

Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e em cultura primária de queratinócitos orais

Evaluation of microRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes

Flavia Maziero Andreghetto¹, Maria Fatima Guarizo Klingbeil², Renata Machado Soares³, Roberta Sitnik⁴, Décio dos Santos Pinto Junior⁵, Monica Beatriz Mathor², Fabio Daumas Nunes⁵, Patricia Severino¹

RESUMO

Objetivo: Estudos funcionais *in vitro* são essenciais para a compreensão do papel de microRNAs, pequenas moléculas de RNA que desempenham papel importante na regulação gênica, no câncer. Neste estudo, analisamos a viabilidade de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, queratinócitos orais provenientes de culturas primárias e queratinócitos imortalizados, como modelos para estudos funcionais de microRNAs previamente identificados como desregulados nesse tipo de carcinoma. **Métodos:** Avaliamos a expressão de quatro microRNAs em linhagens celulares e em cultura primária de queratinócitos orais por meio de reações em cadeia da polimerase em tempo real específica. As linhagens celulares de carcinoma epidermoide de boca foram previamente caracterizadas quanto ao seu perfil de sequências de DNA do tipo STR (do inglês *short tandem repeats* ou repetições curtas em sequência) com o objetivo de confirmar a identidade da linhagem. Avaliamos ainda a possível influência da expressão gênica detectada na camada de sustentação usada no cultivo de queratinócitos no resultado global obtido. **Resultados:** Nossos resultados apontam diferenças significativas na expressão dos microRNAs entre linhagens celulares passíveis de serem utilizadas como modelos para estudos funcionais em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Ressaltam-se diferenças entre linhagens de carcinoma de língua e de faringe, bem como diferenças expressivas entre a linhagem de queratinócitos orais imortalizados e queratinócitos orais normais provenientes de culturas primárias. **Conclusão:** Culturas primárias de queratinócitos orais bem como linhagens tumorais são obtidas de

forma relativamente simples. Entretanto, cada modelo celular possui características particulares que os tornam mais ou menos adequados para um determinado estudo. Conclui-se que a seleção cuidadosa das linhagens é fundamental para estudos funcionais sobre câncer.

Descritores: Expressão gênica; Queratinócitos; Carcinoma de células escamosas; Neoplasias de cabeça e pescoço

ABSTRACT

Objective: Functional *in vitro* studies are fundamental to understand the role of microRNAs, small non coding RNA molecules that function as post-transcriptional regulators, in cancer. The objective of this study was to determine the applicability of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human oral keratinocytes as models for functional studies on microRNAs previously identified as deregulated in head and neck squamous cell carcinomas. **Methods:** The expression level of four microRNAs was assessed in cell lines and in primary cultures of oral keratinocytes using specific real-time polymerase chain reactions. The identity of oral squamous cell carcinoma cell lines was confirmed by means of STR (short tandem repeats) profiling. The possible impact of feeder-layer gene expression in global microRNA expression results from keratinocyte primary culture was also evaluated. **Results:** Significant differences in microRNA gene expression were observed among squamous cell carcinoma cell lines, particularly among cells lines from distinct subsites, as well as between primary culture of human keratinocytes and immortalized keratinocyte

Trabalho realizado no Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – IIEPAE, São Paulo (SP), Brasil; em colaboração com o Laboratório de Técnicas Especiais, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil; Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP) Brasil; Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – IIEPAE, São Paulo (SP), Brasil; Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

² Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – São Paulo (SP), Brasil.

³ Centro de Pesquisa Experimental, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – IIEPAE, São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Laboratório de Técnicas Especiais, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Patricia Severino – Avenida Albert Einstein, 627, 2SS, Bloco A – Morumbi – CEP 05652-000 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-0507 – E-mail: psever@einstein.br

Data de submissão: 17/6/2011 – Data de aceite: 19/10/2011

Conflito de interesse: não há

cell lines. **Conclusions:** Primary cultures of human keratinocytes and diverse tumor cell lines are relatively easy to obtain. However, each cell model possesses a characteristic phenotype; whereas one may be useful for a specific study, it may be inappropriate for another. Therefore, it is imperative that suitable cell lines are cautiously selected for functional studies in cancer.

