

PAPEL DOS microRNAs NO SARCOMA DE EWING

Mirela Marina Fetzner¹
Izabella Brolo Brum Basílio²
Paola Fernanda Fedatto³
Fernando Augusto de Freitas⁴

INTRODUÇÃO

O Sarcoma de Ewing (SEW) é o segundo tumor ósseo maligno mais frequente em crianças e adolescentes. Em todo o globo, sua incidência é de 2 crianças a cada 1.000.000 anualmente, com maior número de ocorrências registrados em indivíduos de 10 a 15 anos de idade (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2006). Os sintomas primários de SEW são dor e edema, estes acontecem derivando de lesões ósseas. Cerca de 80% dos casos apresentam-se com uma única massa de crescimento rápido e, 30% dos pacientes com o Sarcoma de Ewing são diagnosticadas com micrometástase, sendo indicado como um fator primordial para o prognóstico do sarcoma, também levando em consideração o tamanho, a localização do tumor, como a duração dos sintomas (BACCI et al., 2003; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2006; SANTOS, 2019).

Além das inovações em controle local, com procedimentos cirúrgicos e radioterápicos indicados por tomografia e ressonância magnética, bem como quimioterapia invasiva, a taxa de sobrevivência de pacientes com o Sarcoma de Ewing permanece estável desde os anos 80. O SEW é inicialmente curável, mas existe uma grande chance de recaída e metástase, devido à quimiorresistência e também à capacidade invasiva das células. Cerca de 30-40% dos pacientes, localizados e 80% dos pacientes metastáticos irão a óbito por progressão do sarcoma, sendo metástase de pulmão e outros ossos, incluindo também a medula óssea, que são os principais locais (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2006).

A pesquisa de identificação de alvos de microRNAs (miRNAs) está atraindo importantes grupos de pesquisa no mundo todo. Alguns miRNAs são atualmente conhecidos por

¹ Graduanda do Curso de Farmácia do Centro de Ensino Superior de Foz do Iguaçu - CESUFOZ, mirelaferzner@gmail.com;

² Graduanda do Curso de Farmácia do Centro de Ensino Superior de Foz do Iguaçu - CESUFOZ, izabellalarissa04@gmail.com;

³ Professora colaboradora: Doutora em Pediatria com ênfase em Investigação Oncológica Pediátrica pela Universidade de São Paulo e Docente do curso de Farmácia do Centro de Ensino Superior de Foz do Iguaçu/PR, pfedatto@gmail.com;

⁴ Professor orientador: Doutor em Bioquímica pela Universidade de São Paulo, USP – SP e Docente do curso de Farmácia do Centro de Ensino Superior de Foz do Iguaçu/PR, fernandoaugustodefritis.faf@gmail.com.

desempenharem funções de oncogenes e supressores tumorais (ZHANG; DAHLBERG; TAM, 2007). Os miRNAs são interessantes, pois possuem características únicas que podem ser utilizados com marcadores biológicos para rastreamento tumoral em pacientes oncogênicos, são mais resistentes à degradação e podem ser encontrados em amostras teciduais, tanto frescas quanto congeladas e fixadas (RIBEIRO-DOS-SANTOS; CRUZ; DARNET, 2012).

Tratamentos que considerem alvos terapêuticos embasados em achados moleculares tumorais específicos, isoladamente ou em associação com a radio ou quimioterapia convencional, poderiam permitir o resgate de crianças acometidas por neoplasias atualmente consideradas incuráveis após recaída ou progressão.

Tendo em vista estes aspectos, o presente estudo teve por escopo identificar na literatura os miRNAs diferencialmente expressos no SEW e fazer uma análise *in silico* das vias moduladas por estes miRNAs neste tumor. Acreditamos que os dados gerados possam contribuir com o entendimento da biologia do tumor e dos mecanismos de ação dos miRNAs no processo tumorigênico do SEW.

