

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Fernando Galvão Junior

TESE DE DOUTORADO:

**DESREGULAÇÃO DA CLIVAGEM DA PROTEÍNA PRECURSORA
AMILOIDE EM DOENÇAS RELACIONADAS AO ENVELHECIMENTO:
CÂNCER E DOENÇA DE ALZHEIMER**

Porto Alegre, 2022

Fernando Galvão Junior

**DESREGULAÇÃO DA CLIVAGEM DA PROTEÍNA PRECURSORA
AMILOIDE EM DOENÇAS RELACIONADAS AO ENVELHECIMENTO:
CÂNCER E DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de dor em Fisiologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Coorientador(a): Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre

2022

Agradecimentos

Durante a realização de um longo projeto, foram incontáveis as pessoas que desempenharam papéis cruciais nessa trajetória errática; uma série de agradecimentos, portanto, será indubitavelmente falha, e eu gostaria de pedir desculpas àqueles que não forem contemplados nos agradecimentos subsequentes desde já.

Agradeço, em especial, aos meus pais, **Simone e Fernando**, cujo sacrifício me possibilitou esta oportunidade e também todas as outras. Agradeço ao meu irmão, **Gabriel**, cuja presença é sempre um lembrete de que as coisas não são tão sérias – mesmo quando elas são incrivelmente sérias.

Agradeço aos inúmeros exemplos de pesquisadores com os quais tive o privilégio de conviver neste meu período na UFRGS, personificados na pessoa da minha orientadora, **Ionara Siqueira**, e do meu co-orientador, **Marcelo Lamers**, que toparam o desafio considerável de um doutorado em meio a uma graduação, que logo se transformou em um doutorado em meio a uma graduação em meio a uma pandemia. Entre os pesquisadores com os quais pude conviver, destaco duas cuja convivência abrilhantou os últimos anos de maneiras incontáveis, **Louisiana e Roberta**; obrigado pelo exemplo, pela inspiração e pela amizade. Agradeço a todos os outros colegas com quem pude trabalhar durante este período.

Agradeço aos meus amigos, tanto àqueles com os quais a convivência antecede a realização deste projeto quanto àqueles que conheci em meio a ele. Não me arriscarei a nomeá-los todos; entretanto, sem eles não teria tido capacidade de completar esta etapa. Em especial, agradeço à **Juliana**, pela paciência, compreensão e, principalmente, pela capacidade de manter o foco no que importa de fato.

Por fim, agradeço à **UFRGS** e em especial ao **PPG Fisiologia** por essa oportunidade. Em especial, gostaria de agradecer ao doutor **Guilherme Baldo**, cuja atuação na coordenação do PPG permitiu a realização deste projeto.

Muito obrigado.

*“Valeu à pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”*

Fernando Pessoa (1888 – 1935)

Resumo

A clivagem da proteína precursora amiloide (APP) é uma das vias bioquímicas mais amplamente estudadas em biologia, dada sua relevância na fisiopatologia da doença de Alzheimer (DA), principal causa de demência ao redor do mundo. Entretanto, essa não é a única patologia associada à clivagem da APP; uma série de estudos demonstrou convincentemente que outro produto derivado do processamento dessa proteína, o peptídeo secretado APP α (sAPP α), está implicado em uma série de neoplasias malignas. Interessantemente, há evidências epidemiológicas de uma associação inversa entre a incidência de câncer e a incidência de DA, as quais foram amplamente revisadas ao longo do primeiro capítulo desta tese. Ainda, desenvolvemos a hipótese de que a via da APP possa ser o mecanismo pelo qual essa associação se explica e conduzimos uma ampla revisão da literatura quanto à clivagem da APP, sua regulação e o papel que ela exerce em câncer e DA. Após esse estudo, nós avaliamos o papel que microRNAs exercem na regulação da clivagem da APP em um modelo de neoplasia no qual essa proteína está envolvida, o carcinoma espinocelular oral humano (CEC). Especificamente, nós avaliamos o papel dos microRNAs nesse tumor e um mecanismo potencialmente envolvido na regulação desses miRNAs, as vesículas e partículas extracelulares (VEs). Nossos dados indicaram que as VEs participam na regulação da concentração intracelular de miRNAs e que essa participação é relevante no desenvolvimento e perpetuação das neoplasias.

Abstract

The amyloid precursor protein (APP) cleavage is a widely studied biochemical pathway because of its relevance in Alzheimer disease (AD), the main cause of dementia worldwide. Nonetheless, this is not the only disease associated to APP cleavage; many studies have shown that another byproduct from APP processing, the secreted APP α peptide (sAPP α), is implied in several neoplasms. Interestingly, there is epidemiological evidence on an inverse association between cancer incidence and AD incidence. This has been extensively reviewed in the first chapter. Also, we have hypothesized that APP cleavage may be the underlying mechanism which explains this association and conducted a broad review on APP cleavage, its regulation and the role it plays in cancer and in AD. Afterwards, we evaluated the role played by microRNAs in APP cleavage regulation in oral squamous cells carcinoma (OSCC), a kind of tumor APP is involved with. Specifically, we evaluated microRNAs role in this tumor and a mechanism potentially involved in these microRNAs regulation, the extracellular vesicles (EVs). Our data indicate that EVs participate in the regulation of intracellular miRNAs concentration and that this participation is relevant to the development and perpetuation of neoplasms.