Keywords: Gene expression; Keratinocytes; Carcinoma, squamous cell; Head and neck neoplasms

INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum do mundo, sendo que mais de 90% desses carcinomas são epidermóides^(1,2). Esse tumor tem início na superfície epitelial da mucosa que reveste as vias aerodigestivas (cavidade oral, fossas nasais, seios paranasais, faringe e a laringe). Estudos epidemiológicos mostram uma forte relação entre o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e fatores carcinógenos, especialmente tabaco e álcool^(3,4). Apesar de diversos avanços para tratamento do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, a taxa de sobrevida global em 5 anos está entre as mais baixas dentre os principais tipos de cânceres, não apresentando melhora nas últimas duas décadas⁽⁵⁾. Atualmente, o planejamento terapêutico está baseado principalmente no sítio do tumor primário e na presença ou ausência de metástases no momento do diagnóstico⁽⁶⁾.

Pequenas moléculas de RNA não codificadores chamadas microRNAs (miRNAs) desempenham papel significativo como reguladores da expressão gênica e têm sido associadas com diversos processos celulares relacionados a carcinogênese e progressão tumoral⁽⁷⁻⁹⁾. Predições *in silico* estimam que os miRNAs regulem mais de 30% dos genes codificadores de proteínas⁽¹⁰⁾. Sua ação no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é ainda pouco conhecida, apesar de estudos recentes já sugerirem uma relação com o prognóstico da doença⁽¹¹⁻¹³⁾. Acredita-se que a compreensão do papel das miRNAs possa contribuir para melhor caracterização molecular da doença.

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

Um passo inicial fundamental nesse tipo de abordagem consiste na seleção do modelo celular mais adequado. O cultivo celular é um modelo muito utilizado por permitir uma análise do comportamento celular isolado da multiplicidade de processos biológicos que ocorrem *in vivo*. O uso de linhagens certificadas por fontes autorizadas garante a qualidade das conclusões obtidas; entretanto, laboratórios de pesquisa comumente mantêm diversas linhagens celulares para uso próprio. Uma vez que acidentes de contaminação cruzada podem ocorrer durante o manuseio dessas células⁽¹⁴⁾, procedimentos rigorosos de controle de qualidade se fazem necessários. Neste trabalho, utilizamos o perfil de STR (do inglês *short tandem repeats* ou repetições curtas em sequência) para avaliar a identidade das linhagens celulares utilizadas⁽¹⁵⁾. Os STRs são regiões do genoma humano compostos por repetições de pequenas sequências de dois a seis nucleotídeos (por exemplo: AT), que podem ter diferentes números de repetições (por exemplo: ATATATAT = AT₄). Esse número de repetições em cada *locus* é uma característica hereditária e pode ser usada para identificar o DNA de cada indivíduo. Existem *loci* de STRs caracterizados em cada cromossomo humano e o uso de múltiplos *loci* pode identificar indivíduos com um alto grau de certeza, tornando esse método muito útil para testes de identificação forense ou paternidade, bem como para a caracterização de linhagens celulares.

Linhagens celulares comerciais (ou estabelecidas) oferecem um nível melhor de reprodutibilidade e, conseqüentemente, de padronização, quando comparadas às culturas primárias. Entretanto, culturas primárias têm a vantagem de não possuírem as alterações genéticas associadas à obtenção de linhagens imortalizadas ou as alterações relacionadas ao câncer presentes nas linhagens de carcinoma. Sendo assim, utilizamos como modelo de estudo linhagens celulares estabelecidas, dentre elas uma linhagem de queratinócito oral imortalizada, frequentemente utilizada como modelo de célula normal na literatura, e linhagens derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Em paralelo, utilizamos também queratinócitos orais provenientes de culturas primárias para avaliação da expressão de miRNAs no contexto de célula epitelial não cancerosa. Essas células são cultivadas sobre camada de sustentação constituída por fibroblastos murinos irradiados; a irradiação controla a taxa de proliferação dos fibroblastos, de forma que seu crescimento não prejudique o crescimento das células de interesse, mas mantém ativo o metabolismo, o que contribui para a manutenção da cultura de queratinócitos.

Resultados anteriores do nosso grupo identificaram os miRNAs miR-1 e miR-10b como menos expressos em

tumores comparados com tecido livre de tumor de um mesmo paciente, enquanto que miR-196 e miR-7 estavam mais expressos nos tumores (dados não publicados). Não se conhece o papel desses miRNAs no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, apesar de presentes na literatura no contexto de outros tipos de câncer⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

OBJETIVO

Avaliar a expressão de miRNAs previamente identificados como desregulados em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, em linhagens celulares derivadas desse tipo de tumor, em queratinócitos orais humanos derivados de cultura primária, e em uma linhagem conhecida de queratinócitos orais imortalizados.

