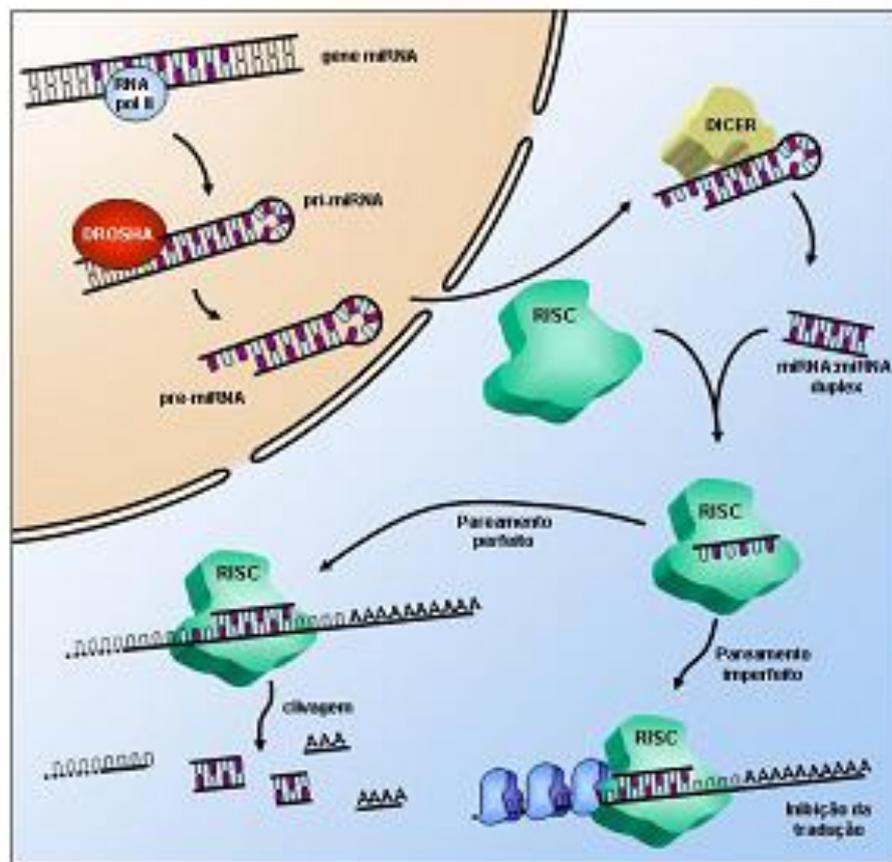


Figura 2 - Biogênese do miRNA. Após a transcrição pela enzima RNA polimerase II, o transcrito primário do miRNA (pri-miRNA) é clivado pela enzima RNase III DROSHA ainda no núcleo, gerando, assim, um transcrito menor, em forma de grâncho (pré-miRNA). O pré-miRNA é exportado até ao citoplasma e processado pela enzima DICER, gerando transcritos de cadeia dupla (miRNA: miRNA). A incorporação deste duplex miRNA:

miRNA ao complexo RISC liberta uma das cadeias do transcrito, deixando a outra incorporada ao complexo. Assim, o pareamento perfeito desta sequência madura do miRNA com o mRNA alvo provocará a degradação do mesmo. Já o pareamento imperfeito impedirá a tradução.

1.3. microRNAs no carcinoma do pulmão

A conservação dos miRNAs entre espécies animais de classes distintas, como vertebrados e ascídios, mostra um importante papel dos miRNAs nos processos biológicos como diferenciação e desenvolvimento e também nos processos patológicos como o cancro. Os miRNAs que participam de processos importantes no cancro são denominados oncomiRs [Blower et al 2008]. A alteração da expressão de um oncomiR pode contribuir para a tumorigénese basicamente de duas maneiras:

- (i) quando um oncomiR que controla um oncogene apresentar expressão reduzida ou
- (ii) quando um oncomiR que controla um gene supressor tumoral se apresentar sobre-expresso.

Um estudo recente mostrou que cerca de 50% dos miRNAs descritos em humanos estão localizados em áreas do genoma conhecidas como sítios frágeis associados ao cancro, que incluem regiões de perda de heterozigotia, ampliações e quebras cromossómicas [Gartel et al 2008].

Outros estudos abordando miRNAs no cancro mostraram uma assinatura característica de expressão de miRNAs nos tecidos tumorais em relação aos seus respectivos tecidos normais, de forma que os miRNAs se tornam eficientes marcadores para diagnóstico de tumores [Croce et al.2008]. Actualmente, o número está próximo de 1000 miRNAs descritos, indicando enorme potencialidade dos miRNAs como

ferramentas para estudo e detecção de cancro [Baffa et al. 2009]. Apesar disto, uma das grandes dificuldades do estudo dos miRNAs reside no facto de os miRNAs actuarem de forma pleiotrópica e a predição de alvos potenciais através de ferramentas de bioinformática mostrarem que um único miRNA pode regular a tradução de centenas de mRNA alvo [Grady et al 2010].

1.4. Objectivos

O objectivo principal deste projecto constituiu em correlacionar a expressão de miRNA-21 e let-7a em carcinomas epidermóides e adenocarcinomas do pulmão com as metástases ganglionares quando presentes, tendo como padrão a expressão determinada no parênquima pulmonar, em cada caso, obtido em peças cirúrgicas.

Pretendemos também interpretar os resultados obtidos como factores de carcinogénese ou alvos terapêuticos, para estudos futuros.

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1. Material

Neste estudo foram integrados 12 casos de carcinoma do pulmão dos arquivos do Serviço de Anatomia Patologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, para analisar a expressão dos miRNAs miR-21 e let-7a.