Lista de figuras

Figura 1. Componentes celulares e acelulares do microambiente tumoral. Página 11.

Figura 2. Processo de formação das vesículas extracelulares. Página 12.

Figura 3. Vias de clivagem da proteína precursora amiloide. Página 17.

Figura 4. Reguladores da clivagem da APP. Página 54.

Figura 5. Expressão de miRNAs em queratinócitos orais normais e em células de carcinoma espinocelular. Página 58.

Figura 6. Sinais envolvidos na secreção dos miRNAs. Página 59.

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviações e siglas

1. Introdução

2. Justificativa e hipótese de trabalho

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

3.2. Objetivos específicos

4. Abordagem metodológica

4.1. Capítulo 1

4.2. Capítulo 2

5. Capítulo 1

6. Capítulo 2

7. Discussão

8. Conclusões

9. Referências bibliográficas

1. Introdução

1.1. Câncer e doenças neurodegenerativas

O envelhecimento populacional no Brasil e no mundo traz consigo preocupações quanto às doenças mais prevalentes entre os idosos, como as neoplasias malignas. Segundo o Global Burden of Disease 2016 (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. 2017), as mortes por câncer no grupo de pessoas com idade maior do que 70 anos cresceram 86,3% entre 1990 e 2016, correspondendo a cerca de 4 milhões de idosos mortos por câncer a cada ano. Outras doenças, como afecções urogenitais e desordens neurológicas, tiveram crescimento proporcional semelhante (aproximadamente 90%), mas corresponderam a menos de um milhão de indivíduos mortos em números absolutos.

Dessa forma, existe grande interesse em uma compreensão mais profunda e abrangente da fisiopatologia do câncer. Uma maneira de abordar esta questão é a procura sistemática de vias envolvidas em outras condições de saúde, nas quais elas tenham sido mais bem estudadas, e que possam desempenhar um papel em neoplasias malignas; assim, pode-se partir de conhecimentos já estabelecidos em outros campos para fazer o mapeamento de rotas moleculares úteis à Cancerologia.

Nesse contexto, o desequilíbrio no processamento de uma proteína de membrana, a proteína precursora amiloide (APP), muito estudada pelo seu envolvimento com a doença de Alzheimer (DA), também está relacionado a uma série de neoplasias. Dentre elas, está o carcinoma espinocelular oral humano (CEC) (Galvão et al. 2019), amplamente discutido ao longo dessa tese.

1.2. Carcinoma espinocelular oral humano: importância epidemiológica, bases moleculares e o microambiente tumoral

O carcinoma espinocelular oral humano (CEC) é a forma mais agressiva de neoplasia da cavidade oral, com taxas de sobrevivência em cinco anos de aproximadamente 50% (Song et al. 2020). Ao redor do mundo, se estima que seja a oitava forma mais comum de câncer, predominando em países em desenvolvimento (Ng et al. 2017). Tradicionalmente, o paciente acometido por CEC era um homem

com idade superior a sessenta anos, tabagista e etilista pesado; entretanto, nas últimas décadas, especialmente por intermédio das campanhas de cessação de tabagismo, foi observado um aumento crescente na proporção de pacientes jovens, homens e mulheres, cujos tumores estão associados ao HPV (Ng et al. 2017).

Os CEC podem se formar em todos os lugares da cavidade oral, incluindo o palato duro, o palato mole, a porção alveolar da dentição, a gengiva e a língua; esta última é a localização mais frequente (Bagan, Sarrion, e Jimenez 2010). As lesões costumam passar despercebidas até estágios mais avançados, nos quais habitualmente já há comprometimento linfonodal, o que contribui sobremaneira para o prognóstico reservado (Bagan, Sarrion, e Jimenez 2010). Não à toa, há interesse crescente no desenvolvimento de métodos diagnósticos capazes de detectar precocemente essas neoplasias, o que poderia constituir uma revolução prognóstica.

Nesse sentido, os estudos acerca das bases moleculares dos CEC demonstraram o envolvimento de diferentes vias nesses tumores, como a da p53, a do receptor EGFR, a da metaloproteinase MMP9 e a do fator de crescimento vascular VEGF-C (Ai et al. 2017; Dos Santos Costa et al. 2018). Em particular, ganhou destaque nos últimos anos a participação do microambiente tumoral (MET; Figura 1), o conjunto de moléculas de sinalização, células e outras estruturas que compõem o ambiente no qual estão “inseridas” as células neoplásicas.