MÉTODOS

Cultura de linhagens celulares tumorais

Linhagens celulares humanas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço – SCC4, SCC9 e SCC25 (células derivadas de carcinoma epidermoide de língua), e FaDu (células derivadas de carcinoma epidermoide de lesão primária de hipofaringe) foram generosamente doadas pelos Doutores Décio dos Santos Pinto Jr e Fabio Daumas Nunes, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), originalmente disponíveis via ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*). Essas linhagens celulares foram cultivadas com meio de cultura constituído por: *Dulbecco's modified Eagle medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco – DMEM) (Sigma, cat. D6429) e meio de Ham F12 (Gibco, cat. 11765) (na proporção de 1:1), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco cat. 12.657-029), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL) e glutamina (4 mM) (Gibco BRL: 21.051-040), em garrafas próprias para cultivo celular, e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Cultura de queratinócitos orais

Os queratinócitos orais foram obtidos a partir de culturas primárias de fragmentos de mucosa bucal, provenientes de pacientes doadores voluntários, submetidos a cirurgias, como: remoção de terceiros molares, aumento de coroa clínica e ulectomia, ocorridos no ambulatório da Faculdade de Odontologia da USP⁽²⁰⁾. Os pacientes foram previamente informados e assinaram os respectivos termos de doação. Esse trabalho obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) sob n.º 087/CEP-IPEN/SP. Os queratinócitos foram

cultivados em um meio de cultura composto de DMEM (Gibco, New York, NY, USA), F-12 Nutrient Mixture (HAM, Gibco, New York, NY, USA) (2:1), suplementado com 10% de soro bovino Fetal Clone III (Hyclone, Logan, Utah, USA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL), glutamina (4 mM), adenina (0,18 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), insulina (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), hidrocortisona (0,4 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), toxina colérica (0,1 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), triiodotironina (20 pM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e fator de crescimento epidermal (EGF) (10 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA⁽²¹⁾). As células foram semeadas sobre uma camada de sustentação, denominada de *feeder-layer*, a qual é composta por uma linhagem de fibroblastos murinos do tipo 3T3-Swiss albino (ATCC/catálogo número CCL-92), irradiados (60 Gy) e mantidos em incubadora a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

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

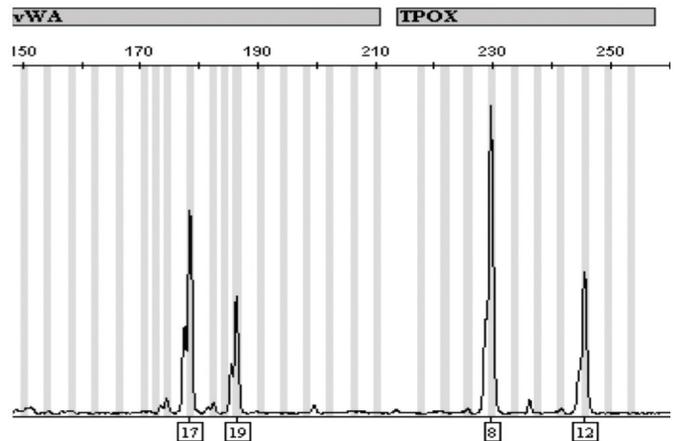
Extração de DNA e perfil de STR

Com o objetivo de confirmar a identidade das linhagens celulares de carcinoma epidermoide de língua utilizadas nesse estudo, realizamos a análise do perfil de STR. A mesma técnica não pôde ser realizada para as linhagens FaDu e HaCaT devido à indisponibilidade de perfil padrão para essas células.

