



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-Graduação em Enfermagem**

---

**LUCAS BRUMATO FIGUEIREDO**

**REGULAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA PPAR POR  
EPIGENÉTICA: CONTRIBUIÇÃO À CUIDADOS COM  
A SAÚDE EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

**São José do Rio Preto**  
**2023**

**Lucas Brumato Figueiredo**

**REGULAÇÃO DE GENES DA FAMÍLIA PPAR POR  
EPIGENÉTICA: CONTRIBUIÇÃO À CUIDADOS COM  
A SAÚDE EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Enfermagem da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Processo de trabalho em enfermagem e saúde.

Linha de Pesquisa: Processo do Cuidar nos Ciclos de Vida.

Grupo de Pesquisa: UPGEM – Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular

Financiamento: Pesquisa realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes

**São José do Rio Preto  
2023**

Figueiredo Brumato, Lucas

Regulação de genes da família PPAR por epigenética: contribuição à cuidados com a saúde em câncer de cabeça e pescoço/Lucas Brumato Figueiredo.

São José do Rio Preto; 2023.

49 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Enfermagem da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Processo do Trabalho em Saúde.

Linha de Pesquisa: Processo do Cuidar nos Ciclos de Vida.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eny Maria Goloni Bertollo

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Maria Urbanin Castanhole-Nunes

Palavras-Chave: Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo; Terapêutica; Câncer de cabeça e pescoço; Linhagem; Neoplasias; Expressão Gênica.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eny Maria Goloni Bertollo (Orientadora e Presidente)  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília de Freitas Calmon  
Ibilce - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto -  
UNESP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Pinto  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP

São José do Rio Preto, 04/12/2023.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>v</b>
<b>Epígrafe.....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviatura e Símbolos.....</b>	<b>x</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Métodos.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>25</b>
<b>Anexo - PPAR<math>\alpha</math> e PPAR<math>\gamma</math>: regulação por microRNAs e seu papel no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço .....</b>	<b>29</b>

## **AGRADECIMENTOS**

### ***A Deus***

*Agradeço pelo presente da vida e por me conceder saúde e determinação para enfrentar os desafios. Sou grato pelas excelentes oportunidades profissionais que Ele me proporcionou. Reconheço que sem Sua intervenção, nada disso teria sido viável.*

### ***À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eny Maria Goloni Bertollo, minha orientadora***

*Agradeço pela chance de ser sseu orientando, um modelo de dedicação e respeito à pesquisa. Sua orientação tem sido um estímulo valioso para o meu crescimento científico, e sou grato por sua gentileza, dedicação e paciência ao me ensinar.*

### ***À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes***

*Agradeço pela coorientação, pelo apoio constante e pelos valiosos conhecimentos compartilhados. Sua ajuda em todas as etapas deste trabalho, sempre entregue com paciência e dedicação, é imensamente valorizada. Além disso, estou grato por aceitar que eu fosse seu coorientando e, ao longo do tempo, tornar-se uma grande amiga.*

### ***À minha família***

*Quero expressar minha gratidão ao meu pai, à minha irmã, meus avós, tios, tias e primos pelo apoio constante, carinho e paciência. Vocês ocupam um lugar muito especial em meu coração.*

### ***Aos meus amigos(as)***

*Agradeço pelas palavras de apoio e incentivo que sempre me mantiveram motivado. Obrigado pelo companheirismo constante. Amo muito todos vocês, Bianca, Gabriela, Vitória, Ana Paula, Carol, Ludimila, Daniel, Vilson Júnior e Tânia.*

### ***Aos Funcionários, estagiários e pós-graduandos da UPGEM***

*Quero expressar minha gratidão pela colaboração e apoio durante a execução deste projeto. Acredito firmemente que nenhum trabalho se concretiza sem a contribuição de uma equipe. Vocês desempenharam um papel essencial e insubstituível.*

### ***Aos Membros da Banca***

*Agradeço pela sua disponibilidade e, sobretudo, pela colaboração empenhada para aprimorar ainda mais este projeto.*

***Ao Programa de Pós Graduação em Enfermagem da Famerp***

*Quero expressar minha gratidão a todos os funcionários e professores do Programa pelo enriquecimento acadêmico e conhecimento proporcionados durante o período do curso de Mestrado.*

***CAPES***

*Pela bolsa de estudo.*

***FAMERP, CNPq e FAPESP***

*Pelo apoio Institucional e suporte financeiro*

***Àqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a concretização deste projeto, o meu sincero agradecimento.***

**EPÍGRAFE**

*"A vida é uma coisa frágil, e a morte, inevitável. A busca da verdade e do conhecimento é uma das melhores respostas para a fragilidade da vida."*

*Albus Dumbledore*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Sítios anatômicos relacionados ao câncer de cabeça e pescoço.....	1
<b>Figura 2.</b>	Árvore da grande família de receptores nucleares.....	3
<b>Figura 3.</b>	Esquema da estrutura funcional de receptores nucleares.....	4
<b>Figura 4.</b>	Representação da via de sinalização <i>PPAR<math>\alpha</math></i> / <i>PPAR<math>\gamma</math></i> / NF- $\kappa$ B sem a influência regulatória dos microRNAs.....	6
<b>Figura 5.</b>	Representação da via de sinalização <i>PPAR<math>\alpha</math></i> / <i>PPAR<math>\gamma</math></i> / NF- $\kappa$ B com a influência regulatória dos microRNAs.....	7
<b>Figura 6.</b>	Esquema da biogênese de microRNAs.....	8
<b>Figura 7.</b>	Dados de expressão do TCGA do <i>PPAR<math>\alpha</math></i> e <i>PPAR<math>\gamma</math></i> em CCP, comparando com tecido normal e tumor primário.....	15
<b>Figura 8.</b>	Expressão dos genes do banco de dados do TCGA para os genes <i>PPAR<math>\alpha</math></i> (a) e <i>PPAR<math>\gamma</math></i> (b), comparando os diferentes estágios tumorais em relação ao tecido normal. ....	16
<b>Figura 9.</b>	Expressão relativa ao <i>PPAR<math>\alpha</math></i> após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem HN13.....	16
<b>Figura 10.</b>	Expressão relativa ao <i>PPAR<math>\alpha</math></i> após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem FaDu.....	17
<b>Figura 11.</b>	Expressão relativa ao <i>PPAR<math>\gamma</math></i> após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem HN13.....	17
<b>Figura 12.</b>	Expressão relativa ao <i>PPAR<math>\gamma</math></i> após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem FaDu.....	18
<b>Figura 13.</b>	Expressão proteica <i>PPAR<math>\alpha</math></i> (52 kDa) e da Beta-actina (42 kDa), referente ao controle negativo e as amostras transfectadas com o miR-9-5p, miR-17-5p e miR21-5p na linhagem HN13.....	18

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>CEC</b>	Carcinoma Espinocelular
<b>CCP</b>	Câncer de Cabeça e Pescoço
<b>CT</b>	Quimioterapia
<b>DBD</b>	Domínio de Ligação do DNA
<b>DMEM</b>	Meio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EXP5</b>	Exportina 5
<b>FAMERP</b>	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>HPV</b>	Papilomavirus Humano
<b>IKK</b>	Complexo enzimático de quinases
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>LDB</b>	Domínio de Ligação do Ligante
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear Kappa B
<b>ng</b>	nanograma
<b>ng/<math>\mu</math>L</b>	nanograma/ mililitro
<b>nM</b>	nanomolar
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PPAR</b>	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
<b>POL II</b>	Polimerase II
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RXR</b>	Receptor retinóide X
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

FIGUEIREDO, LB. Regulação de genes da família PPAR por epigenética: contribuição à cuidados com a saúde em câncer de cabeça e pescoço. - Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação Stricto Sensu em Enfermagem. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2023.

**Objetivos:** Avaliar a regulação de genes da família *PPAR* em câncer de cabeça e pescoço (CCP) por meio de mecanismo epigenético. **Métodos:** Foram cultivadas células de CCP da cavidade oral (HN13) e hipofaringe (FaDu). Os ensaios de transfecção com os mimics (miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p, controle positivo e negativo) foram realizados em placas de 24 poços por 48h, contendo cerca de 80.000 células/poço, utilizando 100µL de meio Opti-MEN (Invitrogen), 500µL de meio DMEM com 1µL de Lipofectamina<sup>TM</sup> RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) e 10mM de mimético para cada miRNA. Após a transfecção, extraiu-se o RNA total com Tryzol (Applied Biosystems) e proteína com RIPA. A análise de expressão gênica foi realizada pelo método quantitativo de reação de cadeia da polimerase (qPCR) para o *PPARα* e *PPARγ*, Taqman<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific) e GAPDH (Thermo Fisher Scientific) como gene referência, comparando ambos em relação ao controle negativo (RQ=1). Como método para análise da expressão proteica foi realizada a técnica de Western Blotting (WB) para o *PPARα* e *PPARγ*, seguindo as instruções de concentração do fabricante. Como normalizador da técnica foi utilizado o anticorpo Beta-actina. **Resultados:** Os resultados mostraram que houve uma diminuição na expressão do gene *PPARα* em células HN13, com uma redução de 40% para o miR-9-5p (p=0,031), 30% para o miR-17-5p (p=0,035) e 25% para o miR-21-5p (0,031). Para a linhagem FaDu, a expressão do *PPARα* foi reduzida após a transfecção de miR-9-5p (50%, p=0,031), seguida por miR-21-5p (25%, p=0,031) e miR-17-5p (23%, p=0,093), embora, não tenha alcançado significância estatística para o miR-17-5p. Pela expressão proteica, foi possível observar que os microRNAs miR-17-5p e miR-21-5p foi reduzida em relação ao controle negativo; enquanto o miR-9-5p a expressão foi aumentada. Na linhagem HN13 houve um aumento em relação ao grupo controle da expressão do *PPARγ* após transfecção de todos os miRNAs, sendo de 85% (p=0,0878) com o miR-9-5p, 263% (p=0,0454) miR17-5p e 80% (p=0,0335) com o miR-21-5p. O mesmo foi observado na linhagem FaDu, com 80% (p=0,0374) miR-9-5p, 72% (p=0,0580) miR-17-5p e 25% (p=0,0365) com o miR-21-5p. A expressão proteica do *PPARα*, por WB mostrou redução após a transfecção com o miR-17-5p na linhagem HN13, em torno de 52 kDa. As amostras transfectadas com o miR-9-5p e miR-21-5p não apresentaram redução. **Conclusão:** Os resultados mostram que o miR-9-5p e o miR-21-5p possivelmente regulam a expressão do gene *PPARα* nas linhagens HN13 e FaDu. No entanto, o miR-17-5p regula o *PPARα* apenas na linhagem HN13. Entretanto, a expressão do *PPARγ* não foi reduzida após a transfecção de todos os miRNAs. Isso impulsiona a importância destes genes relacionados aos processos metabólicos e de inflamação relacionados ao CCP. Por meio dos resultados, é possível compreender a importância fundamental dos biomarcadores para diagnóstico, tratamento e monitoramento de doenças, como no câncer de cabeça e pescoço, que envolve equipes multidisciplinares, impulsionando avanços cruciais na saúde. O conhecimento deste mecanismo de regulação poderá contribuir nos cuidados à saúde de pacientes com CCP.

**Palavras-Chave:** Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo; Terapêutica; Câncer de cabeça e pescoço; Saúde; Neoplasias; Expressão gênica

## ABSTRACT

FIGUEIREDO, LB. Regulation of PPAR Family genes by epigenetics: contribution to health care in head and neck cancer. - Dissertation (Master's Degree) - Stricto Sensu Postgraduate Program in Nursing. São José do Rio Preto Medical School, São José do Rio Preto, 2023.