Recentemente, demonstrou-se que o MET em lesões orais pré-cancerosas é determinante na sua evolução para CEC e que, uma vez estabelecida a neoplasia maligna, ele é fundamental para sua manutenção (Ai et al. 2017). Compõe o MET uma série de células, como fibroblastos associados ao câncer (CAF) e células do sistema imune (predominantemente macrófagos). Essas células secretam substâncias, a exemplo de TGF β e TNF α , que promovem alterações nas células tumorais, levando à diminuição da expressão da E-caderina – um passo fundamental

para a migração celular e o estabelecimento de metástases (Sun et al. 2019)

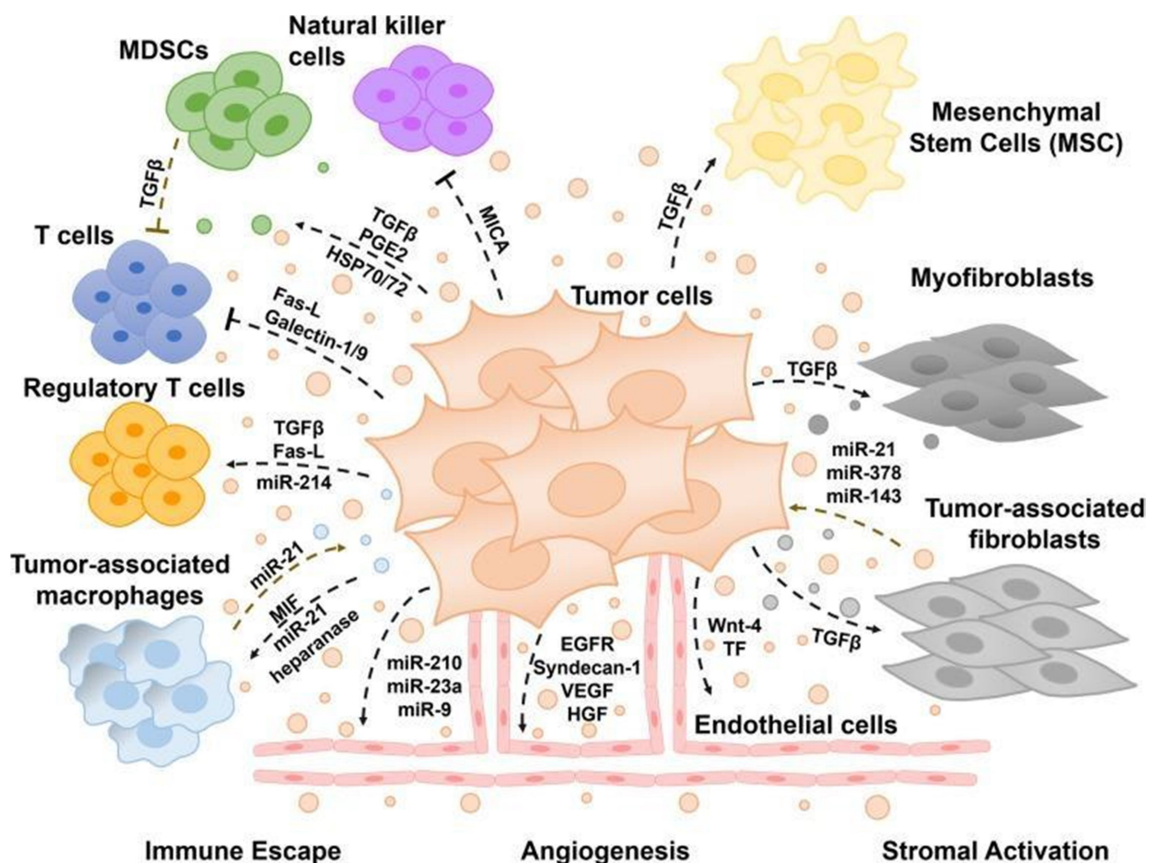


Figura 1. Componentes celulares e acelulares do microambiente tumoral. As VEs (representadas como pequenas esferas laranjas) carregam moléculas diversas, levando-as das células tumorais para os vasos sanguíneos e para as outras células do microambiente tumoral ou então das outras células para as células tumorais. Figura disponível em (Maacha et al. 2019).

As formas pelas quais os componentes do MET se comunicam é um dos principais interesses da pesquisa em cancerologia atualmente. Nesse contexto, as vesículas extracelulares (VEs), estruturas formadas por membranas bilipídicas com a capacidade de carrear moléculas biologicamente ativas, ganharam grande relevância.

1.3. Vesículas extracelulares: comunicação intercelular, miRNAs e papel na regulação da expressão proteica

As VEs são secretadas por todas as células eucarióticas e são divididas em pelo menos duas populações distintas: exossomos e microvesículas (Théry et al. 2018). Essa divisão é feita com base na origem intracelular das VEs. Os exossomos são formados pela invaginação de porções de membrana plasmática que se fundem e geram os corpos multivesiculares (MVBs, da sigla em inglês); a membrana dos

MVBs sofre uma nova invaginação sob ação das enzimas Rab5 e Rab7, da família de GTPases Rab, gerando uma série de pequenas estruturas vesiculares que ficam contidas no interior dos MVBs. Sob sinais que ainda não são bem conhecidos, os MVBs são transportados por meio dos microtúbulos até as proximidades da membrana plasmática da célula, onde se acoplam ao complexo SNARE, fundindo-se à membrana plasmática e secretando os exossomos no meio extracelular (Bang e Kim 2019).