Correspondem a 5 carcinomas epidermóides e a 7 adenocarcinomas estadiados de acordo com a Tabela TNM- 7ª edição, cuja caracterização clínica e patológica dos casos que foi utilizada neste estudo se encontra sumarizada na Tabela I e II. Os casos foram histologicamente classificadas de acordo com a WHO 2004 (Tabela III, Tabela IV e Figura 3 e Figura 4).

Apesar do reduzido tamanho da amostra a idade média em que é diagnosticada a doença é muito similar à referenciada na literatura ($61,4 \pm 12,4$ anos) [Parente Bárbara 2007 e Carvalho L. et al 2009], facto explicado devido à problemática existente em detectar precocemente este tipo de cancro dado que demora alguns anos a manifestar-se. É possível observar a distribuição de idades da amostra na Figura 4.

O estágio de doença mais frequente neste estudo foi o IIB seguido do IIA.

Tabela I - Classificação TNM/2010

Tumor Primário (T)	
TX	Tumor primário não individualizado; ou tumor encontrado pela presença de células malignas na expectoração ou lavado brônquico, mas não visualizado na imagiologia ou por broncoscopia.
T0	Sem evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor ≤ 3 cm de maior comprimento, rodeado por pleura pulmonar ou visceral, sem evidência bronconscópica de invasão para além do brônquio lobar (i.e., não está no brônquio principal) *
T1a	Tumor ≤ 2 cm de maior comprimento
T1b	Tumor > 2 cm, mas ≤ 3 cm de maior comprimento.

T2	Tumor > 3 cm, mas ≤ 7 cm; ou tumor com qualquer das seguintes características (tumores T2 com estas características são classificadas de T2a se forem ≤ 5cm): <ul style="list-style-type: none"> • Envolve brônquio principal, ≥ 2 cm distalmente à crina. • Invade pleura visceral. • Associado com atelectasias ou pneumonite obstrutiva, estendendo-se à região hilar mas sem envolver completamente o pulmão
T2a	Tumor > 3 cm, mas ≤ 5 cm de maior comprimento
T2b	Tumor > 5 cm, mas ≤ 7 cm de maior comprimento
T3	Tumor > 7 cm ou que invade directamente qualquer das seguintes estruturas: <ul style="list-style-type: none"> • Parede torácica (incluindo os tumores do sulco superior), diafragma, nervo frénico, pleura mediastínica, pericárdio parietal; ou tumores do brônquio principal < 2 cm distalmente à carina mas sem envolvimento desta; associados a atelectasias ou pneumonite obstrutiva de todo o pulmão; ou nódulo(s) tumoral(ais) isolado(s) no mesmo lobo
T4	Tumor de qualquer tamanho que invade qualquer das seguintes estruturas: <ul style="list-style-type: none"> • Mediastino, coração, grandes vasos, traqueia, nervo laríngeo recorrente, esófago, corpo vertebral, carina; nódulo(s) tumoral(ais) isolado(s) noutra lobo ipsilateral
* Tumor expansivo superficial incomum, de qualquer tamanho, com componente invasivo limitado à parede brônquica, que pode estender-se proximalmente ao brônquio principal, também é classificado como T1	
Nódulos linfáticos regionais (N)	
NX	Nódulos linfáticos regionais não foram estudados
N0	Sem metástases em nódulos linfáticos regionais
N1	Metástases presentes em nódulos linfáticos ipsilaterais peribrônquicos e/ou ipsilaterais hilares e nódulos intrapulmonares, incluindo envolvimento por extensão directa.
N2	Metástases no mediastino ipsilateral e/ou nódulo(s) linfático(s) subcarineal(ais)
N3	Metástases no mediastino contralateral, hilar contralateral, escalénio ipsilateral ou contralateral, nódulo(s) linfático(s) supraclavicular(es)
Metástases à distância (M)	
MX	Metástases à distância não foram estudadas
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância
M1a	Nódulos tumorais isolados em lobo contralateral; tumores com nódulos pleurais ou derrame maligno pleural (ou pericárdico) **
M1b	Metástases à distância

** Maior parte dos derrames pleurais (ou pericárdicos) com tumores pulmonares deve-se ao tumor. Em alguns doentes, no entanto, o estudo múltiplo citopatológico de líquido pleural (ou pericárdico) é negativo para células neoplásicas, e o líquido é não hemorrágico e não é um exudato. Onde estes elementos e o raciocínio clínico definem que o derrame não está relacionado com o tumor, este deverá ser excluído como elemento de estadiamento e o doente deverá ser classificado como M0.

Tabela II - Agrupamento TNM 7ª edição 2009 – Lung Cancer/IASLC

Estadio	Subtipo TNM		
	T	N	M
Carcinoma Oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a,b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
	T4	N0,N1	M0
Estadio IIIB	T4	N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1a,b

Tabela III – Caracterização Clínica e Patológica da Amostra em Estudo.