**Objectives:** To evaluate the regulation of PPAR family genes in head and neck cancer (HNC) through epigenetic mechanisms. **Methods:** HNC cells from the oral cavity (HN13) and hypopharynx (FaDu) were cultured. The transfection assays with the mimics (miR-9-5p, miR-17-5p and miR-21-5p, positive and negative control) were carried out in 24-well plates for 48 hours, containing around 80,000 cells/well, using 100µL of Opti-MEN medium (Invitrogen), 500µL of DMEM medium with 1µL of Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) and 10mM of mimic for each miRNA. After transfection, total RNA was extracted with Tryzol (Applied Biosystems) and protein with RIPA. Gene expression was analyzed using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method for PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  Taqman™ (Thermo Fisher Scientific) and GAPDH (Thermo Fisher Scientific) as a reference gene, comparing both to the negative control (RQ=1). As a method for analyzing protein expression, the Western Blotting (WB) technique was used for PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , following the manufacturer's concentration instructions. Beta-actin antibody was used as a normalizer for the technique. **Results:** The results showed that there was a decrease in PPAR $\alpha$  gene expression in HN13 cells, with a 40% reduction for miR-9-5p (p=0.031), 30% for miR-17-5p (p=0.035) and 25% for miR-21-5p (0.031). For the FaDu strain, PPAR $\alpha$  expression was reduced after miR-9-5p transfection (50%, p=0.031), followed by miR-21-5p (25%, p=0.031) and miR-17-5p (23%, p=0.093), although it did not reach statistical significance for miR-17-5p. Protein expression showed that the microRNAs miR-17-5p and miR-21-5p were reduced compared to the negative control, while miR-9-5p expression was increased. In the HN13 strain there was an increase in PPAR $\gamma$  expression compared to the control group after transfection of all the miRNAs, 85% (p=0.0878) with miR-9-5p, 263% (p=0.0454) miR17-5p and 80% (p=0.0335) with miR-21-5p. The same was observed in the FaDu strain, with 80% (p=0.0374) miR-9-5p, 72% (p=0.0580) miR-17-5p and 25% (p=0.0365) with miR-21-5p. The protein expression of PPAR $\alpha$  by WB showed a reduction after transfection with miR-17-5p in the HN13 strain, around 52 kDa. Samples transfected with miR-9-5p and miR-21-5p showed no reduction. **Conclusion:** The results show that miR-9-5p and miR-21-5p possibly regulate PPAR $\alpha$  gene expression in the HN13 and FaDu lineages. However, miR-17-5p regulates PPAR $\alpha$  only in the HN13 lineage. However, PPAR $\gamma$  expression was not reduced after transfection of all miRNAs. This highlights the importance of these genes in the metabolic and inflammatory processes related to CCP. Through the results, it is possible to understand the fundamental importance of biomarkers for diagnosis, treatment and monitoring of diseases, such as head and neck cancer, which involves multidisciplinary teams, driving crucial advances in health. Knowledge of this regulatory mechanism could contribute to the health care of patients with HNC.

**Keywords:** Peroxisome proliferator-activated receptors; Therapeutics; Head and neck cancer; Health; Neoplasms; Gene expression

## RESUMEN

FIGUEIREDO, LB. Regulación de genes de la familia PPAR por epigenética: contribución a la atención de la salud em câncer de cabeza y cuello. - Disertación (Maestría) - Programa de Posgrado Stricto Sensu en Enfermería. Facultad de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2023.

**Objetivos:** Evaluar la regulación de los genes de la familia PPAR en el cáncer de cabeza y cuello (CCC) a través de mecanismos epigenéticos. **Métodos:** Se cultivaron células HNC de la cavidad oral (HN13) y de la hipofaringe (FaDu). Los ensayos de transfección con los mímicos (miR-9-5p, miR-17-5p y miR-21-5p, control positivo y negativo) se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos durante 48 horas, con unas 80.000 células/pocillo, utilizando 100µL de medio Opti-MEN (Invitrogen), 500µL de medio DMEM con 1µL de reactivo de transfección Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) y 10mM de mímico para cada miARN. Tras la transfección, se extrajo el ARN total con Tryzol (Applied Biosystems) y las proteínas con RIPA. La expresión génica se analizó mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , Taqman™ (Thermo Fisher Scientific) y GAPDH (Thermo Fisher Scientific) como gen de referencia, comparando ambos con el control negativo (RQ=1). Se utilizó la técnica Western Blotting (WB) para analizar la expresión proteica de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , siguiendo las instrucciones de concentración del fabricante. Se utilizó el anticuerpo beta-actina como normalizador de la técnica. **Resultados:** Los resultados mostraron que se produjo una disminución de la expresión del gen PPAR $\alpha$  en las células HN13, con una reducción del 40% para miR-9-5p (p=0,031), del 30% para miR-17-5p (p=0,035) y del 25% para miR-21-5p (0,031). En la cepa FaDu, la expresión de PPAR $\alpha$  se redujo tras la transfección de miR-9-5p (50%, p=0,031), seguida de miR-21-5p (25%, p=0,031) y miR-17-5p (23%, p=0,093), aunque no alcanzó significación estadística para miR-17-5p. La expresión proteica mostró que los microARN miR-17-5p y miR-21-5p se redujeron en comparación con el control negativo, mientras que la expresión de miR-9-5p aumentó. En la cepa HN13 se produjo un aumento de la expresión de PPAR $\gamma$  en comparación con el grupo de control tras la transfección de todos los miARN, del 85% (p=0,0878) con miR-9-5p, del 263% (p=0,0454) miR17-5p y del 80% (p=0,0335) con miR-21-5p. Lo mismo se observó en la cepa FaDu, con un 80% (p=0,0374) de miR-9-5p, un 72% (p=0,0580) de miR-17-5p y un 25% (p=0,0365) de miR-21-5p. La expresión proteica de PPAR $\alpha$  por WB mostró una reducción tras la transfección con miR-17-5p en la cepa HN13, en torno a 52 kDa. Las muestras transfectadas con miR-9-5p y miR-21-5p no mostraron ninguna reducción. **Conclusión:** Los resultados muestran que miR-9-5p y miR-21-5p posiblemente regulan la expresión del gen PPAR $\alpha$  en los linajes HN13 y FaDu. Sin embargo, miR-17-5p regula PPAR $\alpha$  sólo en el linaje HN13. Sin embargo, la expresión de PPAR $\gamma$  no se redujo tras la transfección de todos los miRNAs. Esto subraya la importancia de estos genes en los procesos metabólicos e inflamatorios relacionados con el CCP. A través de los resultados, es posible comprender la importancia fundamental de los biomarcadores para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de enfermedades, como el cáncer de cabeza y cuello, que implica a equipos multidisciplinares, impulsando avances cruciales en salud. El conocimiento de este mecanismo regulador podría contribuir al cuidado de la salud de los pacientes con HNC.

**Palabras clave:** Receptores activados por proliferadores de peroxisomas; Terapéutica; Cáncer de cabeza y cuello; Salud; Neoplasias; Expresión génica

## 1. INTRODUÇÃO

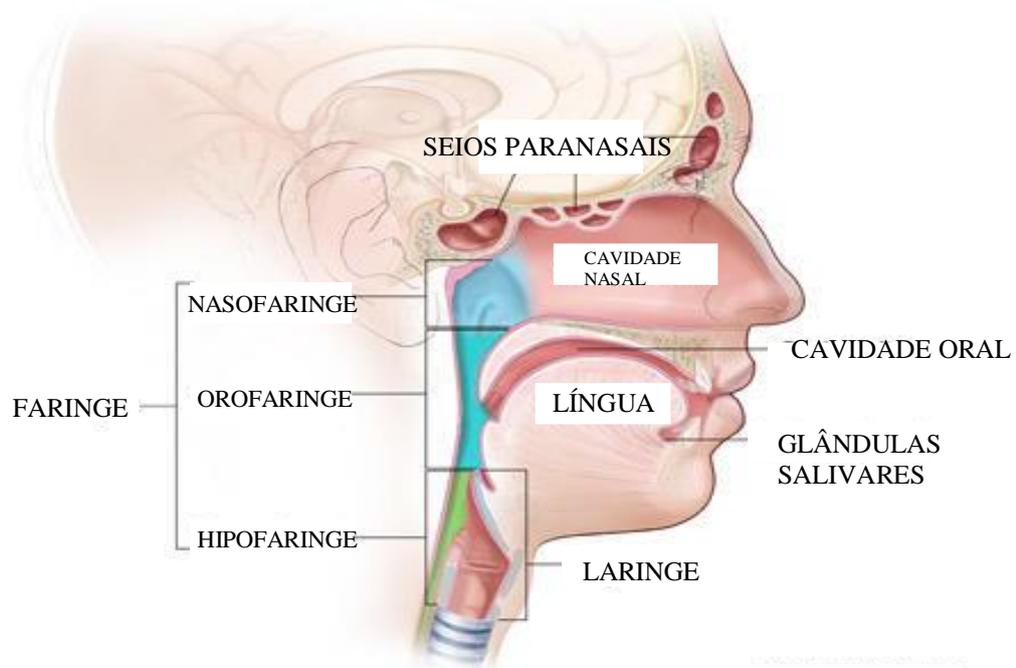
O câncer de cabeça e pescoço (CCP) ocupa a sétima posição entre os tipos de câncer mais frequentes globalmente, registrando anualmente mais de 660.000 novos casos e resultando em aproximadamente 325.000 óbitos <sup>1</sup>. Esta categoria de tumores faz parte de um conjunto diverso de neoplasias que afetam várias regiões anatômicas, como a cavidade oral, laringe, faringe, glândulas salivares, cavidade nasal e seios paranasais <sup>2,3</sup> (Figura 1).

Com base nas projeções apresentadas pelo Instituto Nacional de Câncer do Brasil (INCA) em 2022, estima-se que aproximadamente 23 mil indivíduos de ambos os sexos serão afetados por CCP em todo território brasileiro, no ano de 2023 <sup>4</sup>.

Para auxiliar no prognóstico e diagnóstico, o estadiamento TNM é utilizado para classificar tumores sólidos. É um sistema padrão que melhora o entendimento entre os profissionais da saúde e os permite partilhar de informações essenciais para a investigação do câncer. O sistema tem como base avaliar o tamanho do tumor (T), linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M), com a finalidade de categorizar com precisão o estágio de vários tumores <sup>5</sup>.

Os tratamentos convencionais para o CCP incluem cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (CT). Apesar dos avanços recentes, como terapias direcionadas (inibidores de checkpoint imunológico); as opções terapêuticas atuais frequentemente não alcançam resultados satisfatórios, apresentando altas taxas de recidiva pós-operatória e nenhuma melhora significativa nas taxas de sobrevida em cinco anos <sup>6,7</sup>.

### Regiões anatômicas do Câncer de Cabeça e Pescoço



**Figura 1:** Sítios anatômicos relacionados ao câncer de cabeça e pescoço.

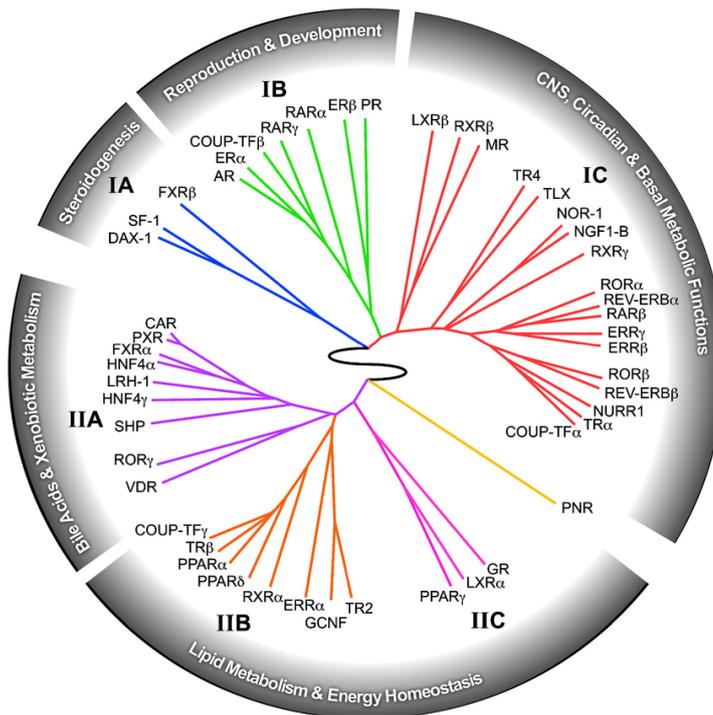
Fonte: <<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>>

Por ser um conjunto variado de cânceres originados de diferentes sítios anatômicos, o CCP é amplamente estudado. Historicamente, o consumo de tabaco e álcool tem sido os principais fatores de risco associados ao CCP. Acredita-se que esses fatores levem à mudanças moleculares difusas e progressivas no epitélio aparentemente normal <sup>8</sup>.

Outro fator significativo que contribui para o aumento da incidência de CCP em todo o mundo, especialmente, em países desenvolvidos, é a infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV). Este é um vírus de DNA de fita dupla, transmitido principalmente por relações sexuais desprotegidas, que causa infecção no epitélio escamoso do corpo humano e é mais comum em câncer de orofaringe <sup>9</sup>. Adicionalmente, a predisposição genética tem sido reconhecida como um fator de risco para o surgimento de CCP em um número cada vez maior de indivíduos <sup>10</sup>.

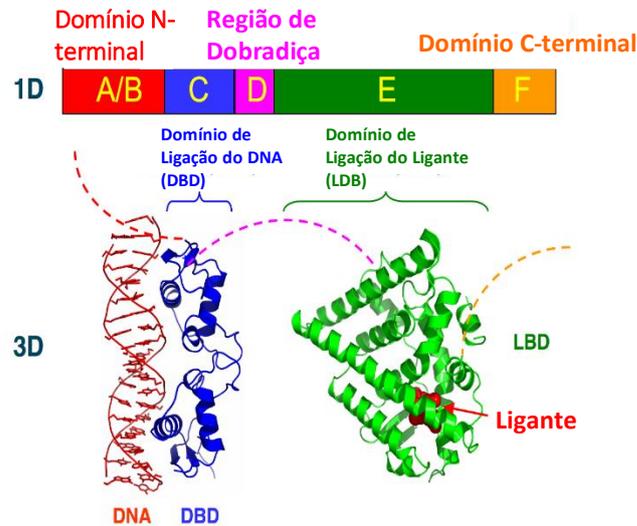
A busca por terapias inovadoras no tratamento do CCP tem sido uma área intensa nas questões médica e científica devido a complexidade dessa doença e assim surgiram estudos sobre os receptores ativados por proliferados de peroxissomos (PPARs) que foram descobertos há cerca de três décadas e pertencem à família de receptores hormonais nucleares (Figura 2). Estes receptores atuam como fatores de transcrição ativos por ligantes, regulando importantes funções metabólicas <sup>11</sup>.