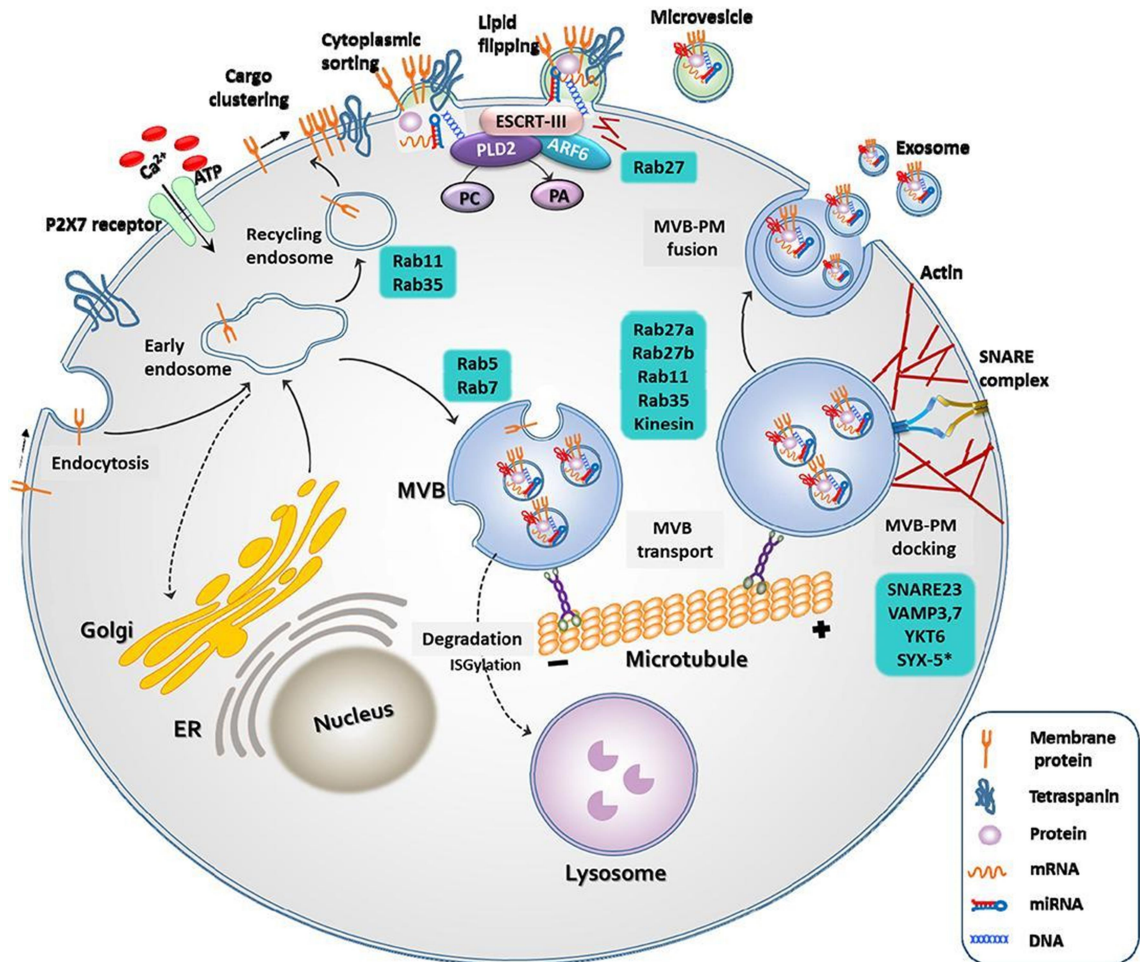


Figura 2. Processo de formação das duas subpopulações de VEs mais estudadas: microvesículas e exossomos. No canto superior direito, observa-se a formação de exossomos e a participação da família das Rab GTPases nesse processo, bem estudada; à esquerda, representa-se a formação de microvesículas, cujos processos são menos conhecidos. Disponível em Bang e Kim 2019.

Por sua vez, as microvesículas são formadas por um processo menos compreendido: ocorre extrusão de um microdomínio específico da membrana, com

a participação das proteínas do complexo ESCRT-III (Figura 2). Posteriormente, essa “extrusão” de membrana é “cortada” por meio da ação da Rab27, liberando a estrutura vesicular chamada de microvesícula (Bang e Kim 2019). Na prática, entretanto, é difícil estabelecer experimentalmente a origem intracelular da população de VEs em um estudo. Dessa forma, a recomendação da Sociedade Internacional para o estudo de Vesículas Extracelulares (ISEV, da sigla em inglês) é de que as VEs sejam minuciosamente descritas pelo seu tamanho, pelos seus marcadores de superfície e pelo seu conteúdo (Théry et al. 2018), preferindo-se evitar o uso de termos como “exossomos” e “microvesículas” quando a natureza intracelular não for claramente determinada.

Independente das controvérsias em torno da nomenclatura, não há dúvidas do papel que as VEs exercem na comunicação intercelular. O primeiro estudo a levantar essa possibilidade demonstrou que as VEs carreavam moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), as proteínas centrais da apresentação de antígenos do sistema imune, e que esse processo estava envolvido na ativação imune (Colombo, Raposo, e Théry 2014). Posteriormente, Valadi e colaboradores (2007) forneceram evidência convincente do papel das VEs na transferência de miRNAs e mRNAs entre células. Mais recentemente, uma série de estudos, alguns realizados pelo grupo de pesquisa que produziu essa tese, demonstraram que as VEs carregam moléculas como APP, peptídeo B-amiloide, fragmentos de DNA, mRNA e outros, tanto em processos patológicos quanto fisiológicos (Colombo, Raposo, e Théry 2014).