Nº Amostra	Classificação Histológica	Classificação TNM	Estádio	Gênero	Idade
1	ADC	pT1 N1 Mx	IIA	M	53
2	ADC	pT4N1Mx	IIIB	F	52
3	ADC	pT2 N1 Mx	IIB	M	45
4	ADC	pT1a N0 Mx	IA	M	48
5	ADC	pT2 N1 Mx	IIB	F	77
6	CE	pT1 N1 Mx	IIA	M	50
7	CE	pT2 N1 Mx	IIB	M	72
8	CE	pT2 N1 Mx	IIB	M	55
9	CE	pT1 N1 Mx	IIA	M	72
10	CE	pT2 N0 Mx	IB	M	81
11	CE	pT2 N1 Mx	IIB	F	70
12	CE	pT1 N1 Mx	IIA	F	62

Tabela IV – Média das Idades e Gênero dos Casos em Estudo

Número de Pacientes	12
Gênero%	
Masculino	8 (66,7%)
Feminino	4 (33,3%)
Média ± SD da idade no momento do Diagnostico	61,4 ±12,4 anos

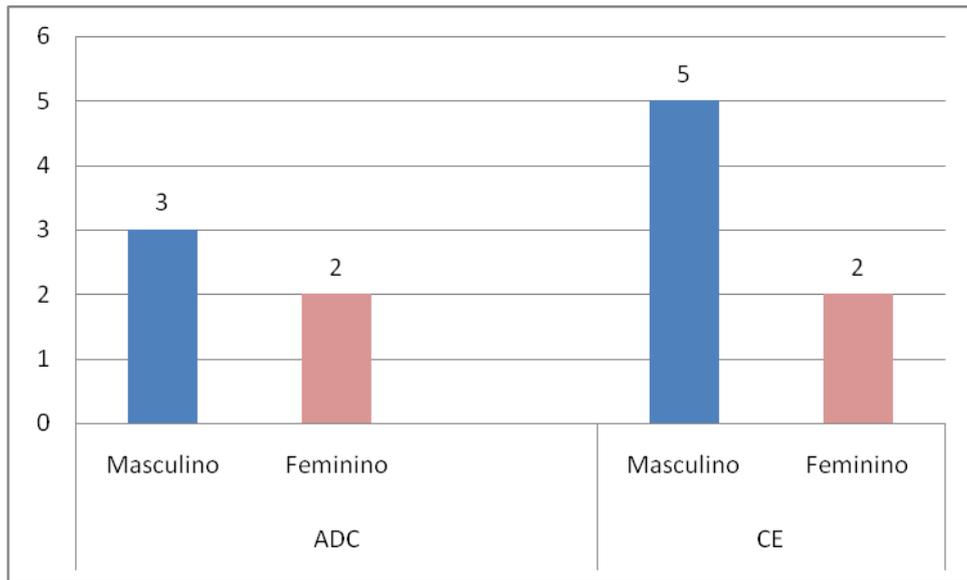


Figura 3 – Distribuição do Género na Amostra de acordo com o Tipo Histológico (N=12); ADC –Adenocarcinoma; CE – Carcinoma Epidermóide

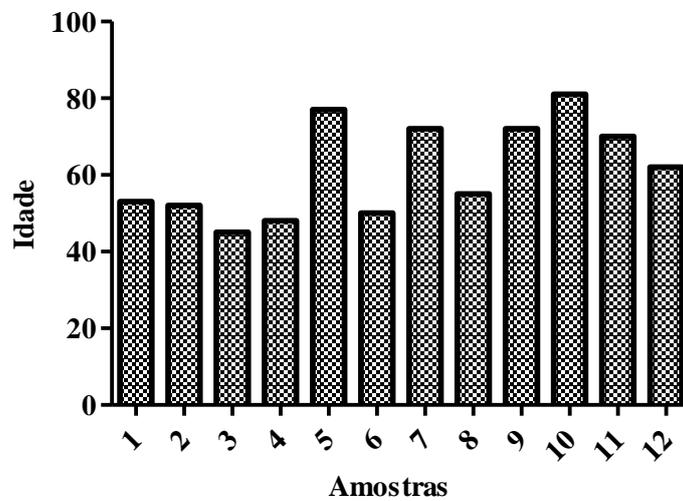


Figura 4 – Gráfico Da Distribuição de Idades na Amostra

2.2. Métodos

2.2.1. Selecção das amostras

Foram seleccionados blocos de parafina e/ou *Tissue MicroArrays* (TMA) de parênquima do pulmão tecido tumoral e secção de gânglios linfáticos, correspondendo a 12 casos colhidos entre os anos de 2006-2010 (7 adenocarcinomas e 5 carcinomas epidermóides).

2.2.2. Microdissecção a Laser (MDL)

A microdissecção a laser foi realizada com o sistema computadorizado PALM (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) que consiste em um emissor de feixes de raios laser e um microscópio óptico invertido acoplados a um sistema de vídeo (Figura 5).



Figura 5 – Sistema de microdissecção a laser computadorizado PALM.

As amostras de tumor, metástase e tecido normal de adenocarcinoma e carcinoma epidermóide de pulmão de lâminas em estudo dos diferentes casos seleccionados previamente desparafinadas em xilol durante 2min e álcool a 100% 1min antes de se proceder à MDL. Esta técnica permite-nos delimitar a área de interesse através do *PALM RoboMover and Navigator*, software fornecido pelo fabricante permitindo efectuar com minúcia os cortes e catapultar para um ependorff específico, AdhesiveCap (Carl Zeiss MicroImaging, Munchen, Germany) - Figura 6. Os tecidos colectados foram posteriormente armazenados num frigorífico a -20°C.