METODOLOGIA

Este trabalho teve como escopo geral o estudo bibliográfico exploratório qualitativo sobre o papel dos miRNAs no Sarcoma de Ewing. Foram utilizadas buscas com as palavras-chave “microRNA” [E] “Sarcoma de Ewing” nos bancos de dados nacionais (Bireme, LILACs, Banco de teses das universidades) e “microRNA” [AND] “Ewing Sarcoma” nos banco de artigos internacionais (NCBI-PubMed).

Foram incluídos artigos originais disponíveis na íntegra que envolviam o tema relacionado miRNA e Sarcoma de Ewing. Foram excluídos do estudo aquelas formas de divulgação em editoriais e resumos de eventos que não apresentassem informações completas sobre o papel do miRNA no processo do Sarcoma de Ewing.

Foi realizado também um estudo *in silico* a partir da seleção dos microRNAs hipo e hiperexpressos em SEW encontrados nos estudos. Foram utilizados os banco de dados miRBase (<https://www.mirbase.org/>) (AMBROS et al., 2003) para atualizar as nomenclaturas usuais, miRecors (<http://c1 accurascience.com/miRecords/>) (XIAO et al., 2009) para buscar os alvos validados e Enricher (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) (CHEN et al., 2013; KULESHOV et al., 2016; XIE et al., 2021) para buscas de vias e processos relacionados aos alvos validados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os miRs analisados, o miR-130b atua como oncomiR nas células de EWS, resultando na indução da proliferação, invasão e migração *in vitro*, aumentando o potencial metastático *in vivo* pela ativação da rede regulatória CDC42/PAK1/JNK (SATTERFIELD et al., 2017) e, como observado no nosso estudo *in silico*, este miR apresenta-se hiperexpresso nestes estudos. Além disso, para que seja induzido o crescimento celular e sua progressão do ciclo celular, miR-181c também evita a apoptose (KAWANO et al., 2018).

Na literatura, foi encontrado que cerca de 85% do SEW é derivado da translocação (t11;22)(q24;12) que resulta na oncoproteína EWS/FLI1. Esta translocação (t11;22)(q24;12) resulta na inativação dos miRNAs da família let-7a, que possui papel de supressor tumoral, e sua inativação resulta no aumento da molécula HMGA2, que regula as atividades de fatores de transcrição, expressando o SEW (LAZAR et al., 2006; ZHANG et al., 2016).

A oncoproteína EWS/FLI1 liga-se a fatores de transcrição reprimindo a expressão dos miRNAs miR-22, -100, -125b, -221, -27a, também com função de supressores tumorais na regulação das vias de sinalização IGF-1, IGF-1R e mTOR, que resulta também na expressão do SEW (MCKINSEY et al., 2011). Em outro estudo, foram verificados os níveis de expressão de 267 miRNAs e 15.651 mRNAs em 40 amostras tumorais, onde foi observado um padrão antagônico entre 7994 duplas de miRNA-mRNA, sendo que alguns destes miRNAs estão diretamente ligados a alvos do fuso mitótico, ciclo celular e organização, enquanto outros estão ligados à matriz extracelular e colágeno, como por exemplo miR-379, -410, -152, -199b e -145 (MARTIGNETTI et al., 2012).

A expressão abundante de miR-34a está associada a uma melhor sobrevida livre de eventos e sobrevivência geral, onde baixos níveis de expressão de miR-34a foram associados a resultados ruins (MARINO et al., 2014; NAKATANI et al., 2012). Foi demonstrado que a expressão miR34a pode ocasionar a redução da expressão de Notch1 e NF-kB, aumentando assim a diferenciação neural das células de EWS (VENTURA et al., 2016). Já de maneira diferente, a regulação negativa de miR-124-3p, -139-5p e -584-5p está associada à progressão da doença (ROBERTO et al., 2020).