Dado seu papel na comunicação intercelular, as VEs tornaram-se peça central no entendimento do MET. Diversos estudos demonstraram que as células tumorais transferem moléculas para os CAFs, os macrófagos e as demais células do sistema imune que compõe esse ambiente por meio delas (Maacha et al. 2019); ainda, outros estudos indicaram que o contrário também é verdadeiro - ou seja, que as VEs produzidas pelas outras células do MET agem sobre as células tumorais e influenciam seu comportamento (Maacha et al. 2019). A participação das VEs para a formação de condições propícias às neoplasias malignas é tão relevante que foi demonstrado que é por meio delas que os tumores conseguem estabelecer o “nicho pré-metastático”, isso é, o conjunto de situações favoráveis para que uma célula tumoral consiga estabelecer uma metástase em um órgão-alvo. Especificamente, os

autores trabalharam com tumores do tipo melanoma e adenocarcinoma de pâncreas *in vivo*, demonstrando que VEs contendo uma carga de ácidos nucleicos e proteínas específicas seriam capazes de favorecer a formação de metástases desses tumores em fígado, pulmões e linfonodos (Becker et al. 2016).

A formação de metástases não é o único passo da carcinogênese no qual as VEs participam. Seja pela sua ação na evasão ao sistema imune característica das neoplasias malignas (Ha e Kim 2014), seja pelo seu papel no processo de angiogênese, essencial para a proliferação dos cânceres, as VEs são fundamentais no surgimento e perpetuação dos tumores malignos. Entretanto, as VEs são transportadoras; o que realmente é relevante é o conteúdo que elas levam.

Nesse contexto, os miRNAs têm grande destaque. Ácidos nucleicos com tamanhos entre 20-25 nucleotídeos, essas moléculas participam da regulação da expressão gênica por meio de sua integração ao complexo de repressão da transcrição (RISC), promovendo a inibição da tradução de mRNAs e a degradação desses mRNAs (Ha e Kim 2014). Os miRNAs são os ácidos nucleicos mais abundantes no interior das VEs (Mills et al. 2019); ao circularem no interior dessas estruturas, eles estão protegidos da ação das RNases circulantes, o que contribui para exercerem suas funções biológicas.

Esses miRNAs carregados pelas VEs têm um papel preponderante nas neoplasias malignas: já foi demonstrada sua participação nos processos de angiogênese (Kuriyama et al. 2020), proliferação celular (Xavier et al. 2020), evasão da resposta imune (Mittal et al. 2020), entre outros. Os miRNAs que são transportados pelas VEs de uma célula a outra e que ao atingirem a célula-alvo exercem função pró-tumoral pertencem ao grupo dos chamados oncomiRNAs - uma analogia aos oncogenes, os genes promotores dos tumores. Entretanto, existe outro grupo de miRNAs - menos estudado - que age no sentido contrário ao do processo neoplásico, os miRNAs supressores tumorais. Esses miRNAs também são carregados por VEs; entretanto, enquanto o transporte de oncomiRNAs induz carcinogênese na célula receptora, o de miRNAs supressores tumorais induz carcinogênese na célula produtora.

Dessa forma, é possível afirmar que as VEs exercem um papel relevante na regulação da expressão proteica: carregam miRNAs de uma célula a outra, inibindo

a expressão de certas proteínas nas células receptoras e facilitando a expressão dessas proteínas nas células doadoras. O primeiro mecanismo - relacionado aos oncomiRNAs - foi amplamente estudado; o segundo, entretanto, carece de elucidação.

1.4. As VEs, a APP e os miRNAs no contexto do CEC

As neoplasias malignas da cavidade oral são um bom modelo para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos em Cancerologia, haja vista o fácil acesso que os pesquisadores têm a essas lesões – muito mais facilmente do que a órgãos intracavitários, por exemplo. No caso do estudo das VEs, essa facilidade de acesso se torna ainda mais relevante: um dos focos do interesse sobre as VEs é o seu uso enquanto biomarcadores facilmente isolados em fluídos biológicos, dentre os quais a saliva.

Além do eventual papel como marcadores tumorais, as VEs são exploradas no CEC pelo efeito biológico que exercem nas células receptoras. Estudos *in vitro* com CEC demonstraram, por exemplo, que as VEs derivadas do tumor são capazes de promover proliferação, migração e invasão (Sento, Sasabe, e Yamamoto 2016). Ainda, outros estudos revelaram que VEs derivadas de linhagens celulares de CEC com elevado potencial metastático são capazes de induzir células de baixo potencial a adquirirem um fenótipo mais favorável à metástase (Kawakubo-Yasukochi et al. 2016) e que VEs derivadas de linhagens de CEC alteram a expressão de proteínas associadas a mobilidade celular, diferenciação e apoptose em queratinócitos saudáveis (Qadir et al. 2018).

Da mesma forma, diversos estudos indicaram que VEs derivadas de outras células do microambiente tumoral são capazes de exercer efeitos sobre células do CEC. A maior parte desses estudos foi realizada com fibroblastos associados ao câncer (CAF, da sigla em inglês), dada a abundância dessas células no microambiente tumoral e a importância que elas vêm adquirindo na cancerologia. Sabe-se, por exemplo, que as VEs derivadas de CAFs induzem proliferação e migração em células de CEC (Principe et al. 2018; Sun et al. 2019).