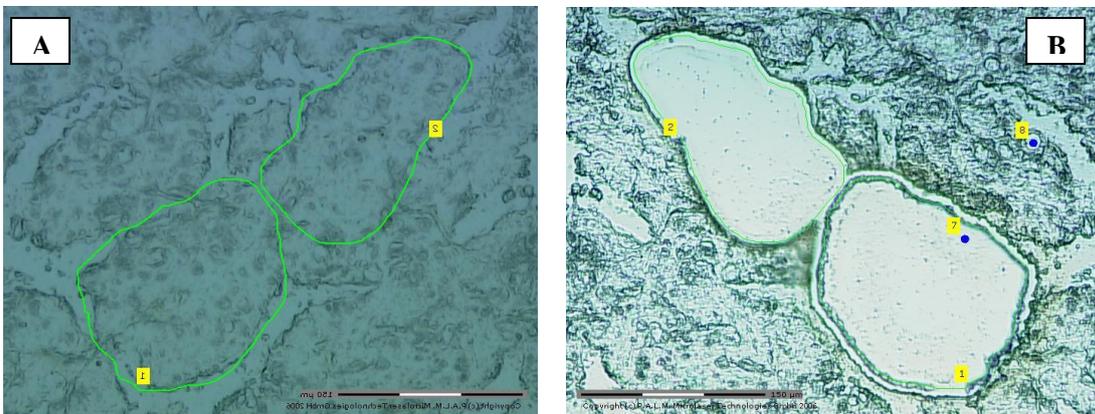


Figura 6 – Dissecção de Tumor com Sistema de microdissecção a laser computadorizado PALM. **A** – Delimitação a verde da área dissecar correspondente a um Tumor; **B** – imagem da lamina apos o corte e catapultação do material biológico para o AdhesiveCap

2.2.3. Extração de RNA

O RNA das amostras foi extraído utilizando o kit *miRNeasy FFPE Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) para tecidos parafinados (Figura 7). A extração de RNA foi feita usando um tratamento com DNase de forma a eliminar todo o DNA genômico. Preparando as amostras para o uso do *miScript PCR System* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com a recomendação do fabricante.



Figura 7 – kit *miRNeasy FFPE Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) para tecidos parafinados

2.2.4. Transcrição Reversa

Nesta etapa o miRNA das amostras foi poliadenilado, alongado e transcrito usando o “*miScript*” *Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), através do qual é gerado o ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), garantindo a estabilização da qualidade da amostra a quantificar.

2.2.5. Quantificação de RNA

Para quantificação e avaliação da qualidade dos fragmentos de miRNA utilizamos o 2100 *Bioanalyser* com o *SmallRNA Assay* (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA).

2.2.6. Primers

Para este procedimento usamos o “*miscript*” Primer Assay (Qiagen, Hilden Germany) para o miR-21, let-7 e para a normalização dos dados usamos o primer RU6, recomendado pela Qiagen. Todos os primers usados foram sintetizados pela Qiagen (Qiagen, Hilden Germany)

2.2.7. qPCR

O qPCR para o miRNA foi efectuado usando o *miScript SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) usando o cDNA das amostras em estudo sintetizado anteriormente e que foi utilizado para a realização da RT-PCR no LightCycler® 480 II (Roche, Basel, Switzerland), numa placa de 96 poços, seguido sempre as recomendações do fabricante (Figura 6).

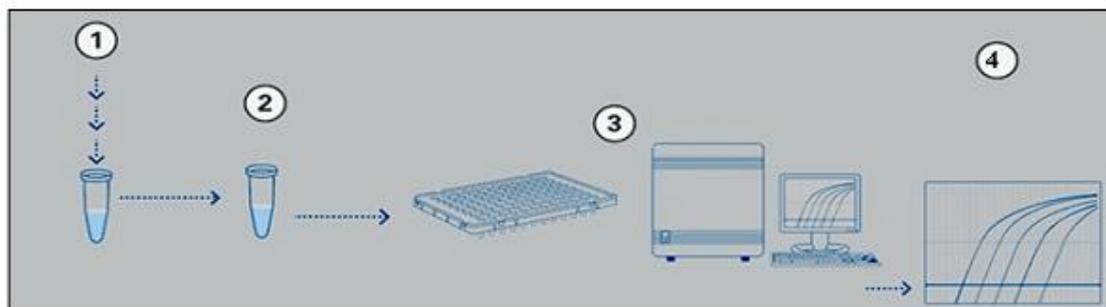


Figura 8 – Fluxograma do Protocolo Experimental do RT-qPCR em Tempo Real. **1)** Extração de RNA total; **2)** Retrotranscrição específica do RNA alvo (RT); **3)** Reacção de polimerização em cadeia quantitativa (qPCR) detectada em tempo real; **4)** Processamento dos dados de fluorescência.

Os poços na placa usada que funcionavam como controlo negativo não continham amostra. Os dados recolhidos foram calculados utilizando o método Cq e normalizados tendo em conta a expressão de RU6 com qBasePlus[®] Software (Biogazelle, Ghent, Bélgica). Os dados recolhidos foram normalizados de acordo com a fórmula:

$$\Delta Cq = Cq_{(\text{gene alvo})} - Cq_{(\text{referencia alvo})}.$$

2.2.8. Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa Graphpad Prism 5.0, Wilcoxon Signed Test (San Diego CA, EUA) para comparar a expressão dos diferentes miRNA entre o tecido de pulmão normal e tecido maligno, por tipos histológicos (CE vs ADC). Em todos os testes estatísticos executados o nível de significância escolhido para o valor de p (p) foi de $\alpha = 0,05$.

Capítulo 3 – Resultados

3.1. Análise da Expressão dos microRNA

Após o estabelecimento do ensaio de RT-*q*PCR em tempo real, para a quantificação, foram obtidos perfis de expressão dos microRNAs let-7a e miR-21 nas diferentes amostras de tecido pulmonar.

Com o propósito de verificar se no experimento efectuado, é possível observar diferentes padrões de expressão destes microRNA nos diferentes tipos histológicos.