Foram selecionados 53 miRNAs com alteração de expressão em SEW para as análises *in silico*. Destes, foram escolhidos 27 miRNAs cujos estudos mostraram aumento da expressão e 8 miRNAs com redução da sua expressão em estudos com SEW. As nomenclaturas dos miRNAs foram atualizadas a partir da base de dados miRBase (AMBROS et al., 2003) e utilizadas na busca de alvos validados usando o banco de dados MiRecords (XIAO et al., 2009).

Foram encontrados os alvos validados para 15 miRNAs hiper e 6 miRNAs hipoexpressos em SEW. A partir dos genes validados buscou-se as vias de sinalização e processos envolvidos com o aumento e redução dos miRNAs selecionados neste estudo, utilizando o banco de dados Enrichr (CHEN et al., 2013; KULESHOV et al., 2016; XIE et al., 2021) e escolha de vias de sinalização pelo banco de dados do KEGG 2021 Human e processos biológicos pelo GO Biological Process 2021.

A abordagem junto ao Enricher-KEGG 2021 Human, permitiu a identificação de 85 genes validados como alvos dos miRNAs que estavam hipoexpressos (hsa-miR-193a-3p; hsa-miR-708-5p; hsa-miR-155-5p; hsa-miR-145-5p; hsa-miR-133a; hsa-miR-124-3p; hsa-miR-21-5p). As vias de sinalização supostamente mais ativadas, devido a redução de miRNAs que regulam essas vias, estão relacionadas com as vias de MicroRNAs em Câncer, Senescência Celular, Vias Gerais em Câncer, Via de Sinalização de TGF-beta, Desregulação Transcricional, Via de Sinalização de Hippo, Proteoglicanas em Câncer, Via de Sinalização de FoxO e Vias de Sinalização que Regulam a Pluripotência das Células-Tronco. Junto ao Enricher - GO Biological Process 2021 os processos biológicos alterados foram: Proliferação Celular, Regulação de Processos Apoptóticos, Regulação Negativa da Transcrição do DNA, Regulação da Diferenciação Celular.

Foram encontrados 186 genes validados como alvos dos miRNAs que estavam hiperexpressos (hsa-miR-34a-5p; hsa-miR-93-5p; hsa-miR-let-7^a; hsa-miR-106b-5p; hsa-miR-20b-5p; hsa-miR-100-5p; hsa-miR-101-3p; hsa-miR-105-5p; hsa-miR150-3p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-181a-5p; hsa-miR-195-5p; hsa-miR-127-3p; hsa-miR-139-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-181b-5p; hsa-miR-214-3p; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-a30d-5p) junto ao Enricher- KEGG 2021 Human. As vias de Sinalização estão relacionadas com as vias de MicroRNAs em câncer, muitos genes com alterações correlatas em outros tipos de câncer como Bexiga, Pâncreas, Pulmão, Mama, Melanoma, Glioma, Gástrico, Coloretal. Junto ao Enricher GO Biological Process 2021 foram encontradas relações com Quimiotaxia das Células Endoteliais pela Via de Sinalização VEGF-R, regulação negativa do Crescimento Celular, regulação negativa do Processo Metabólico de Fosfato, Via Apoptótica Extrínseca, regulação negativa do Envelhecimento Celular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inúmeros estudos exploraram a participação de miRNAs na patogênese EWS regulando genes que controlam a progressão do ciclo celular, apoptose, invasão e crescimento celular e

comprovaram a utilidade dos perfis de expressões com possíveis marcadores diagnósticos e indicadores de prognóstico. Porém, até o momento não existem biomarcadores disponíveis estabelecidos que são usados rotineiramente para um diagnóstico de SEW ou prever resultados de uma terapia de forma confiável. São necessários estudos mais abrangentes para melhorar a estratificação e para testar sua potencialidade dos miRNAs como alvos de tratamento. Além disso, uma proporção significativa de pacientes com SEW estão com mau prognóstico devido a fenótipos avançados na época do diagnóstico, metástase à distância e resistência ao adjuvante terapêutico.