Para esta análise, o DNA das células foi isolado com o *kit* de extração Puregene Isolation Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi amplificado por reações em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com o manual do *kit* AmpFLSTR Identifiler® (Life Technologies). Os *loci* analisados foram: amelogenina, D7S820, D5S818, TPOX, CSFPO1, vWA, D13S317, TH01 e D16S539. A escolha desses marcadores teve como base as características disponibilizadas pela ATCC para nossas linhagens, conforme o quadro 1. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese capilar em condições de desnaturação no equipamento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) e os resultados analisados pelo *software* de análise GeneMapper 3.7 (Life Technologies) no Laboratório de Técnicas Especiais do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

Quadro 1. STRs utilizados pela ATCC para caracterização das linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de língua selecionadas para este estudo

Linhagens celulares STRs AmpFLSTR Identifier®	SCC4	SCC9	SCC25
	D7S820	9,11	8
CSF1PO	11	11	10
TH01	9,3	8,9	8
D13S317	11,13	9	13
D16S539	12	10,11	11,12
vWA	15,17	17	17,19
TPOX	8	9,11	8,12
Amelogenina	X,Y	X,Y	X
D5S818	13	12	12

**Figura 1.** Representação dos STR identificados em SCC25

Extração de RNA

O RNA total foi extraído usando o *kit* miRVana miRNA Isolation (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Munich, Germany) e a integridade do RNA foi verificada em gel de agarose.

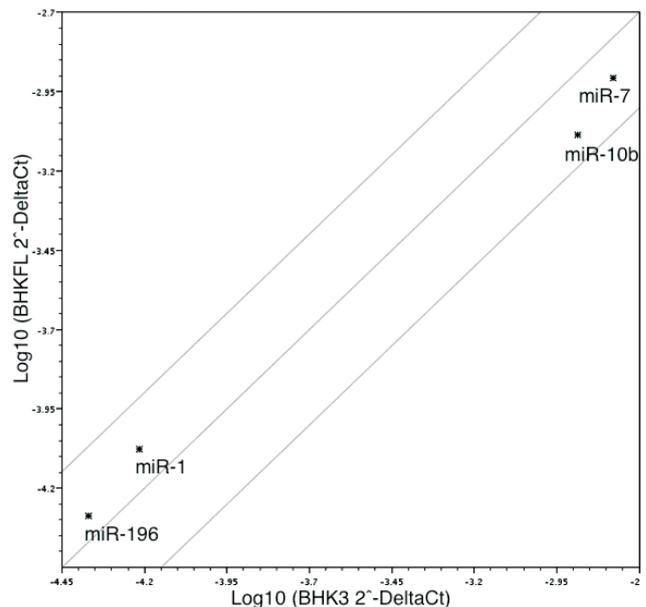
PCR em tempo real para avaliação da expressão de miRNAs

Para detecção da expressão dos miRNAs, a transcrição reversa foi realizada a partir das amostras de RNA total (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Foster City, CA), seguida por reação de PCR em tempo real com *primers* comerciais específicos (TaqMan MicroRNA Assays, Life Technologies, Foster City, CA). Todos os ensaios seguiram estritamente as recomendações do fabricante e foram realizados em duplicata. O RNU48, um pequeno RNA de expressão abundante e relativamente estável no tecido humano, foi utilizado como controle endógeno para normalização⁽²²⁾. Os resultados de expressão foram apresentados como a razão da expressão normalizada (*fold-change*) entre linhagens celulares e cultura primária de queratinócitos orais⁽²³⁾.

RESULTADOS

As linhagens celulares de carcinoma epidermoide de língua (SCC4, SCC9 e SCC25) foram analisadas quanto ao perfil de STR em nove *loci* gênicos. A escolha teve como base o padrão disponibilizado pela ATCC e os STRs analisados por meio do kit AmpFLSTR Identifier® (Life Technologies). As três linhagens celulares apresentaram o padrão de STR descrito pela ATCC, indicando que essas células provavelmente mantêm as características da linhagem original. A figura 1 ilustra resultados dessa análise para a linhagem SCC25.

Quanto à cultura primária de queratinócitos orais, foram realizados experimentos para verificar se a presença da camada de sustentação (*feeder-layer*) poderia interferir nos níveis de expressão dos miRNAs de interesse para este estudo. Assim, analisamos a expressão relativa dos miRNAs em queratinócitos sobre camada de sustentação abundante (BHKFL) e em cultura confluenta de queratinócitos, ou seja, sobre pouca camada de sustentação (BHK3) (Figura 2). Em BHKFL os queratinócitos estavam subconfluentes e ocupavam cerca de 70% da placa de cultura, enquanto que em BHK3 eles ocupavam 98% da placa. Observa-se que a expressão dos miRNAs