Esses efeitos, tanto das células do CEC sobre outras células quanto das células do microambiente tumoral sobre o CEC, são mediados pelo conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos das VEs. Nesse sentido, sabe-se que os ácidos nucleicos mais

abundantes no interior das VEs são os miRNAs (Mills et al. 2019); não à toa, diversos miRNAs associados às VEs foram implicados em diferentes etapas da carcinogênese. Um estudo demonstrou, por exemplo, que a transferência do miR-21 entre células de CEC induz um aumento no potencial metastático das células receptoras (Li et al. 2016). Já outro trabalho evidenciou que uma linhagem de CEC extremamente agressiva secreta VEs com grande conteúdo dos miRNAs miR-343-3p e miR-1246 e que esses miRNAs foram associados a um aumento de motilidade nas células receptoras, as quais pertenciam a uma linhagem pouco agressiva (Sakha et al. 2016).

Apesar desses trabalhos promissores, o papel dos miRNAs associados às VEs no CEC permanece pouco estudado. Um dos motivos para isso é a dificuldade de desenvolver uma abordagem sistemática para essa questão de pesquisa: tanto as VEs quanto os miRNAs são tópicos que ganharam relevância há pouco tempo e, por mais que haja uma série de tecnologias disponíveis para estudá-los, estratégias inovadoras para abordar esse campo são necessárias. Nesta tese, nos propusemos a investigar um grupo de miRNAs em modelos de CEC; para selecionar esse grupo de miRNAs, nos voltamos para a clivagem da APP, uma via amplamente estudada em DA cuja relevância no CEC já foi demonstrada.

Conforme será extensamente discutido ao longo do primeiro capítulo desta tese, a APP é uma proteína transmembrana cujas funções fisiológicas são pouco compreendidas, mas que tem sido amplamente investigada pelo seu papel na DA (Weingarten et al. 2017); nessa doença, sabe-se que a APP é sequencialmente clivada pela β -secretase e pela γ -secretase, formando o peptídeo β -amiloide, implicado na composição das placas senis características da DA (Figura 3). Essa é a chamada via amiloidogênica. No entanto, a APP pode ser clivada em uma via alternativa, a via não-amiloidogênica, catalisada pela α -secretase e pela γ -secretase. Uma série de estudos demonstrou que essa via está associada a diversas neoplasias malignas, por meio da geração do peptídeo sAPP α (Hoffmann et al. 2000); entre essas neoplasias, está o CEC (Sy et al. 2004).

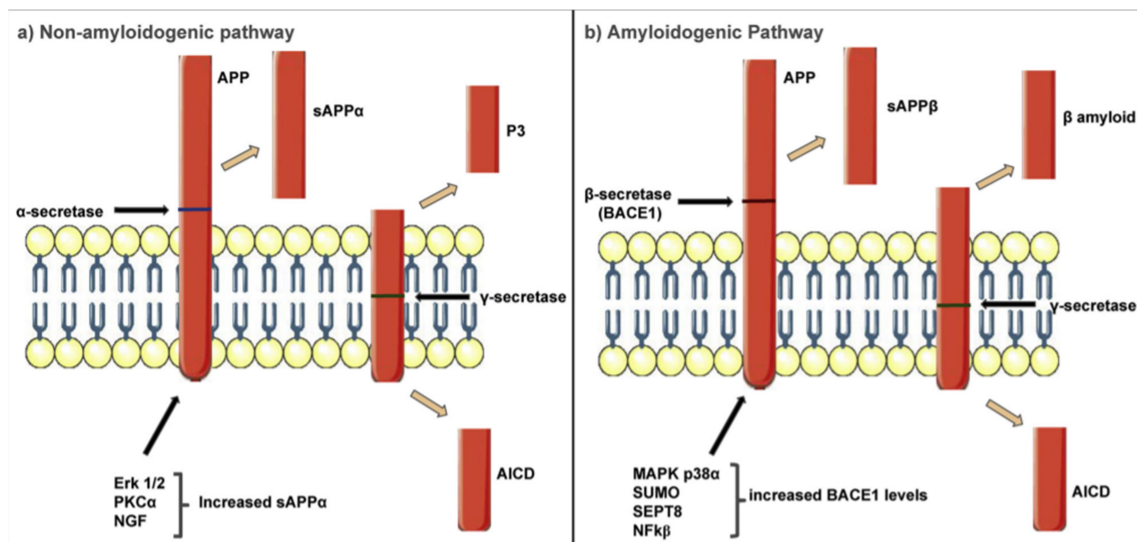


Figura 3. Figura representativa das possíveis vias de clivagem da APP. À esquerda, observa-se a clivagem não-amiloidogênica, catalisada sequencialmente pela α -secretase e pela γ -secretase; é a ação da α -secretase que dá origem ao sAPP α , o peptídeo com propriedades tróficas envolvido em uma série de neoplasias. À direita, está representada a clivagem amiloidogênica da APP, catalisada sequencialmente pela β -secretase e pela γ -secretase, dando origem ao peptídeo β -amiloide, componente das placas senis identificadas na DA. Disponível em Galvão et al. 2019.