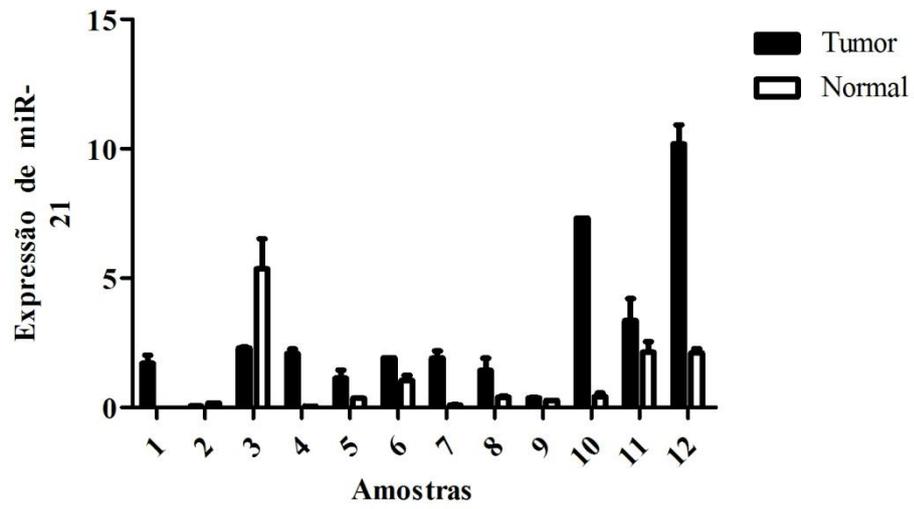
3.1.1. Expressão de miR-21

Para avaliar o papel e o potencial de diagnóstico do miR-21 procedeu-se a determinação e comparação da sua expressão em amostras de tecido normal com amostras de tumor (Figura 9). O miR-21 encontra-se sobre-expresso nas amostras de tumor ($p=0.041$) quando comparadas com tecido normal.

A expressão de miR-21 encontra-se aumentada em carcinomas epidermóides quando comparado com o tecido normal. $p= 0,0156$, facto também observável entre metástase e tecido normal neste tipo histológico $p= 0.0469$ (Figura 10).

Não se verifica alteração da expressão em metástases quando comparadas com o tumor, em ambos os tipos histológicos.(Tabela V).

(A)



(B)

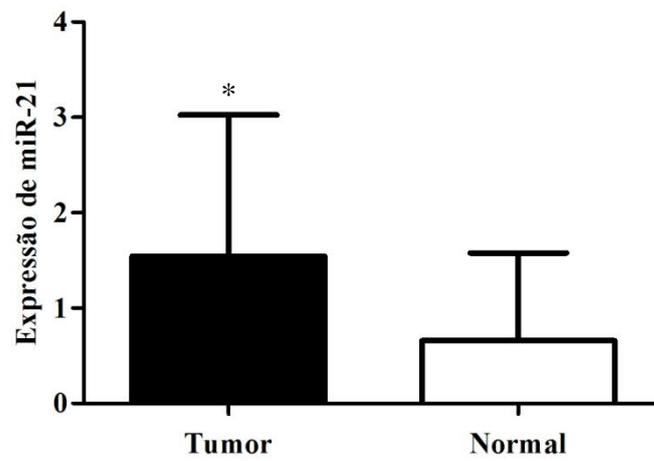


Figura 9 – Expressão de miR-21. (A e B) Análise da expressão entre tecido normal e tumor das amostras em estudo. (B) Em escala logarítmica.

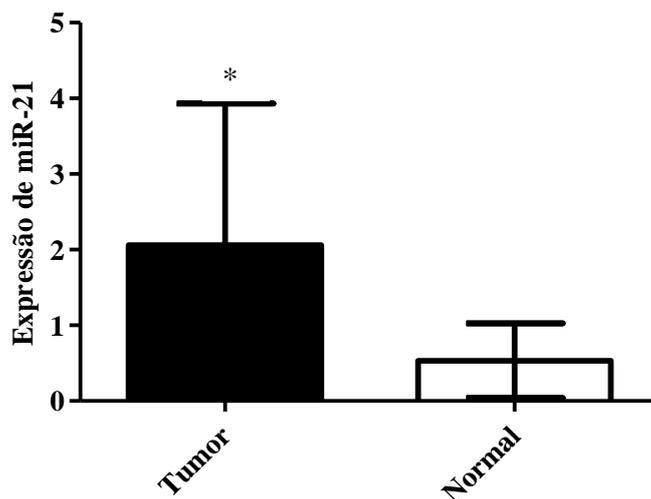


Figura 10 – Análise dos níveis de expressão do miR-21 em carcinoma epidermóide. Expressão de miR-21 em tumor e tecido normal (em escala logarítmica).

Tabela V - Análise de comparação das classificações patológicas resultantes da expressão de miR-21

Classificação (N)	Total	<i>p</i> valor
Classificação Fenotípica		
Tumor (12) vs Normal (11)	23	0,041
Metástase (11) vs Normal (11)	22	0,1230
Adenocarcinoma Tumor (5) vs Adenocarcinoma Normal (4)	9	0,8750
Adenocarcinoma Metástase (4) vs Adenocarcinoma Normal (4)	8	0,8750
Carcinoma Epidermóide Tumor (7) vs Carcinoma Epidermóide Normal (7)	14	0,0156
Carcinoma Epidermóide Metástase (7) vs Carcinoma Epidermóide Normal (7)	14	0,0469