São divididos em três subtipos, *PPAR $\alpha$*  (também conhecido como *NR1C1*), *PPAR $\delta$*  (*PPAR $\beta$*  ou *NR1C2*) e *PPAR $\gamma$*  (*NR1C3*). Cada um deles é codificado por genes específicos localizados em diferentes cromossomos humanos <sup>12</sup>.



**Figura 2:** Árvore da grande família de receptores nucleares.  
Fonte: Bookout et al. 2006, p 796.

A estrutura dos PPARs é caracterizada por diversos domínios funcionais. O Domínio Regulador N-terminal desempenha um papel fundamental ao controlar a atividade do PPAR em resposta a estímulos. Em seguida, encontramos o Domínio de Ligação do DNA (DBD), que tem a função de se ligar a sequências específicas de DNA, regulando assim a expressão gênica. Logo após o DBD, observamos a Região de Dobradilha, que serve como uma conexão estrutural entre o DBD e o Domínio de Ligação do Ligante (LBD), facilitando a comunicação entre esses domínios. O LBD apresenta uma estrutura altamente conservada com uma configuração em forma de "sanduíche", abrigando a cavidade de ligação do ligante. Por fim, o Domínio C-terminal é altamente variável em sequência entre diferentes receptores nucleares, conferindo especificidade funcional ao PPAR e desempenhando um papel importante na sua regulação. Essa estrutura modular permite que os PPARs desempenhem funções cruciais na regulação da expressão gênica e na resposta a diversos estímulos e ligantes específicos <sup>13</sup> (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema da estrutura funcional dos receptores nucleares.

Fonte: <<https://www.ub.edu/nurcaine/en/divulgation/taking-apart-a-receptor/>>

Os receptores PPAR, incluindo tanto o *PPAR $\alpha$*  quanto o *PPAR $\gamma$* , desempenham um papel crucial na regulação do transporte e metabolismo de lipídios. Sua influência é notável na ativação de mitocôndrias e nas vias de oxidação de ácidos graxos peroxissomais. O *PPAR $\alpha$*  assume a responsabilidade de controlar a transcrição de genes constitutivos responsáveis pela codificação de enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos em câncer oral, tornando como alvo terapêutico <sup>14</sup>. Além disso, o *PPAR $\alpha$*  exerce uma ação inibitória direta sobre os genes inflamatórios ativados pelo fator nuclear Kappa B (*NF- $\kappa$ B*) e reduz a expressão da proteína C-reativa, que é induzida pela interleucina 1 (*IL-1*) <sup>15</sup>.

Há uma pesquisa que indica a diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como, o fator de necrose tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ), a Interleucina 6 (*IL-6*) e a Interleucina 1 beta (*IL-1 $\beta$* ), em macrófagos, através da ativação mediada por ligantes do receptor *PPAR $\gamma$*  <sup>16</sup>.

O *TNF- $\alpha$*  é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos, desempenhando um papel vital na homeostase imunológica e na resposta a infecções. Esta citocina, ao induzir o fator de transcrição *NF- $\kappa$ B*, contribui para a formação de um microambiente tumoral com propriedades pró-tumorigênicas. A ativação da via *NF- $\kappa$ B* pelo *TNF- $\alpha$*  resulta na promoção da proliferação celular tumoral e na inibição do apoptose, além de facilitar a infiltração de células inflamatórias no tecido, promover a angiogênese tumoral e aumentar a capacidade de invasão e metástase. O *TNF- $\alpha$*  ativa o complexo enzimático de quinases *IKK*, desencadeando uma cascata de sinalização inflamatória que leva à degradação da *I $\kappa$ B* e à liberação de dímeros de *NF- $\kappa$ B*. Esses dímeros, ao se deslocarem para o núcleo, estimulam genes relacionados ao aumento da proliferação e sobrevivência celular. A expressão de *IKK* é fundamental na via pró-inflamatória e desempenha um papel crucial na ativação e expressão do *NF- $\kappa$ B* mediada pela *TNF- $\alpha$* , conforme evidenciado por estudos recentes (Figuras 4 e 5) <sup>17</sup>.

O *PPAR $\gamma$*  desempenha um papel importante no controle de genes envolvidos em vias metabólicas, como a glicose e a biossíntese lipídica. A ativação do *PPAR $\gamma$*  é observada em várias células cancerígenas, apresentando propriedades antimetastáticas, antiproliferativas, antiapoptóticas e anti-inflamatórias. Evidências indicam que o *PPAR $\gamma$*  está envolvido na prevenção do câncer, especialmente, no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço<sup>18</sup>.

Assim como em muitos tumores sólidos, foi observada uma elevada expressão de *PPAR $\beta$*  e *PPAR $\gamma$*  em CCP<sup>19,20</sup>. Além disso, *PPAR $\gamma$*  foi identificado em adenomas pleomórficos e carcinomas adenóides císticos das glândulas salivares, porém não estava presente nos tecidos saudáveis correspondentes<sup>19</sup>.

A ativação do *PPAR $\gamma$*  por agonistas (substância que se liga e ativa receptores nucleares) pode estimular a diferenciação celular, inibir o crescimento e promover a apoptose em células cancerígenas<sup>21</sup>. Portanto, foram conduzidos testes com ligantes sintéticos do *PPAR $\gamma$*  como possíveis agentes anticancerígenos e quimiopreventivos em diversos tipos de tumores, incluindo o CCP. No entanto, o papel preciso do *PPAR $\gamma$*  na carcinogênese e os efeitos dos compostos direcionados a ele ainda não foram completamente esclarecidos<sup>19,20</sup>.

De fato, foi comprovado que os ligantes do *PPAR $\gamma$*  impactam a multiplicação de células endoteliais, bem como a sua capacidade de migração, o que resulta na regulação da angiogênese. Além disso, os ligantes do *PPAR $\gamma$*  podem ser explorados na terapia do câncer para direcionar a angiogênese induzida pela hipóxia, embora os mecanismos específicos ainda permaneçam incertos. Uma vez que a angiogênese desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do tumor, na resistência ao tratamento e na disseminação metastática, a capacidade de controlar a angiogênese por meio dos ligantes do *PPAR $\gamma$*  pode, portanto, ter desempenhado um papel importante nos benefícios clínicos observados em alguns casos<sup>22</sup>.

As células cancerígenas utilizam o metabolismo de lipídios para obter energia, componentes para suas membranas e moléculas de sinalização essenciais para sustentar a proliferação, sobrevivência, invasão, metástase em resposta ao ambiente tumoral e à terapia. Portanto, a desregulação do metabolismo lipídico é umas das alterações metabólicas mais predominantes na progressão tumoral<sup>19</sup>.

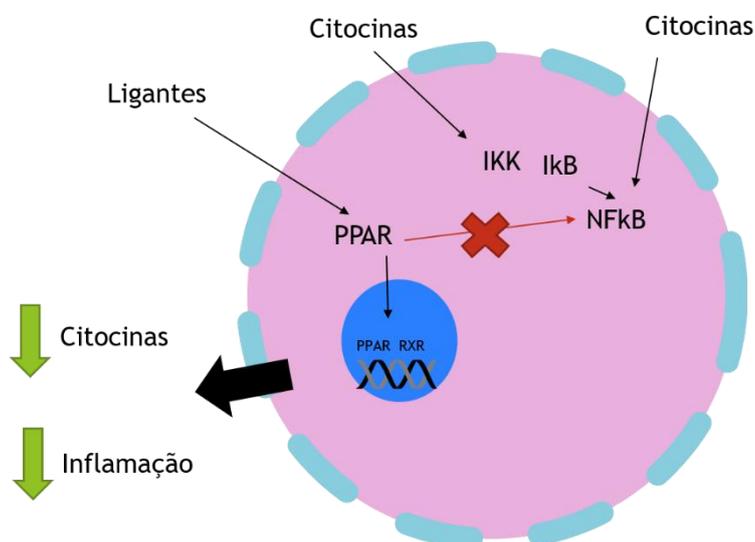
Quando ativado, o *PPAR $\alpha$*  estimula a expressão de genes relacionados na oxidação dos ácidos graxos, facilitando a quebra destes em unidades de energia como o acetil-coA, processo chamado de  $\beta$ -oxidação. O acetil-coA é transporta até a mitocôndria onde participa do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória, produzindo ATP. Dessa forma, o *PPAR $\alpha$*  otimiza a

utilização de ácidos graxos como fonte de energia, desempenhando um papel vital no metabolismo energético <sup>20</sup>.

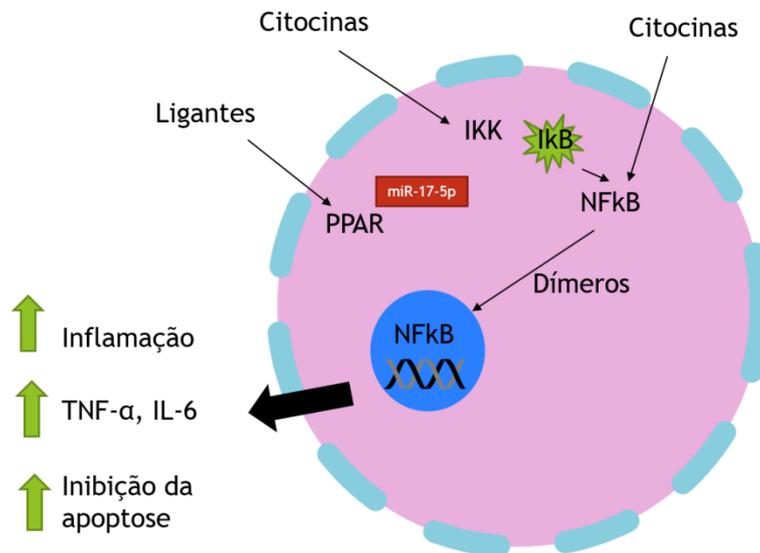
Como as neoplasias podem surgir de diversos tipos de células e por diferentes mecanismos patológicos e é natural que existam muitos tipos de câncer com características variadas. Um diagnóstico preciso é crucial para um tratamento eficaz. O microRNA (miRNA) tem sido utilizado com sucesso para diagnosticar cânceres específicos como pulmão, mama, colorretal, ovários e cervical. A pesquisa atual permite identificação ampla e especializada, até mesmo para câncer de origem desconhecida <sup>23</sup>.

As regulações transcricionais e epigenéticas surgiram como componentes fundamentais na determinação fisiológica do metabolismo celular. Estímulos internos ou externos podem alterar o caminho celular, reorganizando a estrutura da cromatina e, conseqüentemente, resultando na expressão ou repressão gênica. Este processo permite que as células adquiram modificações epigenéticas associadas às características tumorais <sup>10</sup>. Estes mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificação nas histonas e RNA não-codificante (miRNA), que têm a capacidade de regular a expressão gênica sem modificar a sequência do DNA <sup>24</sup>.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas, compostos por aproximadamente 18 a 22 nucleotídeos <sup>23</sup>. Sua biogênese ocorre no núcleo e, posteriormente, são transportados para o citoplasma para processos adicionais. A diversidade de miRNAs humanos é ampla, e a maioria deles podem regular a expressão de vários genes <sup>25</sup>. Eles têm um papel importante em funções biológicas, como embriogênese, desenvolvimento celular e homeostase. Além disso, também estão implicados na tumorigênese e no desenvolvimento do câncer <sup>7</sup>.