Apesar dessa relação bem estabelecida, o papel da clivagem da APP no CEC não foi amplamente explorado; em especial, há poucos estudos, do nosso conhecimento, que tenham investigado os mecanismos que regulam essa clivagem.

2. Justificativa e hipótese de trabalho

A clivagem da APP é um mecanismo relacionado tanto ao desenvolvimento de DA quanto de uma série de neoplasias; no entanto, seu papel neste segundo campo foi pouco explorado até então, em especial no contexto das VEs e dos miRNAs, cujos papéis nas neoplasias revelam-se cada vez mais relevantes. Desta forma, este trabalho parte da premissa de que a regulação da clivagem da APP por meio de miRNAs é relevante para o entendimento de um modelo de neoplasia maligna, especificamente o carcinoma espinocelular oral humano, e que as VEs estão implicadas nas alterações nos níveis desses miRNAs já reportadas em trabalhos anteriores.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis de moléculas capazes de regular a clivagem da APP em VEs derivadas de células de OSCC, a partir de dados sumarizados em uma revisão da literatura sobre o processamento da APP e a regulação desse processamento.

3.2. Objetivos específicos

- Revisar o envolvimento das vias de clivagem da APP com a DA e as neoplasias malignas;
- Revisar a regulação das diferentes vias de clivagem e seu envolvimento com essas doenças;
- Investigar miRNAs envolvidos na regulação da clivagem da APP em VEs derivadas de células de OSCC.

4. Abordagem metodológica

4.1. Revisão da literatura

Para realização da revisão na literatura, nós partimos da busca sistemática por artigos envolvendo a APP e a DA, utilizando termos do MeSH para DA, APP, secretases e neoplasias (estratégia de busca em anexo). Essa busca resultou em 241 artigos, a maior parte deles envolvendo APP e DA. Assim, foi realizada uma busca ativa no PubMed utilizando os termos [“cancer”] AND [“x”] e os termos [“cancer”]

AND [“APP”] AND [“x”], onde x foram as diferentes moléculas envolvidas com o processamento da APP em DA. Essa busca resultou em uma série de artigos que foram selecionados de maneira não sistemática e utilizados na elaboração da revisão que compõe o capítulo 4.

4.2. Experimentos

4.2.1. Linhagens celulares e coleta do meio de cultura

Foram utilizadas para este uma linhagem de queratinócitos normais (HaCaT) e duas linhagens de carcinoma de células escamosas (Cal27 e SCC09). As linhagens foram cultivadas a 37° em estufa de cultivo contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) em meio de Eagle modificado por Dubecco (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementadas com 10% de soro bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

Para coleta de meio de cultura para o isolamento das VEs, as células foram cultivadas até atingirem 80-90% de confluência. Então, o meio usual foi substituído por um meio sem FBS, a fim de evitar contaminação da amostra, e as células foram mantidas neste meio por 24 horas. Ao término deste período, o meio era coletado. Foi feito um *pool* de 40 mL de meio por linhagem celular. O meio foi liofilizado no Laboratório de Análises de Propriedades Físicas dos Alimentos a fim de concentrar as VEs e, posteriormente, foi ressuspensão para realização do isolamento das VEs com kit comercial (ExoQuick, System Biosciences).

4.2.2. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o kit *mirVana*TM *PARIS*TM RNA (Life Technologies). A extração foi iniciada a partir de 150 µL da suspensão de VEs com a adição de 350 µL de solução de lise e 500 µL da solução desnaturante seguido de agitação e incubação no gelo por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 25 fmol do miRNA cel-miR-238-3p. Em seguida foi adicionado 1 mL de Ácido-fenol:Clorofórmio, seguido de agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 12000 ×g por 5 min. Após esta etapa, 500 µL da fase superior aquosa foram transferidos para um novo microtubo e foi adicionado 625 µL de etanol absoluto. Essa mistura, etanol e RNA, foi adicionada a coluna com filtro de sílica. Na sequência, foram realizadas as etapas de lavagem com 700 µL da solução *Wash1* e duas lavagens com 500 µL da solução *Wash 2/3* seguidas de centrifugação. Após, foi realizada uma centrifugação adicional e os filtros transferidos para novos

microtubos. O RNA total foi eluído com 60 μL de água livre de RNase, pré-aquecida à 95 °C. Após 5 min de incubação os filtros foram centrifugados por 1 min a 9000 $\times g$. Para avaliar a quantidade e qualidade do RNA total foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue Plus[®] e o *kit* Agilent RNA 6000 Pico no equipamento 2100 Bioanalyzer. Por fim, o RNA total obtido foi armazenado em *freezer* -80°C até utilização.