**Figura 2.** Gráfico de dispersão representando a média do *fold-change* entre a expressão de miRNAs em queratinócitos confluentes (BHK3) e subconfluentes (BHKFL). O eixo vertical mostra a expressão normalizada de BHKFL e o eixo horizontal mostra o valor correspondente em BHK3. O intervalo representado no gráfico corresponde ao *fold-change* de 2.0 entre os níveis de expressão dos dois grupos comparados. A normalização foi realizada com o gene de referência RNU48

estudados permaneceu constante ou aumentou à medida que a quantidade de camada de sustentação diminuiu. Comparamos ainda a expressão desses miRNAs entre fibroblastos irradiados e não irradiados e observamos que a expressão na camada de sustentação não é nula. Optamos, então, por realizar os experimentos subsequentes em condições do tipo BHK3.

O nível de expressão basal dos quatro miRNAs de interesse em linhagens celulares de carcinoma epidermoide em comparação com os queratinócitos orais pode ser observado na figura 3. A expressão do miR-196 apresenta-se significativamente mais expressa em linhagens tumorais quando comparada à expressão em células normais; ressalta-se, entretanto, que a expressão também foi maior na linhagem imortalizada de queratinócitos orais (HaCaT), indicando que essa linhagem celular não seria um modelo adequado de célula não tumoral para esse miRNA. O mesmo padrão pode ser observado para o miR-10b: originalmente pouco expresso em tumores comparados com tecido livre de tumor ele também aparece menos expresso em linhagens tumorais comparadas com os queratinócitos orais normais. A expressão em HaCaT mais uma vez não se equipara à expressão dos queratinócitos orais normais provenientes de culturas primárias.

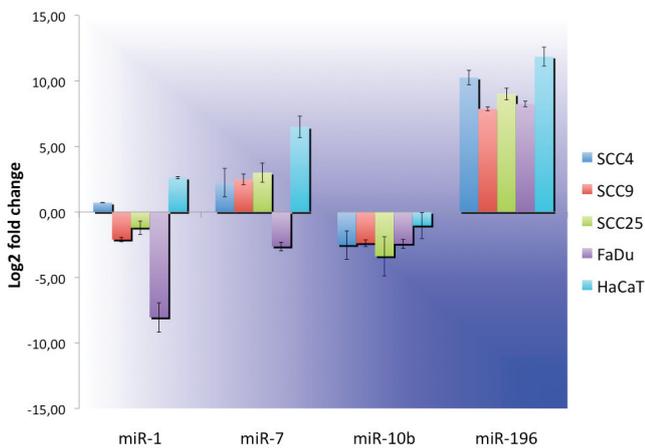


Figura 3. Fold-change entre a expressão de miRNAs em células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (SCC4, SCC9, SCC25, FaDu), HaCaT e queratinócitos orais normais (BHK3). Os dados apresentados são a média do log₂ fold-change entre a expressão em células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e queratinócitos. SCC4, SCC9, SCC25: linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermoide de língua; FaDu: linhagem celular derivada de lesão primária de carcinoma epidermoide hipofarínge; HaCaT: linhagem de célula epidérmica transformada espontaneamente; BHK3: queratinócitos em confluência. A normalização foi realizada com o gene de referência RNU48

Resultados menos consistentes, ressaltando características intrínsecas das células tumorais, foram obtidos para miR-7 e miR-1, respectivamente super expresso e pouco expresso em tumores. Para miR-7, as linhagens derivadas de carcinoma de língua apresentaram a super expressão esperada quando comparadas

aos queratinócitos orais normais, enquanto que FaDu, a linhagem de carcinoma de orofaringe, não apresentou esse mesmo resultado. Interessante notar que HaCaT foi a linhagem que mais expressou esse miRNA, enquanto se esperava expressão inferior àquela das linhagens tumorais. Para o miR-1 a exceção foi a linhagem SCC4, com expressão superior à dos queratinócitos orais normais quando o esperado seria expressão inferior. O nível de expressão de miR-1 foi superior em HaCaT comparada com as demais linhagens tumorais, dessa vez em acordo com esperado para o miRNA.