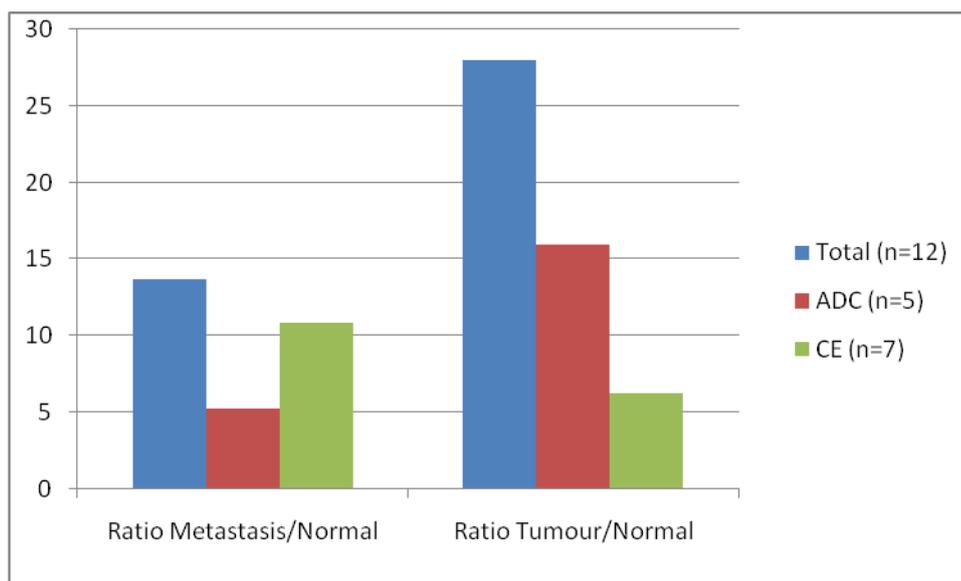


Figura 11 – Perfil de expressão de miR-21 em NSCLC (escala logarítmica)

Os resultados da análise da expressão do miR21 mostram que este microRNA encontra-se sobre-expresso nos tumores quando comparados com tecido normal ($p < 0,05$) essa sobre-expressão também é visível no gráfico da direita referente à figura 11.

Verifica-se também quando comparados carcinoma epidermóide tumor ou metástase com o tecido normal do mesmo tipo histológico uma sobre expressão deste microRNA.

3.1.2. Análise da Expressão de Let7a

Da análise estatística referente à expressão do miRNA let-7a não foi possível inferir se este se encontra sobre-expresso ou subexpresso. Apesar a literatura referir que este microRNA neste tipo de cancro apresenta um baixo nível de expressão. (Tabela VI).

Tabela VI - Análise de comparação das classificações patológicas resultantes da expressão de let7a

Classificação (N)	Total	<i>p</i> valor
Classificação Fenotípica		
Tumor (12) vs Normal (12)	24	0,9697
Metástase (11) vs Normal (12)	23	0,4131
Adenocarcinoma Tumor (5) vs Adenocarcinoma Normal (5)	10	0,3125
Adenocarcinoma Metástase (4) vs Adenocarcinoma Normal (5)	9	0,3750
Carcinoma Epidermóide Tumor (7) vs Carcinoma Epidermóide Normal (7)	14	0,3750
Carcinoma Epidermóide Metástase (7) vs Carcinoma Epidermóide Normal (7)	14	0,3750

Capítulo 4 – Discussão/Conclusão

Os microRNAs (miRNAs) constituem uma classe recém descrita de reguladores pós-transcricionais da expressão génica composta por pequenos RNAs endógenos (~22 nucleótidos) não codificantes [Ambros et al.]. A actuação dos miRNAs como oncogenes e genes supressores tumorais, através da regulação de processos como apoptose e proliferação celular, indica uma participação importante destes pequenos RNAs na patogénese do cancro [Bartel *et al.*]. Desta forma o estudo da influência dos miRNAs na tumorigénese do cancro do pulmão pode contribuir para a compreensão e regulação da biologia do cancro.

Os miRNAs regulam negativamente a expressão de mRNAs num mecanismo que depende do grau de complementaridade entre o miRNA e seus mRNAs alvo. Quando ocorre o pareamento perfeito ou próximo ao perfeito do miRNA com a sequência codificadora de proteína do mRNA, a via de interferência de RNA (RNAi) é activada resultando na clivagem do mRNA alvo por ribonucleases associadas ao complexo RISC, mecanismo este comumente encontrado em plantas [Bartel *et al.* 2004]. Apesar de esta actuação ter sido descrita em mamíferos, a maioria dos miRNAs encontrados em animais actua por um segundo mecanismo que não envolve a degradação do mRNA alvo. Assim, os miRNAs regulam a expressão génica por pareamento imperfeito com a região 3' UTR resultando na inibição da tradução. O pareamento imperfeito possibilita que um único miRNA regule a expressão de vários mRNAs alvo diferentes e ainda, que diferentes miRNAs controlem de cooperativamente a expressão de um único mRNA alvo. Consequentemente, a combinação única de miRNAs expressos em cada tipo celular pode regular de forma específica a tradução de inúmeros mRNAs, configurando, assim, uma complexa rede regulatória exercida pelos miRNAs [Croce et al.2008].

O microRNA let-7 (do inglês lethal-7) foi o segundo stRNA descrito em *C.elegans* e primeiro miRNA descrito em mamíferos. A família de miRNAs let-7 (do let-7a ao let-

7i) é codificada por treze loci génicos localizados em diferentes cromossomas. Entretanto, let-7 ganhou reconhecimento da comunidade científica por ser o primeiro miRNA a ter um alvo com função importante no cancro. Neste estudo importante, foi mostrado que isoformas do oncogene RAS apresentavam sítios múltiplos e potenciais para a ligação de let-7 na região 3`UTR do mRNA, podendo sofrer regulação deste miRNA. A descrição do mecanismo de let-7 controlando os níveis proteicos do oncogene RAS foi um marco no entendimento da influência dos miRNAs na tumorigénese [Harris et al.2006]. Num estudo clínico sobre papel de let-7 no cancro do pulmão, associou-se a diminuição deste miRNA com pior prognóstico, e ainda mostrou-se que a introdução de let-7 diminui o crescimento da linhagem A549 de adenocarcinoma de pulmão *in vitro*, indicando a potencialidade deste miRNA como gene supressor tumoral [Dacic et al.2010].