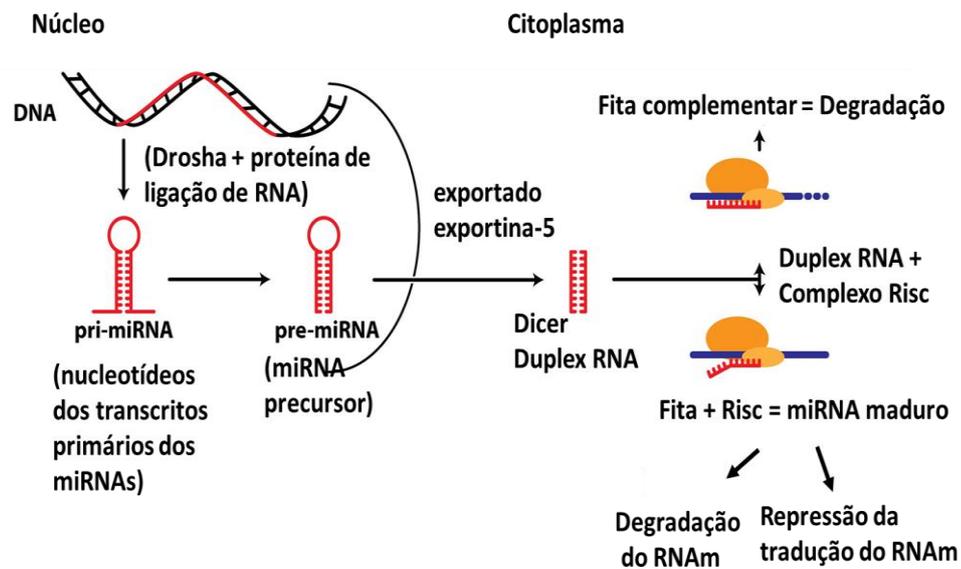


**Figura 4:** Representação da via de sinalização *PPAR* $\alpha$  / *PPAR* $\gamma$  / NF- $\kappa$ B sem a influência regulatória dos microRNAs. Fonte: Perez et al, 2023



**Figura 5:** Representação da via de sinalização *PPAR* $\alpha$  / *PPAR* $\gamma$  / NF- $\kappa$ B com a influência regulatória dos microRNAs. Fonte: Perez et al, 2023

A biogênese dos miRNAs envolve uma série de etapas coordenadas que resultam na formação de um pequeno RNA funcional. Este processo começa com a transcrição de um pri-miRNA (miRNA primitivo) pela RNA polymerase II (Pol II) no núcleo celular. Uma vez transcrita, a molécula de pri-miRNA passa por um processo de clivagem, ocorrendo graças a ação de uma enzima complexa conhecida como microprocessador (Drosha-DGCR8). Este evento de clivagem leva a formação do pré-miRNA, uma estrutura intermediária. Este é, então, transportado do núcleo para o citoplasma por uma proteína denominada Exportina 5 (Exp5), que faz parte da família de receptores de transporte nuclear (Figura 6)<sup>26</sup>.



**Figura 6:** Esquema da biogênese de microRNAs. Fonte: Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. Brigid Ryan, Greig Joilin and Joanna M. Williams. *Front. Mol. Neurosci.*, 23 February 2015. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00004>.

Chegando ao citoplasma, o pré-miRNA passa por outra clivagem, agora executada pela enzima Dicer. Essa clivagem remove um loop terminal, gerando um pequeno RNA de fita dupla, conhecido como miRNA duplex. O próximo passo envolve a seleção de uma das fitas do miRNA duplex para ser carregada em uma proteína da família Argonauta, geralmente, referida como Ago. Após essa carga, ocorre a remoção da fita complementar àquela que permanecerá funcional, ou seja, a fita passageira é eliminada. Isso resulta na formação do miRNA maduro de fita simples. Este miRNA desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica. Ele é capaz de orientar a proteína Ago, formando o chamado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), para alvos de RNA que possuem sequências complementares ao miRNA. Um vez que o RISC se liga a esses alvos, ocorre a clivagem do RNA alvo ou a inibição da tradução, resultando em uma regulação negativa da expressão gênica <sup>26</sup>.

O miRNA miR-21-5p é amplamente investigado no CCP, sendo um dos mais frequentes entre eles e de grande importância, devido à sua superexpressão em diversos tipos de câncer. Dessa maneira, intensos estudos sobre suas funções e potenciais aplicações como biomarcador e alvo terapêutico têm sido investigados <sup>7</sup>. Outro miRNA de relevância no CCP é o miR-9-5p, que frequentemente apresenta desregulação para esta doença. Estudos têm evidenciado que a superexpressão do miR-9-5p está associada a uma maior sobrevivência em

pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) nasossinusal, sugerindo que este miRNA possa ser um biomarcador valioso para prever a resposta à radioquimioterapia <sup>7</sup>.

Foi observado que o miR-17-5p está implicado em diversos tipos de cânceres, incluindo pancreático, gástrico, de bexiga, hepatocelular, de mama, pulmonar e cervical, e desempenha um papel significativo na regulação do ciclo celular. Análises demonstraram níveis elevados de expressão do miR-17-5p nos tecidos de carcinoma nasofaringe em comparação com o grupo controle. Além disso, verificou-se um aumento na expressão do miR-17-5p no sangue de pacientes com câncer de nasofaringe <sup>27</sup>.

Vale a pena ressaltar que o CCP faz parte de um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que afetam diversas estruturas anatômicas. Representando um desafio significativo para saúde pública. Esse tipo de câncer é frequentemente diagnosticado em estágios avançados da doença, o que reduz a eficácia dos tratamentos e diminui a qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, a pesquisa voltada para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a esta doença é crucial para desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes. A investigação dos genes *PPARα* e *PPARγ*, bem como, dos miRNAs, surgem como uma estratégia promissora devido à sua influência na carcinogênese e progressão tumoral.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

A partir das evidências apresentadas, o propósito deste estudo foi avaliar a expressão dos genes *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço (CCP), após a transfecção por meio de miRNAs.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão e regulação dos genes *PPAR $\alpha$* /*PPAR $\gamma$*  nas linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço (CCP) HN13 e FaDu por meio dos miRNAs hsa-miR-9-5p, hsa-miR-17-5p e hsa-miR-21-5p;

- Estabelecer correlações entre a expressão dos miRNAs e a expressão dos genes *PPAR $\alpha$* /*PPAR $\gamma$* ;

- Quantificar a expressão proteica de *PPAR $\alpha$* /*PPAR $\gamma$* , após transfecção, nas duas linhagens celulares de CCP.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Análises de Bioinformática

Foram realizadas análises nos bancos de dados *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) por meio do portal UAL-CAN (disponível <https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>)<sup>28</sup>, para identificar o perfil de expressão dos genes *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  em amostras de CCP em relação às amostras normais. Estes dados compreenderam análises de acordo com a classificação do tumor e sobrevida para cada um dos genes estudados.

#### 3.2 Cultivo e manutenção de células

As linhagens selecionadas para cultivo nesse estudo foram a HN13 (oral squamous cell carcinoma)<sup>29</sup> e a FaDu (hypopharyngeal carcinoma)<sup>30</sup>, em que ambas as linhagens representam CCP na cavidade oral e hipofaringe, respectivamente.

As células foram mantidas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura DMEM high glucose (Gibco), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 100U/mL de Penicilina sódica e 100 mg/ML de Estreptomicina (Gibco) e 1% de L-glutamina (Gibco), a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura dos frascos foi trocado a cada três dias, ou conforme a necessidade. As células foram tripsinizadas ao atingirem 80% de confluência nos frascos de cultura, e o número de células necessário para a transfecção foi obtido na terceira passagem nas duas linhagens celulares (HN13 e FaDu). Logo depois, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e foi adicionada Tripsina/EDTA (0,125%/0,05%). A tripsinização foi interrompida pela adição de meio de cultura completo. As células foram então distribuídas em novos frascos para serem armazenadas ou utilizadas na repetição dos experimentos.

#### 3.3 Protocolo de Transfecção

A transfecção foi realizada em placas de 24 poços contendo aproximadamente 80.000 células, 496  $\mu\text{L}$  de meio DMEM sem antibiótico, 100  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM (Invitrogen), 10mM de *mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA Mimic* Controle Negativo (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ou *miRNA mimic* Controle Positivo (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ou os *mimics* “*mirVana*<sup>®</sup> *miRNA mimic* hsa-miR-9-5p (MC10022 Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ou “*mirVana*<sup>®</sup> *miRNA mimic* hsa-miR-17-5p (MC12412 Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA)” ou “*mirVana*<sup>®</sup> *miRNA mimic* hsa-miR-21-5p (MC10206 Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1 $\mu\text{L}$  de Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). As placas foram incubadas a 37C° em 5% de CO<sub>2</sub> atmosfera por 48 horas. Depois das primeiras 24 horas, foi realizada a troca do meio das placas. Após o tempo de incubação, as células foram coletadas para extração de RNA e proteína, com posterior análise da expressão gênica, de miRNAs e de proteínas. Foram realizados três experimentos independentes, seguindo as mesmas condições experimentais.

### 3.4 Expressão gênica e de microRNA

O RNA total foi extraído da cultura de células com Trizol (Invitrogen), de acordo instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O cDNA foi obtido usando 20  $\mu\text{L}$  de reação contendo 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, por meio do kit High Capacity cDNA Archive (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. Foi utilizado o kit TaqMan - MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) para a obtenção de cDNA a partir dos miRNAs nas amostras. As análises de expressão gênica e de miRNAs foram realizadas em duplicata. A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizada para quantificar a expressão dos genes e dos miRNAs, utilizando sondas Taqman MGB ligadas ao fluoróforo FAM (Applied Biosystems) para os genes *PPAR $\alpha$*

(Hs00947538\_m1) e *PPAR $\gamma$*  (Hs01115510\_m1) e para os miRNAs estudados, segundo as instruções do fabricante.

Para normalizar a expressão do miRNA dos genes *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$* , foram avaliados dois genes de referência: *GAPDH* (Hs99999905\_m1) e *RPLPO* (Hs00420895\_gH). Para normalização da expressão dos miRNAs hsa-miR-9-5p (Id: 000583), hsa-miR-17-5p (Id: 2308), hsa-miR-21-5p (Id: 000397), e hsa-miR-1 [(controle positivo) Id: 002222] foi utilizado o controle endógeno RNU48 (Id: 001006). As expressões gênicas e dos miRNAs foram normalizadas com a quantificação relativa das amostras do controle negativo (RQ=1).

### 3.5 Análise da expressão gênica

A quantificação do RNA e miRNA nas amostras utilizou os valores de Ct pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para cada amostra, o valor de  $\Delta Ct$  foi determinado, subtraindo a média das duplicatas dos valores de Ct do gene ou miRNA de interesse, da média das duplicatas dos valores de Ct do gene ou miRNA referência. Posteriormente, para determinar o  $\Delta\Delta Ct$ , o valor de  $\Delta Ct$  de cada amostra foi subtraído do valor da média de  $\Delta Ct$  das amostras normais. Este último valor foi adicionado à fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e para cada amostra a quantidade de transcrito (N vezes > ou < que o normal) <sup>31</sup>.

### 3.6 Extração e expressão Proteica

A proteína total foi extraída das células, após transfecção, usando tampão RIPA (Sigma Aldrich, San Louis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de proteína foram quantificadas usando o BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Posteriormente, as amostras foram submetidas a técnica de Western Blotting (WB) para análise de expressão proteica, com aplicação de 25 $\mu$ g de proteína de cada amostra. A proteína *PPAR $\alpha$*  foi detectada usando o anticorpo primário policlonal PPAR Alpha

(Invitrogen, Waltham, MA, EUA PA1-822A), diluído na proporção de 1:500. O anticorpo secundário correspondente (Anti-rabbit Abcam, Cambridge, UK ab97051) foi usado na diluição de 1:5000. Como controle endógeno foi utilizado o anticorpo  $\beta$ -actina (15G5A11/E2). A detecção foi realizada por quimioluminescência por meio do reagente ECL Select Western Blotting Detection (GE Healthcare), no equipamento e Software Fusion FX Vilber Lourmat.

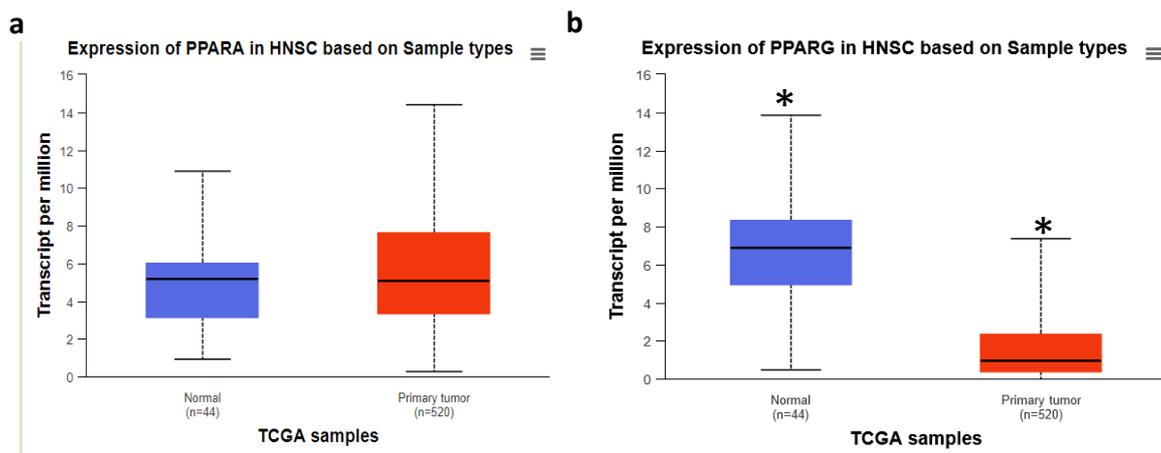
### **3.7 Análise Estatística**

Para análise de expressão de RNA foi utilizado o teste T para dados com distribuição normal ou teste de Wilcoxon para dados não paramétricos. Foi utilizada correlação de Spearman para avaliar a relação entre os níveis de expressão de miRNA e mRNA. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Foram realizadas, também, uma correlação entre os miRNAs e os níveis de expressão do gene *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$* . As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 8.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Bioinformática

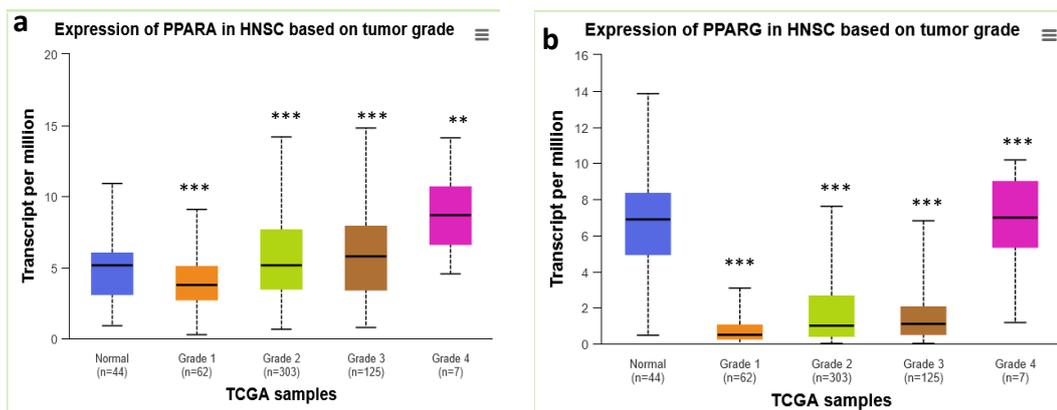
A análise realizada no TCGA<sup>28</sup> demonstrou que a expressão do gene *PPAR $\gamma$*  (Figura 7b) é reduzida em amostras de tumores primários de CCP em comparação ao tecido normal ( $p < 0,05$ ), enquanto que para o gene *PPAR $\alpha$*  não houve diferença (Figura 7a).