DISCUSSÃO

Linhagens celulares são muito utilizadas em pesquisa como modelos para o estudo de mecanismos moleculares em enfermidades e, em particular, no estudo do câncer. Estudos recentes identificaram problemas de contaminação cruzada graças à caracterização por STR realizados com linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço⁽²⁴⁾. O monitoramento contínuo das linhagens celulares, para fins de controle de qualidade, é necessário. Este trabalho partiu, portanto, dessa avaliação inicial para que conclusões subsequentes fossem confiáveis e reprodutíveis. Para as três linhagens derivadas de carcinoma de língua escolhidas para este estudo, os padrões de STR mostraram-se idênticos ao esperado, conforme dados fornecidos pela ATCC. Esses resultados não garantem que alterações genéticas decorrentes do número de passagens dessas células mantidas por laboratórios de pesquisa não interfiram nos resultados encontrados, mas atestam a identidade original da linhagem e a pureza da cultura.

Estudos funcionais *in vitro* podem apresentar resultados distintos conforme as células utilizadas, uma vez que as características genéticas das linhagens associadas à expressão dos genes de interesse são desconhecidas. Torna-se, assim, indispensável avaliar múltiplas possibilidades para a escolha do melhor modelo. Demonstramos aqui diferenças quanto à expressão de miRNAs entre linhagens celulares comumente utilizadas como modelos para CECP: SCC4, SCC9, SCC25 e FaDu. Diferenças comportamentais entre as linhagens abordadas neste estudo foram observadas por diversos autores. O grupo de Kim et al.⁽²⁵⁾ observou que a linhagem SCC4 apresentou menores níveis de proliferação e sobrevivência celular quando comparada às linhagens celulares SCC9 e SCC25, após tratamento com celecoxibe (uma droga anti-inflamatória). Chou et al.⁽²⁶⁾ mostraram que, em contraste com as células SCC9, a involucrina (proteína marcadora de diferenciação epidérmica) não foi induzida por hipóxia em células SCC4. No trabalho de Liang et al.⁽²⁷⁾, o tratamento com extrato

de corais marinhos apresentou grande potencial inibitório de crescimento celular e indução de diferenciação em SCC25, diferenciação moderada em SCC9 e pouca diferenciação em SCC4. Esses estudos ressaltam a importância da escolha do modelo adequado para estudos em linhagens celulares.

Alguns estudos funcionais para miRNAs foram realizados com células derivadas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. No estudo de Liet al.⁽¹¹⁾, foi observado que a inibição de miR-21 induziu apoptose em linhagens celulares de carcinoma de língua. Já Wong et al.⁽²⁸⁾ demonstraram que linhagens de carcinoma de língua que passaram a super expressar miR-133a/b em estudo funcional apresentaram menores taxas de proliferação e aumento de apoptose. Uma revisão recente destaca a importância dos miRNAs para o câncer de cabeça e pescoço, bem como estudos funcionais realizados em linhagens celulares⁽²⁹⁾. Nossos resultados indicam que o impacto da super expressão ou da inibição da expressão de um determinado miRNA pode variar de acordo com a célula utilizada como modelo de estudo, podendo interferir, portanto, nas conclusões obtidas.

Sabe-se que a expressão gênica em camada de sustentação utilizada para manutenção de queratinócitos orais não é nula: a irradiação dos fibroblastos é adequada para controlar a proliferação celular mas a ação sobre outros genes é indeterminada⁽³⁰⁾. Apesar da pequena variação na expressão de miRNAs em BHKFL e BHK3, identificamos expressão dos miRNAs nos fibroblastos irradiados. Consideramos, portanto, que a expressão de miRNAs em queratinócitos será melhor avaliada em condições do tipo BHK3, ou seja, em culturas confluentes.

Comparamos a expressão dos 4 miRNAs de interesse entre a cultura primária de queratinócitos e a linhagem celular imortalizada HaCaT. Essa linhagem tem sido amplamente utilizada na literatura como modelo para queratinócitos por se tratar de uma linhagem de fácil propagação e de fenótipo próximo ao normal. Identificamos diferenças importantes no padrão de expressão desses miRNAs entre as duas culturas celulares. Nossos resultados sugerem que a utilização da cultura primária, apesar da limitação de seu tempo de vida e da maior complexidade para sua manutenção em cultivo, deve ser considerada para estudos que visam a resultados associados ao fenótipo celular normal.