O microRNA-21 também conhecido como HSA-mir-21 ou miRNA-21 foi um dos primeiros microRNA de mamíferos a ser identificados. A sua sequência é fortemente conservada ao longo da evolução. O microRNA-21 humano está localizado no cromossoma 17q23.2., apresenta-se sobre expresso em diversos tipos de cancro tais como mama, pulmão, e glioblastoma. A noção de que miR-21 funciona como um oncogene foi muito apoiada recentemente, mostrando que a supressão de miR-21 pode inibir o crescimento tumoral [Seike *et al.* 2009].

É com base nestes pressupostos e em todas as potencialidades terapêuticas destas micro moléculas procurando posteriormente proceder à caracterização e diferenciação conforme nos referimos a adenocarcinomas e carcinomas epidermóides, que foi realizado este estudo [Keller et al, 2009 Lawrie et al.2008]

A microdissecção a laser é uma técnica de desenvolvimento relativamente recente que permite a obtenção de amostras de tecidos normais ou alterados, ou de células individuais de regiões microscópicas específicas. O contacto com o laser preserva a morfologia das células e seu o material genético, permitindo análise molecular. Esta técnica ainda permite delimitar e quantificar especificamente a área a dissecar [Nonn et al 2009.].

miR-21 e let-7a têm sido descritos como potenciais ferramentas de diagnóstico e prognóstico no cancro do pulmão, mama, colo-rectal, entre outros [Markou et al.2008]

O presente trabalho foi proposto com o objectivo de investigar a expressão do microRNAs miR-21 e let-7a em carcinomas epidermóides e adenocarcinomas de pulmão em tecido fixado em formol e embebido em parafina [Liu X et al 2009].

Neste estudo foram integrados 8 casos de doentes do género masculino e 4 casos de doentes do género feminino, cujas características demográficas são semelhantes às encontradas em estudos efectuados ($61,4 \pm 12,4$ anos) [Carvalho L. et al2009], devido ao diagnóstico tardio deste tipo de carcinoma comparativamente com outros carcinomas.

Verificamos que o miR-21 pode ser interpretado como um marcador de diagnóstico [Zhu et al. 2008] devido à sua expressão elevada em ambos os tipos histológicos estudados com relevância estatística para o carcinoma epidermóide e metástases respectivas [Markou A et al 2008]; o estudo do let-7a não mostrou resultados comparáveis com os trabalhos publicados porque não se verificou a sub-expressão esperada.

Vários factores poderão ter contribuído para que alguns dos resultados deste experimento não correspondam aos evidenciados na literatura tais como:

1) Degradação do RNA utilizado em estudo

Poderá ser uma das razões que terão influenciado os resultados dado que se sabe que o RNA é uma molécula muito instável que se degrada facilmente, embora seja pouco provável dado que instituições de renome como o IAP e os HUC preocupam-se por respeitar criteriosamente todas os procedimentos inerentes à colecta e armazenamento das amostras. Sendo esse um passo crucial para que o RNA apresente um índice de qualidade satisfatório.

2) Número reduzido de Casos

A maioria dos estudos de perfis dos microRNAs apresentados possui um elevado número de amostras (no mínimo 30). O que permitiria possivelmente obter uma distribuição dos dados mais alargada que poderia ou não coadunar com as observações efectuadas na literatura. Apesar de uma amostra não representar perfeitamente uma população. Ou seja, a utilização de uma amostra implica a aceitação de uma margem de erro que denominaremos erro amostral que é menor quanto maior for o número de amostras analisadas.

Embora muitos estudos já tenham sido realizados em neoplasias malignas, entre elas a do pulmão, estudos feitos sobre estes pequenos reguladores e das vias de sinalização em que participam e nas variações nos perfis de expressão permitirão definir o seu papel na tumorigénese.

Capítulo 5 – Perspectivas Futuras Para os Estudos dos miRNA

Apesar de ainda estarmos no estágio inicial do entendimento funcional dos miRNAs, a importância destas moléculas no cancro é promissora.

A investigação constante, numa área de intervenção tão importante como o cancro do pulmão é, inquestionavelmente, necessária; cada vez se sabe mais sobre as suas causas, sobre a forma como se desenvolve e cresce, ou seja, como progride. Estando, também, a ser estudadas novas formas de o prevenir, detectar e tratar, tendo sempre em atenção a melhoria da qualidade de vida das pessoas com cancro, durante e após o tratamento.