**Figura 7:** Dados de expressão do TCGA do *PPAR $\alpha$*  (a) e *PPAR $\gamma$*  (b) em CCP, comparando com tecido normal e tumor. \*Valor  $p < 0,05$ .

Ao comparar a expressão dos genes *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  de acordo com os diferentes estágios do tumor, classificados como bem diferenciados (Grau 1), moderadamente diferenciados (Grau 2), pouco diferenciados (Grau 3) e não diferenciados (Grau 4). Observou-se significância estatística ao se comparar estes níveis de expressão com as células normais (Figura 8).

A análise da expressão do gene *PPAR $\alpha$*  (a) em tecidos normais revelou aumento da expressão apenas no estágio de grau 4 ( $p = 0,008$ ), ao passo que no grau 1 demonstrou significância no grau 2 ( $p = 0,00005$ ), 3 ( $p = 0,0001$ ) e 4 ( $p = 0,0001$ ). Em relação à expressão do *PPAR $\gamma$*  observou-se significância do tecido normal nos graus 1 ( $p = 0,0000001$ ), 2 ( $p = 0,00001$ ) e 3 ( $p = 0,0000004$ ), enquanto o grau 1 apresentou com os estágios 2 ( $p = 0,00006$ ), 3 ( $p = 0,0002$ ) e 4 ( $p = 0,0002$ ).

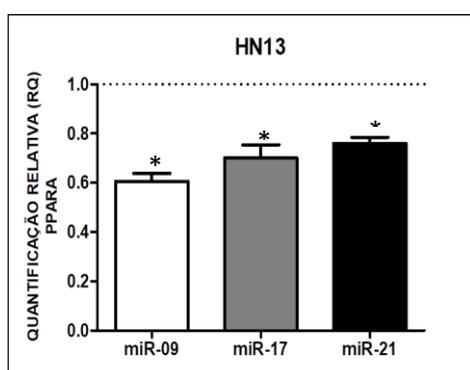


**Figura 8:** Expressão dos genes do banco de dados do TCGA para os genes *PPARα* (a) e *PPARγ* (b), comparando os diferentes estágios tumorais em relação ao tecido normal. \*Considerado  $p < 0,05$ .

## 4.2 Transfecção

A eficiência da transfecção foi analisada por meio da expressão do gene *TWF1* (*PTK9*) nas amostras transfectadas com controle positivo. Após a técnica, os níveis de expressão do *TWF1* em relação ao controle negativo foi reduzida em 99% ( $RQ = 0,003$ ) na linhagem HN13 e de aproximadamente 46% ( $RQ = 0,540$ ) na linhagem FADu.

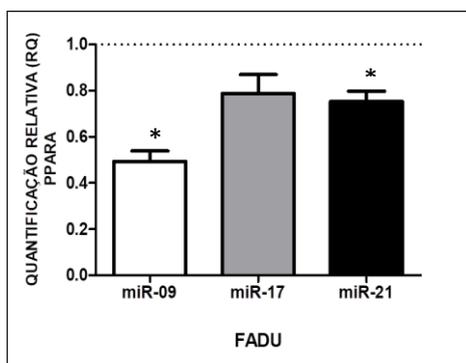
A análise da expressão gênica, para a linhagem HN13 mostrou redução na expressão do gene *PPARα* de 40% ( $p=0,031$ ), após a transfecção com miR-9-5p, 30% ( $p=0,035$ ) com miR-17-5p e 25% ( $p=0,031$ ) com miR-21-5p (Figura 9).



**Figura 9:** Expressão relativa do *PPARα* após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem HN13. \*Valor de  $p < 0,05$ .

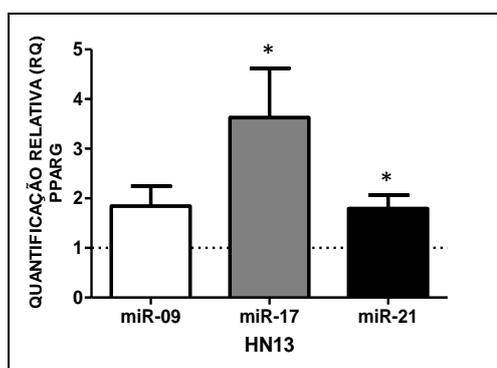
Para a linhagem FaDu a maior redução na expressão do *PPARα* observada foi após a transfecção com miR-9-5p, seguida do miR-21-5p e por último o miR-17-5p. Essa redução foi

significante apenas após a transfecção com miR-9-5p e miR-21-5p, com redução de 50% ( $p=0,031$ ) e 25% ( $p=0,031$ ), respectivamente. Nas células transfectadas com miR-17-5p observou-se uma redução de 23%, embora, não estatisticamente significativa ( $p=0,93$ ) (Figura 10).



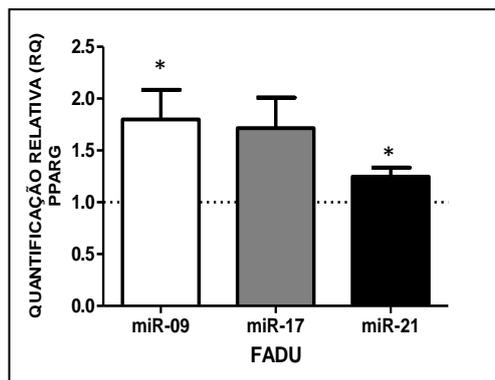
**Figura 10:** Expressão relativa ao *PPARα* após a transfecção com os miRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem FaDu. \*Valor de  $p < 0,05$ .

Após a transfecção com os miRNAs, observou-se um aumento na expressão do gene *PPARγ* em todas as linhagens celulares testadas, incluindo HN13, em resposta à introdução dos miRNAs miR-9-5p ( $p=0,0878$ ), miR-17-5p ( $p=0,0454$ ) e miR-21-5p ( $p=0,0335$ ) (Figura 10).



**Figura 11:** Expressão relativa ao *PPARγ* após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem HN13. \*Valor de  $p < 0,05$ .

Os resultados da análise da expressão do gene *PPARγ* revelaram que a regulação desse gene por meio dos miRNAs miR-9-5p ( $p=0,0374$ ), miR-17-5p ( $p=0,0580$ ) e miR-21-5p ( $p=0,0365$ ) específicos não ocorreu na linhagem celular FaDu como visto também na linhagem HN13 (Figura 12). Em contraste com o *PPARα*, em que a regulação por estes miRNAs foi evidente, as linhagens FaDu e HN13 apresentaram notáveis resistências a este mecanismo de regulação da expressão do *PPARγ*.



**Figura 12:** Expressão relativa ao *PPAR $\gamma$*  após a transfecção com os miRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem FaDu. \*Valor de  $p < 0,05$ .

### 4.3 Expressão proteica após transfecção

Foi empregada a técnica de Western Blotting (WB) para analisar a expressão proteica do PPAR $\alpha$  (PPAR alpha Polyclonal Antibody PA1-822A, Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções de concentração do fabricante. Como normalizador da técnica de expressão proteica utilizou-se o anticorpo da  $\beta$ -actina (15G5A11/E2). Notou-se uma diminuição na expressão da proteína PPAR $\alpha$  após transfecção dos miRNAs miR-17-5p e miR-21-5p em relação ao controle negativo, enquanto a expressão da proteína com miR-9-5p aumentou. No entanto, apenas a transfecção com miR-17-5p na linhagem HN13 resultou em uma redução na expressão proteica do *PPAR $\alpha$* , visualizada no WB em torno de 52 kDa (Figura 13).

As amostras transfectadas com miR-9-5p e o miR-21-5p não apresentaram redução. Para as amostras de FaDu não foi possível observar a expressão do PPAR $\alpha$ .



**Figura 13:** Expressão proteica PPAR $\alpha$  (52 kDa) e da Beta-actina (42 kDa), referente ao controle negativo e as amostras transfectadas com o miR-9-5p, miR-17-5p e miR21-5p na linhagem HN13.

### 4.4 Dificuldades encontradas

Até o momento, a conclusão da técnica de Western Blotting com o gene *PPAR $\gamma$*  na linhagem celular FaDu tem sido desafiadora devido à dificuldade de observar claramente as bandas na membrana. É relevante ressaltar que este estudo continuará a análise das proteínas restantes, o que é essencial para a posterior publicação do artigo. Além disso, existe a possibilidade de incluir ou alterar novas linhagens celulares de CCP no estudo.

## 5. DISCUSSÃO

A abordagem do câncer de cabeça e pescoço (CCP) como um processo heterogêneo, envolvendo desde mutações genéticas causadas por agentes cancerígenos até a desregulação dos processos metabólicos; enfatiza a complexidade dessa doença. A identificação do tabagismo como um fator causal primário destaca a necessidade de prevenção e conscientização sobre os riscos associados ao tabaco. Além disso, a referência à busca por mecanismos epigenéticos nas células cancerosas reflete os avanços na pesquisa biomédica, abrindo portas para terapias mais personalizadas e eficazes. Este entendimento holístico do CCP é crucial para desenvolver estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento mais eficazes, com o objetivo de melhorar as perspectivas de pacientes afetados por esta complexa doença <sup>32</sup>.

Os dados do TCGA<sup>28</sup> revelam que, em comparação com o tecido normal, a análise deste estudo demonstrou uma maior expressão do gene *PPAR $\gamma$*  em tumores primários de CCP, enquanto a expressão de *PPAR $\alpha$*  não apresentou diferenças significativas.

Os tumores de CCP podem ser classificados em diferentes estágios de diferenciação, que indicam quão semelhantes às células cancerosas são às células normais. Por meio das estatísticas apresentadas pela análise do TCGA<sup>28</sup>, foi possível observar que o gene *PPAR $\alpha$*  teve apenas significância no estágio 4 em relação ao tecido normal, sendo assim uma participação da atividade da expressão alterada do gene. Já a expressão do gene *PPAR $\gamma$*  apresentou relevância estatística nos estágios de grau 1, 2 e 3, confirmando sua influência e seu impacto no desenvolvimento tumoral em CCP.

O *PPAR $\alpha$*  exerce um papel na regulação da via metabólica do NF- $\kappa$ B, fundamental na ação inibitória da inflamação no microambiente tumoral<sup>14, 15</sup>. Neste estudo, observou-se uma redução na expressão do gene *PPAR $\alpha$*  após a introdução dos miméticos miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p por meio de transfecção em linhagens HN13 e FaDu. Uma pesquisa revelou que o miR-9-5p tem a capacidade de direcionar o 3'UTR do fator de transcrição *PPAR $\alpha$* , resultando na redução da expressão desse gene em carcinoma hepatocelular, o que, por sua vez, está associado a um aumento na invasão e na proliferação tumoral <sup>33</sup>.

Em outra pesquisa conduzida por Yete e Saranath em 2020, foi observado que a regulação negativa dos miRNAs miR-17-5p e miR-21-5p está correlacionada com a progressão clínica da doença em pacientes com câncer oral e com o desenvolvimento tumoral <sup>34</sup>. De acordo com os achados de outro estudo, a superexpressão do miR-17-5p resultou na inibição da expressão do gene *PPAR $\alpha$*  em casos de câncer de próstata <sup>35</sup>.