CONCLUSÕES

Nossos resultados apontam diferenças significativas de expressão gênica entre linhagens celulares passíveis de serem utilizadas como modelos para estudos funcionais de miRNAs em carcinoma epidermoide de cabeça e

pescoço. Ressaltam-se em particular diferenças entre linhagens de carcinoma de língua e de faringe, bem como diferenças expressivas entre uma linhagem de queratinócitos orais imortalizados, a HaCaT, e queratinócitos orais normais provenientes de culturas primárias. Conclui-se que a seleção cuidadosa das linhagens é fundamental para conclusões adequadas sobre o papel de miRNAs em tumores.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Técnicas Especiais (LATE) do HIAE pela disponibilização e realização da análise de STR. Em particular agradecemos Elena Outon Alonso, pela realização do ensaio. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2009/04166-5). Flavia Maziero Andreghetto recebe bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecky A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1116-27.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
3. Farshadpour F, Kranenborg H, Calkoen EV, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ, et al. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: influence of smoking and drinking. *Head Neck*. 2011;33(6):817-23.
4. Basu R, Mandal S, Ghosh A, Poddar TK. Role of tobacco in the development of head and neck squamous cell carcinoma in an eastern Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008;9(3):381-6.
5. Jemal A, Siegel R, Murray T, XU J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2007;57(1):34-66.
6. Greenman J, Homer JJ, Stafford N. Markers in cancer of the larynx and pharynx. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2000;25(1):9-18.
7. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
8. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2007;96(Suppl):R40-4.
9. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):219-30.
10. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
11. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):3998-4008.
12. Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, Lyons-Weiler MA, Laframboise WA, Kelly L, et al. MicroRNA-137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2011;117(7):1454-62.
13. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, et al. Hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer*. 2010;116(9):2148-58.

14. Alston-Roberts C, Barallon R, Bauer S, Butler J, Capes-Davis A, Dirks W, et al. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):441-8.
15. Oldroyd NJ, Urquhart AJ, Kimpton CP, Millican ES, Watson SK, Downes T, et al. A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. *Electrophoresis*. 1995;16(3):334-7.
16. Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, et al. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29596-604.
17. Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, Thangaraju M, et al. Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer Res*. 2010;70(20):7894-904.
18. Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, et al. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res*. 2011;71(10):3563-72.
19. Saydam O, Senol O, Wurdinger T, Mizrak A, Ozdener GB, Stemmer-Rachamimov AO, et al. miRNA-7 attenuation in Schwannoma tumors stimulates growth by upregulating three oncogenic signaling pathways. *Cancer Research*. 2011;71(3):852-61.
20. Klingbeil MFG, Herson MR, Cristo EB, Pinto Jr DS, Yoshito D, Mathor MB. Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. *Cell Tissue Bank*. 2009;10(3):197-204.
21. Benassi L, Marconi A, Sevignani C, Vaschieri C, Zambruno G. Metodiche di coltura di cheratinociti umani normali. In: Zambruno G, Canceda R, De Luca M, Andreassi L. *Coltura di cheratinociti umani normali e loro applicazione*. Workshop di Biologia Cellulare e Immunologia della Cute. Modena: Università deli Studi di Modena; 1993. p. 5-23.
22. Duan Z, Choy E, Nielsen GP, Rosenberg A, lafrate J, Yang C, et al. Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. *J Orthop Res*. 2010;28(6):746-52.
23. Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15(1):56-61.
24. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenti U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4331-41.
25. Kim YY, Lee EJ, Kim YK, Kim SM, Park JY, Myoung H, et al. Anti-cancer effects of celecoxib in head and neck carcinoma. *Mol Cells*. 2010;29(2):185-94.
26. Chou SC, Azuma Y, Varia MA, Raleigh JA. Evidence that involucrin, a marker for differentiation, is oxygen regulated in human squamous cell carcinomas. *Br J of Cancer*. 2004;90(3):728-35.
27. Liang CH, Wang GH, Hung WJ, Lin RJ, Cheng DL, Cho TH. Apoptosis effect of *Sinularialeptocladus*, *S. depressan* and *S. inflata* extracts in human oral squamous cell carcinomas. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2010;41(1):86-91.
28. Wong TS, Liu XB, Chung-Wai AH, Po-Wing AY, Wai-Man R, Ignace WW. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer*. 2008;123(2):251-7.
29. Tran N, O'Brien CJ, Clark j, Rose B. Potential role of micro-RNAs in head and neck tumorigenesis. *Head Neck*. 2010;32(8):1099-111.
30. Pollard EC, Lydersen BK. The action of ionizing radiation on the synthesis of RNA and two inducible enzymes in *Escherichia coli*. *Radiat Res*. 1972;50(2):293-300.