Publicações têm demonstrado que testes citogenéticos baseados em diferentes tecnologias (RT-PCR microarrays e microRNA) podem ajudar a determinar perfis de miRNA entre tecidos distintos e entre tecidos normais e neoplásicos e poderá a ser crucial para o diagnóstico de neoplasias metastizadas sem tumor primário conhecido, permitindo uma melhor caracterização e prognóstico em neoplasias, tanto na agressividade da metastização como na sensibilidade à quimioterapia dentro do mesmo tipo histológico. Estas descobertas chamam a atenção do público e incentivam o desenvolvimento de novas pesquisas que visam a melhor compreensão do potencial uso de microRNAs, a exemplo do let-7, como ferramentas de combate ao cancro. O valor destes testes moleculares na escolha da terapêutica ainda não está provado, mas as análises iniciais sugerem que no futuro poderão ser úteis.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350–355.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.(1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics,biogenesis,mechanism,and function. *Cell*, 116, 281–297.
- Baffa R, Fassan M, Volinia S, O’Hara B, Liu CG, Palazzo J, Gardiman M, Rugge M, Gomella LG, Croce CM and Rosenberg A, (2009), MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets, *Journal of Pathology*, 219, 214-221.
- Blower PE, Chung JH, Verducci JS, Lin S, Park JK, Dai Z, Liu CG, Schmitt TD, Reinhold WC, Croce CM, Weinstein JN and Sadee W, (2008), MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(1), 1-9
- Carvalho L, Cardoso E, Nunes H, Baptista V, Gomes A, Couceiro P. (2009) Projecto de estadiamento do cancro do pulmão pela IASLC: Estudo comparativo entre a 6.^a edição TNM em vigor e a 7.^a edição proposta. *Rev Port Pneumol.*; XV (1): 67-76.
- Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Taylor Murray, Jiaquan Xu , Michael J. Thun, (2007) *Cancer Statistics 2007 CA Cancer J Clin*, 57;43-66
- Croce CM, (2008), *Oncogenes and Cancer*, *New England Journal of Medicine*, 358, 502-511.

- Uehara C, Jamnik S, Santoro II. (abr./jun. 1998) Câncer de pulmão. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 266-276.
- Liu X, Sempere F, Galimberti F, (2009), Uncovering Growth-Suppressive Micro-RNA in Lung Cancer, *Clinical Cancer Research*, 15(4), 1177-1183.
- Gartel AL and Kandel ES, (2008), miRNAs: Little known mediators of oncogenesis, *Seminars in Cancer Biology*, 18(2), 103-110.
- Grady WM, Tewari M: The next thing in prognostic molecular markers: microRNA signatures of cancer. *Gut* 2010; 59:706–708.
- Harris Curtis C, (2006), Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Cell*, 9(3), 189-198.
- Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig, Scheffler M, Huwer H, Lnhof HP and Meese E, (2009), miRNAs in lung cancer – Studying complex fingerprints in patient’s blood cells by microarray experiments, *BioMedCentral Cancer*, 9, 353-365.
- Kong W, Zhao JJ, He L and Cheng JQ, (2009), Strategies for Profiling MicroRNA Expression, *Journal of Cellular Physiology*, 218, 22-25.
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al.: Detection of elevated levels of tumour associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 672–675.
- Ma L, Teruya-Feldstein J and Weinberg RA, (2007), Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer, *Nature*, 449, 682-688.

Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas and Lianidou ES, (2008), Prognostic Value of Mature MicroRNA-21 and MicroRNA-205

Overexpression in Non–Small Cell Lung Cancer by Quantitative Real-Time RT-PCR, *Clinical Chemistry* 54:10, 1696-1704.

Nonn L, Vaishnav A, Gallagher L and Gann PH, (2009), mRNA and micro-RNA expression analysis in laser capture microdissected prostate biopsies: Valuable tool for risk assessment and prevention trials, *Experimental and Molecular Pathology*, 88, 45-51.

Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM and Harris CC, (2009), MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNA)*, 106(29), 12085-12090.

Parente Bárbara, Queiroga H, Teixeira E et al. (2007). Estudo epidemiológico do cancro do pulmão em Portugal nos anos de 2000/2002. *Rev Port Pneumol*, vol.13, no.2, p.255-265.

Parente B, Queiroga H, Cunha J, Fernandes A, et al. (2006) Estudo Epidemiológico do Cancro do pulmão no Norte de Portugal. Resultados de 5 anos (2000/2004). *Rev Port Pneumol*; XII(2, supl 1):S41.

Travis WD, Brambilla E, Harris CC, and Muller-Hermelink HK, (2004), *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, World Health Organization, 12-15.

World Cancer Research Fund. Lung. In: Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global perspective. American Institute for Cancer Research; 2007. Chapter 7.4. p. 259-65.

Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K and Ju J, (2007), Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples, *RNA*, 13, 1668-1674.

Zhu S, Whu H, Wu F, Nie D, Sheng S and Mo Y, (2008), MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis, *Cell Research*, 18(3), 350-359.

Dacic, S., L. Kelly, et al. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol*, v.23, n.12, Dec, p.1577-82. 2010.

Freedman, N. D., M. F. Leitzmann, et al. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *Lancet Oncol*, v.9, n.7, Jul, p.649-56. 2008.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. (2010) *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, pp 143-64

M-L Si, S Zhu, H Wu, Z Lu, F Wu and Y-Y Mo miR-21-mediated tumor growth suppression of tumor growth by anti-miR-21 *Oncogene* 26, 2799-2803 (26 April 2007) | doi:10.1038/sj.onc.1210083

The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer.

Esquela-Kerscher, A., P. Trang, J. F. Wiggins, L. Patrawala, A. Cheng, L. Ford, J. B. Weidhaas, D. Brown, A. G. Bader and F. J. Slack (2008). *Cell Cycle* 7(6): 759-64.

The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. Johnson, C. D., A. Esquela-Kerscher, G. Stefani, M. Byrom, K. Kelnar, D. Ovcharenko, M. Wilson, X. Wang, J. Shelton, J. Shingara, L. Chin, D. Brown and F. J. Slack (2007). *Cancer Res* 67(16): 7713-22.

A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris and C. M. Croce (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2257-6