Esses miRNAs têm a capacidade direta de influenciar a expressão desse gene e, por conseguinte, desempenham um papel na promoção da progressão tumoral do CCP. O miR-17-5p também exibe propriedades oncogênicas em cânceres de mama, hepatocelular e gástrico. Elevados níveis de miR-17-5p foram identificados em tecidos tumorais sólidos de câncer hepático, gástrico e colorretal, além de amostras de soro, consolidando assim seu potencial como biomarcador. Adicionalmente, o nível de superexpressão do miR-17-5p pode estar associado à evolução da condição clínica da doença e à sensibilidade aos tratamentos quimioterápicos<sup>36,37</sup>.

Em relação ao *PPAR $\gamma$* , nossos resultados destacam que, mesmo após a transfecção dos mimics miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p, não foi observada redução na expressão do gene *PPAR $\gamma$*  nas linhagens HN13 e FaDu. Estes resultados sugerem que a ação destes mimics não resultou em uma diminuição significativa da expressão do *PPAR $\gamma$*  nessas linhagens celulares. A ativação do *PPAR $\gamma$*  é associada à propriedade antiproliferativas, pró-apoptóticas, pró-diferenciação, anti-inflamatórias e antimetastática em uma variedade de linhagens celulares cancerosas<sup>18</sup>.

Como abordado em um estudo realizado com 49 pacientes com CEC de língua, sugeriram ao *PPAR $\gamma$*  um papel de prevenção ao câncer, pois uma expressão moderada ou intensa foi encontrada em aproximadamente 60% dos cânceres, enquanto a expressão mínima foi encontrada no epitélio histologicamente normal. Ainda neste estudo, este gene foi associado a redução da profundidade de invasão celular, associando também a uma maior sobrevivência global<sup>18</sup>.

A alta expressão do gene *PPAR $\gamma$*  encontrado em nossos resultados pode estar associada à observação de elevada expressão deste gene em câncer de células parotídeas e em tumores das glândulas salivares, como adenomas pleomórficos e carcinomas adenóides císticos. Além disso, a presença de *PPAR $\gamma$*  em tumores e sua ausência nos tecidos saudáveis correspondentes sugerem que a superexpressão desse gene pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento e progressão tumoral. Isso pode indicar que *PPAR $\gamma$*  desempenha um papel importante na fisiopatologia desses tumores e pode ser um alvo potencial para terapias direcionadas<sup>19,20</sup>.

Curiosamente, Ou e colaboradores observaram que a superexpressão do miRNA miR-9-5p resulta na redução dos níveis de várias citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6. Além disso, por meio de ensaios de luciferase, demonstraram a capacidade do miR-9-5p de exercer uma regulação negativa sobre NF- $\kappa$ B<sup>38</sup>. Dessa forma, a elevação da expressão do gene

*PPAR $\gamma$*  nas linhagens HN13 e FaDu após a transfecção pode ser explicada pela redução da ativação de NF- $\kappa$ B, sugerindo que o miRNA em questão atua de maneira indireta nessa via.

Ao induzir a baixa expressão do miR-17-5p por meio de um mimetizador, nossos resultados revelaram um aumento na expressão gênica do *PPAR $\gamma$*  em ambas as linhagens de CCP. Assim, é plausível considerar que o miR-17-5p não tenha regulado efetivamente o gene de maneira completa. Conforme a literatura sugere, a superexpressão do miR-17-5p, geralmente, atua suprimindo o ponto de controle entre as fases G1 e S do ciclo celular, resultando em um aumento na taxa de proliferação das células cancerosas e na inibição do processo de apoptose, o que provavelmente não ocorreu em nosso experimento<sup>39</sup>.

Resumidamente, nossos achados indicam que a superexpressão dos miRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p provocou uma regulação negativa do gene *PPAR $\alpha$*  em ambas as linhagens celulares de CCP. Por outro lado, observou-se um aumento na expressão do gene *PPAR $\gamma$*  após a transfecção com os mesmos miméticos nas duas linhagens analisadas.

Neste estudo o *PPAR $\alpha$*  pode ser um potencial biomarcador o que não pode ser observado com o gene *PPAR $\gamma$* . A descoberta de biomarcadores tem o potencial de permitir a identificação precoce, monitoramento, melhoramento de terapias, pesquisas clínicas e desenvolvimento de medicamentos no CCP e destaca a importância de equipes multidisciplinares na área da saúde, como médicos, biólogos, bioinformaticistas e enfermeiros que colaboram para interpretar e aplicar esses marcadores de maneira holística<sup>40</sup>.

Estes profissionais, em especial a equipe de enfermagem desempenham um papel vital no cuidado de pacientes que lidam com o desafio do CCP. As complexidades únicas associadas a esse tipo de câncer, decorrentes de sua localização anatômica e dos potenciais efeitos na fala, deglutição e respiração, destacam a necessidade essencial dos enfermeiros nesse contexto<sup>41</sup>.

A desregulação dos miRNAs está associada a processos-chave no desenvolvimento do câncer. Devido à capacidade de regular múltiplos genes, os miRNAs estão emergindo como biomarcadores cruciais para diagnóstico e prognóstico do câncer. Combinar terapia de miRNA com tratamentos convencionais, como quimioterapia e imunoterapia, oferece abordagens inovadoras<sup>42</sup>.

Geralmente, considera-se que um biomarcador tumoral seja uma modificação molecular ou um evento relacionado a um processo que espelha o estado de uma doença maligna, sendo detectável por um ou mais exames ou testes. No entanto, a validade clínica de um biomarcador tumoral está intrinsecamente ligada à sua precisão, capacidade de reprodução e confiabilidade, essenciais para orientar a prática clínica. No caso do CCP, diversos

biomarcadores emergiram, apresentando resultados promissores no que diz respeito ao diagnóstico, detecção precoce e prognóstica da doença<sup>43</sup>.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa indicam que os miRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p regulam a expressão do gene *PPAR $\alpha$* , com implicações significativas na regulação de processos metabólicos e terapias relacionadas às doenças associadas ao *PPAR $\alpha$* . Além disso, foi observada uma resistência à regulação no gene *PPAR $\gamma$* , o que pode ser clinicamente relevante em contextos em que a ativação do *PPAR $\gamma$*  é desejada, como no tratamento de condições como diabetes, obesidade e câncer. Quanto aos biomarcadores, a pesquisa contínua é vital para o diagnóstico precoce e tratamento eficaz, explorando marcadores genéticos e epigenéticos em estudos clínicos de larga escala para aprimorar a gestão da doença por equipes multidisciplinares. Estes biomarcadores têm potencial para melhorar o diagnóstico, prognóstico e terapias personalizadas, contribuindo para uma abordagem mais eficaz no tratamento desta doença complexa. A pesquisa contínua é vital para compreender plenamente esses mecanismos e aprimorar terapias direcionadas ao câncer.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*. 2022 Nov;233(9):780-786. doi: 10.1038/s41415-022-5166-x. PMID: 36369568; PMCID: PMC9652141.
2. Santos Carvalho R, Scapulatempo-Neto C, Curado MP, de Castro Capuzzo R, Marsico Teixeira F, Cardoso Pires R, Cirino MT, Cambrea Joaquim Martins J, Almeida Oliveira da Silva I, Oliveira MA, Watanabe M, Guimarães Ribeiro A, Caravina de Almeida G, Reis RM, Ribeiro Gama R, Lopes Carvalho A, de Carvalho AC. HPV-Induced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas in Brazil: Prevalence, Trend, Clinical, and Epidemiologic Characterization. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021 Sep;30(9):1697-1707. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-21-0016. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34155066.
3. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Jan 2;382(1):60-72. doi: 10.1056/NEJMra1715715. PMID: 31893516.
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2022: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2022. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2022>. Acesso em: 5 de agosto de 2023.
5. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. 2023 Feb 13. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31985980.
6. Diez-Fraile A, De Ceulaer J, Derpoorter C, Spaas C, De Backer T, Lamoral P, Abeloos J, Lammens T. Tracking the Molecular Fingerprint of Head and Neck Cancer for Recurrence Detection in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 22;23(5):2403. doi: 10.3390/ijms23052403. PMID: 35269544; PMCID: PMC8910330.
7. Thomaidou AC, Batsaki P, Adamaki M, Goulielmaki M, Baxevanis CN, Zoumpourlis V, Fortis SP. Promising Biomarkers in Head and Neck Cancer: The Most Clinically Important miRNAs. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 26;23(15):8257. doi: 10.3390/ijms23158257. PMID: 35897831; PMCID: PMC9367895.
8. Horton JD, Knochelmann HM, Day TA, Paulos CM, Neskey DM. Immune Evasion by Head and Neck Cancer: Foundations for Combination Therapy. *Trends Cancer*. 2019 Apr;5(4):208-232. doi: 10.1016/j.trecan.2019.02.007. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30961829; PMCID: PMC7304339.
9. Janecka-Widła A, Mucha-Małecka A, Majchrzyk K, Halaszka K, Przewoźnik M, Słonina D, Biesaga B. Active HPV infection and its influence on survival in head and neck squamous-cell cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Jul;146(7):1677-1692. doi: 10.1007/s00432-020-03218-6. PMID: 32372145; PMCID: PMC7256081.
10. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet*. 2018 Jun 7;14(6):e1007362. doi:10.1371/journal.pgen.1007362. PMID: 29879107; PMCID: PMC5991666.
11. Wagner N, Wagner KD. The Role of PPARs in Disease. *Cells*. 2020 Oct 28;9(11):2367. doi: 10.3390/cells9112367. PMID: 33126411; PMCID: PMC7692109.
12. Montaigne D, Butruille L, Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol*. 2021 Dec;18(12):809-823. doi: 10.1038/s41569-021-00569-6. Epub 2021 Jun 14. PMID: 34127848.
13. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem*. 2019 Mar 15;166:502-513. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.067.
14. Renu K, Veeraraghavan VP, Raj A T, Patil S, Valsala Gopalakrishnan A. The peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR- $\alpha$ ): A new therapeutic target

- for oral cancer. *Oral Oncol.* 2022 Sep;132:106007. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2022.106007. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35809505.
15. Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, Devue C, On S, Scetbun J, Romain M, Paul JL, Rothenberg ME, Marcellin P, Durand F, Bedossa P, Prip-Buus C, Baugé E, Staels B, Boulanger CM, Tedgui A, Rautou PE. Liver microRNA-21 overexpression in non-alcoholic steatohepatitis and its contribution to the disease in experimental models by inhibiting PPAR $\alpha$  expression. *Gut.* 2016 Nov;65(11):1882-1894. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308883. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26338827; PMCID: PMC5099209.
  16. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPAR $\gamma$  in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Feb 26;12:624112. doi: 10.3389/fendo.2021.624112. PMID: 33716977; PMCID: PMC7953066.
  17. Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res.* 2017 Apr 7;23:141-149. doi: 10.12659/msmbr.903910. PMID: 28386055; PMCID: PMC5391804.
  18. Burotto M, Szabo E. PPAR $\gamma$  in head and neck cancer prevention. *Oral Oncol.* 2014 Oct;50(10):924-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.12.020. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24434068; PMCID: PMC4096621.
  19. Hamakawa H, Nakashiro K, Sumida T, Shintani S, Myers JN, Takes RP, Rinaldo A, Ferlito A. Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head Neck.* 2008 Jun;30(6):800-9. PMID: 18429007. doi: 10.1002/hed.20830.
  20. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell.* 2005 Dec 16;123(6):993-9. PMID: 16360030. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.026.
  21. Marciano DP, Chang MR, Corzo CA, Goswami D, Lam VQ, Pascal BD, Griffin PR. The therapeutic potential of nuclear receptor modulators for treatment of metabolic disorders: PPAR $\gamma$ , RORs, and Rev-erbs. *Cell Metab.* 2014 Feb 4;19(2):193-208. PMID: 24440037. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.009. Epub 2014 Jan 16.
  22. Schweitzer A, Knauer SK, Stauber RH. Nuclear receptors in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *Int J Cancer.* 2010 Feb 15;126(4):801-9. PMID: 19839054. doi: 10.1002/ijc.24968.
  23. Kabzinski J, Maczynska M, Majsterek I. MicroRNA as a Novel Biomarker in the Diagnosis of Head and Neck Cancer. *Biomolecules.* 2021 Jun 5;11(6):844. doi: 10.3390/biom11060844. PMID: 34198889; PMCID: PMC8228566.
  24. Bakhtiar SM, Ali A, Barh D. Epigenetics in head and neck cancer. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:751-69. doi: 10.1007/978-1-4939-1804-1\_39. PMID: 25421690.
  25. Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, D' Souza J, Chakrabarty S, Satyamoorthy K. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2018 Nov;93(4):1955-1986. doi: 10.1111/brv.12428. Epub 2018 May 24. PMID: 29797774.
  26. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet.* 2023 Jun 28. doi: 10.1038/s41576-023-00611-y. Epub ahead of print. PMID: 37380761.
  27. Chen C, Lu Z, Yang J, Hao W, Qin Y, Wang H, Xie C, Xie R. MiR-17-5p promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma by targeting p21. *Cancer Med.* 2016 Dec;5(12):3489-3499. doi: 10.1002/cam4.863. PMID: 27774777; PMCID: PMC5224848.

28. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, Varambally S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. 2017 Aug;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28732212; PMCID: PMC5516091.
29. Yeudall WA, Crawford RY, Ensley JF, Robbins KC. MTS1/CDK4I is altered in cell lines derived from primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 1994;15(12):2683-6.
30. Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 1972;29(1):117-21.
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
32. Szyfter K. Genetics and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Biomolecules*. 2021 Aug 31;11(9):1293. DOI: 10.3390/biom11091293. PMCID: PMC8469154. PMID: 34572506.
33. Cai K, Li T, Guo L, Guo H, Zhu W, Yan L, Li F. Long non-coding RNA LINC00467 regulates hepatocellular carcinoma progression by modulating miR-9-5p/PPARA expression. *Open Biol*. 2019 Sep 27;9(9):190074. DOI: 10.1098/rsob.190074. PMID: 31480990. PMCID: PMC6769294.
34. Yete S, Saranath D. MicroRNAs in oral cancer: Biomarkers with clinical potential. *Oral Oncol*. 2020;110:105002. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2020.1.
35. Verma S, Pandey M, Shukla GC, Singh V, Gupta S. Integrated analysis of miRNA landscape and cellular networking pathways in stage-specific prostate cancer. *PLoS One*. 2019 Nov 22;14(11):e0224071. DOI: 10.1371/journal.pone.0224071. PMID: 31756185. PMCID: PMC6874298
36. Li J, Lai Y, Ma J, Liu Y, Bi J, Zhang L, Chen L, Yao C, Lv W, Chang G, Wang S, Ouyang M, Wang W. miR-17-5p suppresses cell proliferation and invasion by targeting ETV1 in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2017 Nov 10;17(1):745. DOI: 10.1186/s12885-017-3674-x. PMID: 29126392. PMCID: PMC5681773.
37. Shan SW, Fang L, Shatseva T, Rutnam ZJ, Yang X, Du W, Lu WY, Xuan JW, Deng Z, Yang BB. Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7, and vimentin in different signal pathways. *J Cell Sci*. 2013 Mar 15;126(Pt 6):1517-30. DOI: 10.1242/jcs.122895. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23418359.
38. Ou M, Zhang Y, Cui S, Zhao S, Tu J. Retraction Note: Upregulated MiR-9-5p Protects Against Inflammatory Response in Rats with Deep Vein Thrombosis via Inhibition of NF-κB p50. *Inflammation*. 2022 Sep 26. doi: 10.1007/s10753-022-01743-9. Epub ahead of print. PMID: 36156758.
39. Chen CP, Su YN, Hung CC, Lee CN, Hsieh FJ, Chang TY, et al. Molecular genetic analysis of the TSC genes in two families with prenatally diagnosed rhabdomyomas. *Prenat. Diagn*. 2005 25(2), 176–178. <https://doi.org/10.1002/pd.1085>.
40. Basheeth N, Patil N. Biomarkers in Head and Neck Cancer: An Update. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019 Oct;71(Suppl 1):1002-1011. doi: 10.1007/s12070-019-01683-1. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31742110; PMCID: PMC6848420.
41. Kagan SH. The influence of nursing in head and neck cancer management. *Curr Opin Oncol*. 2009 May;21(3):248-53. doi: 10.1097/CCO.0b013e328329b819. PMID: 19262382.

42. He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, Xie H, Peng X, Yin W, Tao Y, Wang X. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci.* 2020 Jul 19;16(14):2628-2647. doi: 10.7150/ijbs.47203. PubMed PMID: 32792861; PubMed Central PMCID: PMC7415433.
43. Economopoulou P, de Bree R, Kotsantis I, Psyrri A. Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting. *Front Oncol.* 2019 Aug 29;9:827. doi: 10.3389/fonc.2019.00827. PMID: 31555588; PMCID: PMC6727245.

**ANEXO****ARTIGO EM ELABORAÇÃO****PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ : regulação por microRNAs e seu papel no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.****Resumo**

O câncer de cabeça e pescoço é um grande desafio de saúde pública devido à sua alta incidência, prevalência e mortalidade. Para enfrentar esse desafio, é crucial entender os mecanismos moleculares envolvidos. Genes como PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  desempenham um papel importante na regulação de processos celulares, como metabolismo, inflamação e proliferação. Evidências recentes sugerem que esses genes interagem com microRNAs, que afetam a progressão do câncer, respostas ao tratamento e prognóstico. Células de câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral (HN13) e hipofaringe (FaDu) foram cultivadas. Realizamos ensaios de transfecção em placas de 24 poços por 48 horas, utilizando miRNAs específicos (miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p) e um controle. Após a transfecção, coletamos RNA total e proteínas. A expressão gênica foi analisada por PCR quantitativo (qPCR) para PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , usando GAPDH como referência. A expressão proteica foi avaliada por Western Blotting (WB). Observamos uma diminuição na expressão do gene PPAR $\alpha$  nas células HN13 após a transfecção com miR-9-5p (40% de redução), miR-17-5p (30% de redução) e miR-21-5p (25% de redução). Nas células FaDu, a expressão de PPAR $\alpha$  diminuiu significativamente após a transfecção com miR-9-5p (50% de redução) e miR-21-5p (25% de redução) e apresentou uma redução não significativa com miR-17-5p. A análise da expressão proteica confirmou esses resultados. Os resultados indicam que miR-9-5p e miR-21-5p provavelmente regulam a expressão de PPAR $\alpha$  nas linhagens HN13 e FaDu. No entanto, o miR-17-5p regula o PPAR $\alpha$  apenas na linhagem HN13. A expressão do PPAR $\gamma$  não foi afetada pela transfecção de nenhum dos miRNAs. Esses resultados destacam a importância dos biomarcadores no diagnóstico, tratamento e monitoramento do câncer de cabeça e pescoço.

**Descritores:** Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo; Câncer de cabeça e pescoço; Biomarcadores

## 1. Introdução

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) é a sétima malignidade mais comum no mundo, com foco na cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. Indivíduos com idade avançada são diagnosticados com maior frequência por efeito do uso a longo prazo de tabaco e álcool <sup>1,2</sup>. Estes causam alterações moleculares generalizadas e progressivas que afetam o funcionamento celular do epitélio nas regiões que abrangem o câncer <sup>3</sup>.

O tratamento para este tipo de câncer é focado principalmente na erradicação cirúrgica, seguidas de quimioterapia (QT) e radioterapia (RT), podendo ser concomitantes. Estes tipos de terapias reduzem radicalmente a qualidade de vida do paciente, podendo ser em alguns casos ineficazes, além de acarretar em alguns pacientes, resistência à quimioterapia <sup>1</sup>. A taxa de sobrevivência para esta doença é de 5 anos e apesar dos alvos terapêuticos, aproximadamente 30% dos pacientes terão recidiva após o tratamento <sup>4</sup>.

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) regulam genes que controlam o metabolismo homeostático e lipídico, obesidade, diferenciação celular e câncer e funcionam em vários órgãos como fígado, tecido adiposo, coração, músculo esqueléticos, intestino e parede vascular. Existem três isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  e pertencem a família de receptores nucleares ativados por ligantes, sendo os genes codificados localizados nos cromossomos 22, 6 e 3, respectivamente <sup>5,6</sup>.

Particularmente, o PPAR $\gamma$  atua no controle de genes relacionados as vias metabólicas como a glicose e na biossíntese lipídica. A ativação do PPAR $\gamma$  é encontrada em uma variedade de células cancerígenas, com propriedades anti-metastáticas, anti-proliferativas, prodiferenciação, anti-apoptóticas e anti-inflamatórias. Há evidências na presença do PPAR $\gamma$  na prevenção do câncer, especialmente no HNSCC <sup>7</sup>.

O PPAR $\alpha$  desempenha um papel em órgãos como: fígado, coração, rim e tecido adiposo, aumentando a oxidação de ácidos graxos e diminuindo a captação de glicose. Outra isoforma, o PPAR $\beta/\delta$  está presente em todos os órgãos do corpo, sendo importante também na regulação da oxidação dos ácidos graxos e aminoácidos de cadeia ramificada <sup>8</sup>.

Mecanismos epigenéticos estão relacionados ao desenvolvimento de tumores, através da metilação do DNA, modificações de histonas e RNAs não-codificantes (microRNAs) que modulam a expressão gênica, não alterando a sequência do DNA. Células cancerígenas sofrem alterações no seu material genético, constituindo a formação da tumorigênese <sup>9</sup>.

Os miRNAs são produzidos dentro do núcleo celular envolvendo uma série de

processos até a formação de uma molécula de fita simples com uma variação de 20 a 22 nucleotídeos. Os processos biológicos que envolvem os miRNAs são: apoptose, proliferação celular, hematopoese, desenvolvimento neural, morte e tumorigênese. Desregulação nos miRNAs é uma propriedade em tumores neoplásicos, isso ocorre através de deleções ou perdas nas características da molécula <sup>10</sup>.

As alterações epigenéticas afetam a expressão dos PPARs, ocasionando uma ruptura nos processos biológicos que eles desempenham <sup>11</sup>. Conseqüentemente, a expressão dos PPARs é modulada por um grande número de miRNAs. Há inúmeros interesses científicos no papel destes genes a respeito da progressão e desenvolvimento do câncer <sup>8</sup>.

O objetivo desse estudo foi investigar a regulação dos genes PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  por meio dos miRNAs miR-9, miR-17-5p e miR-21, após transfecção nas linhagens celulares HN13 e FaDu de HNSCC.

## **2. Métodos e Materiais**

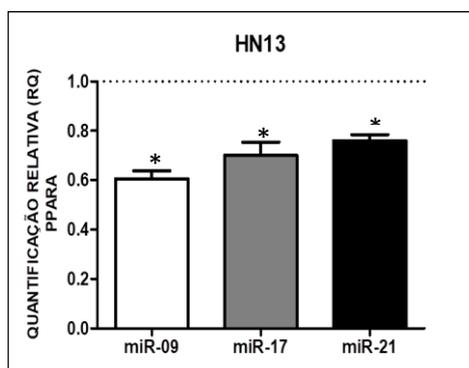
Foram utilizadas duas linhagens de células: HN13 (carcinoma de células escamosas humanas) e FaDu (células derivadas de carcinoma epidermoide de lesões primárias de hipofaringe). As células foram mantidas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> em meio de cultura DMEM high glicose (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco), 100U/ml de penicilina sódica e 100mg/ml de estreptomicina (Gibco) e 1% de L-glutamina (Gibco) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A transfecção foi feita em placas de 24 poços, cada uma contendo cerca de 80.000 células. Foi usado um meio contendo miRNAs específicos (miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p), controle positivo ou controle negativo, juntamente com Lipofectamina RNAiMax. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas, com uma troca de meio após as primeiras 24 horas. O RNA total foi obtido a partir da cultura de células utilizando Trizol (Invitrogen), enquanto a proteína total foi extraída das células após a transfecção, seguindo as instruções do fabricante, usando tampão RIPA (Sigma Aldrich, San Louis, EUA).

## **3. Resultados**

### **3.1. Expressão Gênica**

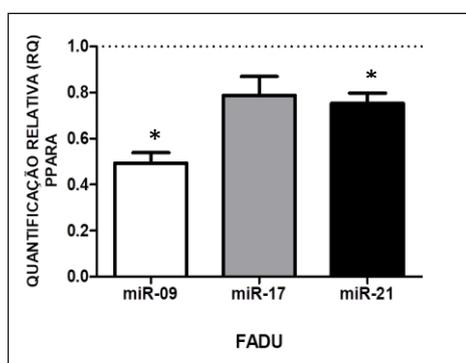
Na linhagem HN13, a análise da expressão gênica revelou uma diminuição de 40% na expressão do gene PPAR $\alpha$  após a transfecção com miR-9-5p, 30% com miR-17-5p e 25%

com miR-21-5p (Figura 1). Essas reduções foram estatisticamente significativas ( $p=0,031$ ,  $p=0,035$ ,  $p=0,031$ , respectivamente).



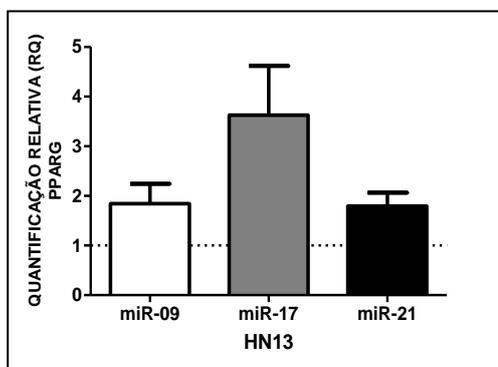
**Figura 1:** Expressão relativa do *PPARα* após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem HN13. \*Valor de  $p<0,05$ .