Palavras-chave: Sarcoma de Ewing, miRNA, Translocação, Genética e Câncer

AGRADECIMENTOS: Gostaríamos de agradecer primeiramente a Deus, que nos deu possibilidades de estarmos onde estamos e por seu vasto amor. Aos nossos pais, pelo apoio e amor. Aos professores doutores, Paola Fernanda Fedatto e Fernando Augusto de Freitas, que nos deram suporte para pesquisa, nos inspiraram, nos deram o melhor como profissionais e também como pessoas sensíveis e admiráveis.

REFERÊNCIAS

AMBROS, V. et al. A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, v. 9, n. 3, p. 277–279, 2003.

BACCI, G. et al. Therapy and survival after recurrence of Ewing's tumors: The Rizzoli experience in 195 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy from 1979 to 1997. **Annals of Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1654–1659, 2003.

CHEN, E. Y. et al. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, v. 14, 2013.

KAWANO, M. et al. MicroRNA-181c prevents apoptosis by targeting of FAS receptor in Ewing's sarcoma cells. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.

KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W90–W97, 2016.

LAZAR, A. et al. Molecular diagnosis of sarcomas: Chromosomal translocations in sarcomas. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 130, n. 8, p. 1199–1207, 2006.

MARINO, M. T. et al. Prognostic significance of miR-34a in Ewing sarcoma is associated with cyclin D1 and ki-67 expression. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 10, p. 2080–2086, 2014.

MARTIGNETTI, L. et al. Antagonism pattern detection between microRNA and target expression in Ewing's sarcoma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

MCKINSEY, E. L. et al. A novel oncogenic mechanism in Ewing sarcoma involving IGF pathway targeting by EWS/Fli1-regulated microRNAs. **Oncogene**, v. 30, n. 49, p. 4910–4920, 2011.

NAKATANI, F. et al. miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemo-sensitivity and malignancy. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 5, p. 796–805, 2012.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.; CRUZ, A. M. P.; DARNET, S. Deep Sequencing of MicroRNAs in Cancer: Expression Profiling and Its Applications. In: MALLICK, B.; GHOSH, Z. (Eds.). . **Regulatory RNAs: Basics, Methods and Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 523–546.

ROBERTO, G. M. et al. ROCK1-Predicted microRNAs Dysregulation Contributes to Tumor Progression in Ewing Sarcoma. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, n. 1, p. 133–139, 2020.

RODRIGUEZ-GALINDO, C. et al. Ewing Sarcoma Family of Tumors. In: PAPPO, A. (Ed.). **Pediatric Oncology: Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas**. Berlin: Springer, 2006. p. 247.

SANTOS, M. DE O. Incidência, Mortalidade e Morbidade Hospitalar por Câncer em Crianças, Adolescentes e Adultos Jovens no Brasil: Informações dos Registros de Câncer e do Sistema de Mortalidade. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 3, p. 439–440, 2019.

SATTERFIELD, L. et al. miR-130b directly targets Arhgap1 to drive activation of a metastatic CDC42-PAK1-AP1 positive feedback loop in Ewing sarcoma. **Int J Cancer**, v. 141, p. 2062–2075, 2017.

VENTURA, S. et al. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through MIR-34a-Notch-mediated control of NF-κB signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 30, p. 3944–3954, 2016.

XIAO, F. et al. miRecords: An integrated resource for microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 105–110, 2009.

XIE, Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. **Current Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1–51, 2021.

ZHANG, W.; DAHLBERG, J. E.; TAM, W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. **The American journal of pathology**, v. 171, n. 3, p. 728–38, set. 2007.

ZHANG, Z. et al. Let-7a suppresses macrophage infiltrations and malignant phenotype of Ewing sarcoma via STAT3/NF-κB positive regulatory circuit. **Cancer Letters**, v. 374, n. 2, p. 192–201, 2016.