Na linhagem FaDu, a maior redução na expressão do *PPARα* foi observada após a transfecção com miR-9-5p, seguida por miR-21-5p e, por último, miR-17-5p. Essa redução foi estatisticamente significativa apenas após a transfecção com miR-9-5p e miR-21-5p, com uma diminuição de 50% ( $p=0,031$ ) e 25% ( $p=0,031$ ), respectivamente. No caso das células transfectadas com miR-17-5p, observou-se uma redução de 23%, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística ( $p=0,93$ ) (Figura 2).



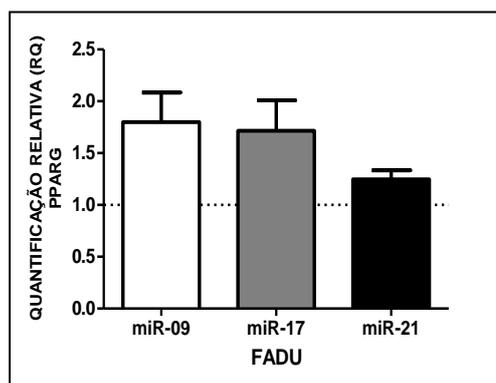
**Figura 2:** Expressão relativa ao *PPARα* após a transfecção com os miRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem FaDu. \*Valor de  $p<0,05$ .

Após a transfecção com os miRNAs, houve um aumento na expressão do gene *PPARγ* em todas as linhagens celulares testadas, incluindo HN13, em resposta à introdução dos miRNAs miR-9-5p ( $p=0,0878$ ), miR-17-5p ( $p=0,0454$ ) e miR-21-5p ( $p=0,0335$ ) (Figura 3).



**Figura 3:** Expressão relativa ao *PPARγ* após a transfecção com os microRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem HN13. \*Valor de  $p < 0,05$

Os resultados da análise da expressão do gene *PPARγ* demonstraram que a regulação desse gene por meio dos miRNAs miR-9-5p ( $p=0,0374$ ), miR-17-5p ( $p=0,0580$ ) e miR-21-5p ( $p=0,0365$ ) específicos não ocorreu tanto na linhagem celular FaDu quanto na linhagem HN13 (Figura 4). Em contraste com o *PPARα*, onde a regulação por esses miRNAs foi evidente, ambas as linhagens FaDu e HN13 mostraram notável resistência a esse mecanismo de regulação da expressão do *PPARγ*.

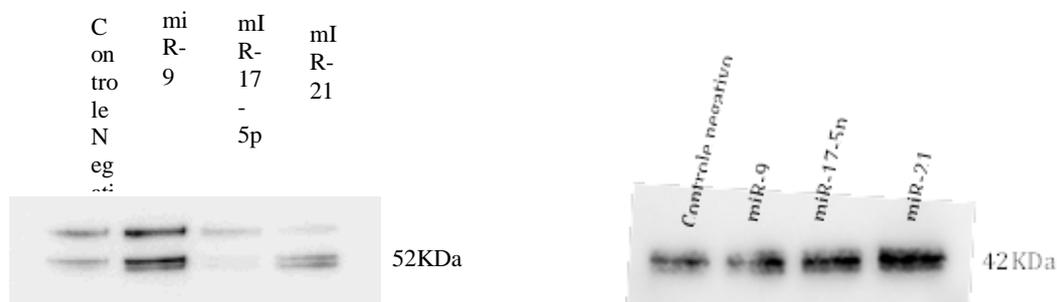


**Figura 4:** Expressão relativa ao *PPARγ* após a transfecção com os miRNAs miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p na linhagem FaDu. \*Valor de  $p < 0,05$ .

### 3.2 Expressão Proteica

A técnica de Western Blotting (WB) foi utilizada para analisar a expressão proteica do *PPARα* (PPAR alpha Polyclonal Antibody PA1-822A, Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções de concentração do fabricante. Como controle para a técnica de expressão proteica, empregou-se o anticorpo da  $\beta$ -actina (15G5A11/E2). Os resultados indicaram uma diminuição na expressão da proteína *PPARα* após a transfecção dos miRNAs miR-17-5p e miR-21-5p em comparação com o controle negativo, enquanto a expressão do miR-9-5p aumentou. Em relação às avaliações da expressão gênica, observou-se uma redução nos níveis de *PPARα* após a transfecção de todos os miRNAs. No entanto, apenas a transfecção com miR-17-5p na linhagem HN13 resultou em uma redução na expressão proteica do *PPARα*, evidenciada no WB em torno de 52 kDa (Figura 5). As amostras transfectadas com miR-9-5p e o miR-21-5p

não apresentaram redução. Para as amostras de FaDu não foi possível observar a expressão do PPAR $\alpha$ .



**Figura 5:** Expressão proteica PPAR $\alpha$  (52 kDa) e da Beta-actina (42 kDa), referente ao controle negativo e as amostras transfectadas com o miR-9-5p, miR-17-5p e miR21-5p na linhagem HN13.

#### 4. Discussão

A abordagem do câncer de cabeça e pescoço (CCP) como um processo heterogêneo, que abrange desde mutações genéticas causadas por agentes cancerígenos até a desregulação dos processos metabólicos, ressalta a complexidade intrínseca desta enfermidade. A identificação do tabagismo como um fator causal principal destaca a urgência de ações preventivas e da conscientização sobre os riscos associados ao consumo de tabaco. Além disso, a referência à pesquisa de mutações nas células cancerosas reflete os avanços na investigação biomédica, abrindo caminhos para terapias mais personalizadas e eficazes. Este entendimento abrangente do CCP é essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento, com o propósito de aprimorar as perspectivas dos pacientes afetados por essa intrincada condição<sup>12</sup>.

O PPAR $\alpha$  desempenha um papel crucial na regulação da via metabólica do NF- $\kappa$ B, desempenhando um papel essencial na inibição da inflamação no microambiente tumoral<sup>13,14</sup>. Neste estudo, foi observada uma diminuição na expressão do gene PPAR $\alpha$  após a introdução dos miméticos miR-9-5p, miR-17-5p e miR-21-5p por meio de transfecção nas linhagens celulares HN13 e FaDu. Uma investigação anterior revelou que o miR-9-5p tem a capacidade de mirar o 3'UTR do fator de transcrição PPAR $\alpha$ , resultando na supressão da expressão desse gene no carcinoma hepatocelular, o que, por sua vez, está associado a um aumento na invasão e na proliferação tumoral<sup>15</sup>.

Em um estudo adicional realizado por Yete e Saranath em 2020, foi constatado que a regulação negativa dos miRNAs miR-17-5p e miR-21-5p está associada à progressão clínica

da doença em pacientes com câncer oral e ao desenvolvimento tumoral<sup>16</sup>. De acordo com as descobertas de outra pesquisa, a elevada expressão de miR-17-5p resultou na supressão da expressão do gene PPAR $\alpha$  em casos de câncer de próstata<sup>17</sup>.

Esses miRNAs têm a capacidade direta de influenciar a expressão desse gene e, como resultado, desempenham um papel na promoção da progressão tumoral no câncer de cabeça e pescoço (CCP). Além disso, o miR-17-5p também manifesta propriedades oncogênicas em cânceres de mama, hepático e gástrico. Níveis elevados de miR-17-5p foram detectados em tecidos tumorais sólidos de câncer hepático, gástrico e colorretal, bem como em amostras de soro, reforçando assim seu potencial como biomarcador. Adicionalmente, a superexpressão do miR-17-5p pode estar associada à progressão do estado clínico da doença e à sensibilidade aos tratamentos quimioterápicos<sup>18,19</sup>.

A ativação do PPAR $\gamma$  está relacionada a efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos, pró-diferenciação, anti-inflamatórios e antimetastáticos em várias linhagens celulares cancerosas. Em um estudo envolvendo 49 pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de língua, sugere-se que o PPAR $\gamma$  desempenha um papel preventivo no câncer, pois foi observada uma expressão moderada ou intensa em cerca de 60% dos casos, enquanto a expressão mínima foi encontrada no epitélio histologicamente normal. Além disso, o estudo associou a ativação desse gene à redução da profundidade da invasão celular, correlacionando-se também com uma maior sobrevida global<sup>7</sup>.

## Referências

1. Chen C, Lu Z, Yang J, Hao W, Qin Y, Wang H, Xie C, Xie R. MiR-17-5p promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma by targeting p21. *Cancer Med.* 2016 Dec;5(12):3489-3499. doi: 10.1002/cam4.863. PMID: 27774777; PMCID: PMC5224848.
2. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Jan 2;382(1):60-72. doi: 10.1056/NEJMra1715715. PMID: 31893516
3. Horton JD, Knochelmann HM, Day TA, Paulos CM, Neskey DM. Immune Evasion by Head and Neck Cancer: Foundations for Combination Therapy. *Trends Cancer.* 2019 Apr;5(4):208-232. doi: 10.1016/j.trecan.2019.02.007. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30961829; PMCID: PMC7304339.
4. Diez-Fraile A, De Ceulaer J, Derpoorter C, Spaas C, De Backer T, Lamoral P, Abeloos J, Lammens T. Tracking the Molecular Fingerprint of Head and Neck Cancer for Recurrence Detection in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 22;23(5):2403. doi: 10.3390/ijms23052403. PMID: 35269544; PMCID: PMC8910330.
5. Montaigne D, Butruille L, Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol.* 2021 Dec;18(12):809-823. doi: 10.1038/s41569-021-00569-6. Epub 2021 Jun 14. PMID: 34127848

6. Wagner, N., & Wagner, K. D. (2020). The Role of PPARs in Disease. *Cells*, 9(11), 2367. <https://doi.org/10.3390/cells9112367>
7. Burotto M, Szabo E. PPAR $\gamma$  in head and neck cancer prevention. *Oral Oncol*. 2014 Oct;50(10):924-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.12.020. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24434068; PMCID: PMC4096621.
8. Muzio, G., Barrera, G., & Pizzimenti, S. (2021). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Oxidative Stress in Physiological Conditions and in Cancer. *Antioxidants (Basel)*, 10(11), 1734. <https://doi.org/10.3390/antiox10111734>
9. Bakhtiar SM, Ali A, Barh D. Epigenetics in head and neck cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:751-69. doi: 10.1007/978-1-4939-1804-1\_39. PMID: 25421690.
10. Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020 Mar 1;25(6):1058-1109. PMID: 32114424. doi: 10.2741/4847
11. Huang, Q., Ma, C., Chen, L., Luo, D., Chen, R., & Liang, F. (2018). Mechanistic Insights Into the Interaction Between Transcription Factors and Epigenetic Modifications and the Contribution to the Development of Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9, 370. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00370>.
12. Szyfter K. Genetics and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Biomolecules*. 2021 Aug 31;11(9):1293. DOI: 10.3390/biom11091293. PMCID: PMC8469154. PMID: 34572506.
13. Cai K, Li T, Guo L, Guo H, Zhu W, Yan L, Li F. Long non-coding RNA LINC00467 regulates hepatocellular carcinoma progression by modulating miR-9-5p/PPARA expression. *Open Biol*. 2019 Sep 27;9(9):190074. DOI: 10.1098/rsob.190074. PMID: 31480990. PMCID: PMC6769294.
14. Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, Devue C, On S, Scetbun J, Romain M, Paul JL, Rothenberg ME, Marcellin P, Durand F, Bedossa P, Prip-Buus C, Baugé E, Staels B, Boulanger CM, Tedgui A, Rautou PE. Liver microRNA-21 overexpression in non-alcoholic steatohepatitis and its contribution to the disease in experimental models by inhibiting PPAR $\alpha$  expression. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1882-1894. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308883. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26338827; PMCID: PMC5099209.
15. Renu K, Veeraraghavan VP, Raj A T, Patil S, Valsala Gopalakrishnan A. The peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR- $\alpha$ ): A new therapeutic target for oral cancer. *Oral Oncol*. 2022 Sep;132:106007. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2022.106007. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35809505.
16. Yete S, Saranath D. MicroRNAs in oral cancer: Biomarkers with clinical potential. *Oral Oncol*. 2020;110:105002. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2020.1.
17. Verma S, Pandey M, Shukla GC, Singh V, Gupta S. Integrated analysis of miRNA landscape and cellular networking pathways in stage-specific prostate cancer. *PLoS One*. 2019 Nov 22;14(11):e0224071. DOI: 10.1371/journal.pone.0224071. PMID: 31756185. PMCID: PMC6874298.
18. Li J, Lai Y, Ma J, Liu Y, Bi J, Zhang L, Chen L, Yao C, Lv W, Chang G, Wang S, Ouyang M, Wang W. miR-17-5p suppresses cell proliferation and invasion by targeting ETV1 in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2017 Nov 10;17(1):745. DOI: 10.1186/s12885-017-3674-x. PMID: 29126392. PMCID: PMC5681773.
19. Shan SW, Fang L, Shatseva T, Rutnam ZJ, Yang X, Du W, Lu WY, Xuan JW, Deng Z, Yang BB. Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7, and vimentin in different signal pathways. *J Cell Sci*. 2013 Mar 15;126(Pt 6):1517-30. DOI: 10.1242/jcs.122895. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23418359.