4.2.3. PCR quantitativo

As reações de poliadenilação, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa, foram realizadas utilizando o Kit miRNA RT-qPCR Master Mix Detection (Agilent Technologies). Primeiramente, 35 μL de RNA foram concentrados em SpeedVac[™] Concentrator durante 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, o RNA foi suspenso em água livre de RNase. As reações de poliadenilação foram realizadas em volume final de 25 μL contendo 1 ng de RNA. As amostras foram adicionados 4 μL de tampão, 1 μL de rATP (10 mM) e 1 μL da enzima poliA polimerase. Após, as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 min e 95°C por 5 min. Em seguida, para síntese de cDNA, foram adicionados os seguintes componentes: 4 μL de RNA poliadenilado, 2 μL de tampão, 0,8 μL de dNTP, 1 μL do primer adaptador, 1 μL da enzima *AffinityScript RT/RNase* e 11,2 μL de água livre de RNase. As amostras foram novamente incubadas a 55°C por 5 min, 25°C por 15 min, 42°C por 30 min e 95°C por 5 min. Em seguida, as amostras de cDNA foram armazenadas a -80°C até a realização da qPCR.

Para realização da qPCR os *primers* específicos de cada miRNA foram desenhados conforme recomendado no protocolo do kit. Foram desenhados *primers* para avaliação da expressão dos seguintes miRNAs: cel-miR-238-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-31-5p e hsa-miR-93-5p. A eficiência dos *primers* será determinada utilizando o programa LinRegPCR (Ramakers et al. 2003).

As análises de qPCR serão realizadas em placas de 96 poços, utilizando o sistema StepOnePlus[™] Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems[®]). As reações de qPCR serão realizadas em um volume final de 25 μL contendo 1 μL de cDNA, 12,5 μL de Master Mix, 0,375 μL do corante de referência passiva ROX (diluído 1:50), 1 μL do *primer* universal antisenso (3,125 μM), 1 μL do *primer* senso específico para o miRNA (3,125 μM) e 9,125 μL de água livre de RNase. As condições da qPCR serão: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 10 s, 53 °C por 15 s e 72°C por 20 s.

7. Discussão

Ao longo desta tese, partimos de uma conhecida associação epidemiológica: pacientes com DA têm menores chances de desenvolverem câncer e vice-versa. A partir deste conceito, exploramos a ideia de que um dos mecanismos possivelmente implicados nesta associação é a clivagem da APP, peça central da DA e uma via sabidamente envolvida em uma série de neoplasias. Assim sendo, revisamos os aspectos envolvidos com a regulação do processamento da APP nessas doenças. A partir dessa revisão, estabelecemos o conceito de que o desbalanço na clivagem da APP pode ser reflexo do desbalanço nos mecanismos de regulação dessa clivagem. Assim sendo, adotamos um modelo de neoplasia no qual o papel da APP fora estabelecido, o CEC, e exploramos os níveis de moléculas intrinsecamente relacionadas à regulação da expressão proteica, os miRNAs, em VEs derivadas desse tipo de tumor.

Tanto as neoplasias malignas quanto a DA representam desafios significativos à saúde global no momento atual, haja vista sua prevalência crescente, associada ao envelhecimento populacional. Assim sendo, a existência de uma relação epidemiológica entre essas doenças ganhou destaque nos últimos anos. Essa associação foi observada em diversos estudos epidemiológicos, principalmente coortes de base populacional, de forma que está sujeita a uma série de vieses intrínsecos a esses desenhos. Uma revisão recente, por exemplo, destaca a possibilidade de que o risco reduzido de DA entre pacientes que tiveram câncer pode ser atribuído aos tratamentos realizados por eles, uma vez que alguns fármacos antineoplásicos, principalmente aqueles que agem sobre a via do mTOR, têm sido associados a uma redução na progressão de DA (Lanni et al. 2021). No entanto, essa classe de antineoplásicos não é universalmente usada e a evidência que embasa seu potencial papel no atraso da progressão da DA não é consolidada. Outro estudo levantou a possibilidade de que indivíduos que já vivem com uma doença grave (câncer ou DA) têm chances menores de serem diagnosticados com um novo quadro devido a uma espécie de “inércia diagnóstica”; no entanto, não há evidências que sustentem essa afirmação, e mesmo os autores desse trabalho encontraram dados sugestivos de uma incidência reduzida de DA entre sobreviventes de câncer (Freedman et al. 2016).

Portanto, ainda que haja margem para contestação dessa associação e que ela talvez não se estenda a todos os grupos populacionais, ela parece verdadeira ao menos em algumas subpopulações. Isso levanta o questionamento: qual a explicação biológica para essa

associação? O primeiro capítulo levanta a hipótese de que um dos mecanismos subjacentes é a clivagem da APP.

A APP é uma proteína transmembrana que foi primeiramente descrita na década de 1980 como a precursora do peptídeo β -amiloide, central na fisiopatologia da DA. Recentemente, tem sido proposto que essa proteína desempenha um papel crucial na regulação sináptica no sistema nervoso central, com sua deficiência levando à desregulação na homeostase do cálcio, disfunção mitocondrial e alterações na liberação de neurotransmissores (Weingarten et al. 2017). Nos tecidos periféricos, sabe-se que a APP tem importante papel na proliferação das células da pele, por meio da geração do sAPP α (Hoffmann et al. 2000). Apesar disso, essa proteína é majoritariamente estudada por sua participação em processos patológicos, em especial na DA, mas também em diferentes tipos de câncer.

Essa participação acontece por meio de sua clivagem nas vias canônicas, catalisada pelas enzimas α -secretase e β -secretase; a clivagem deflagrada pela primeira enzima gera o sAPP α e a catalisada pela segunda, o peptídeo β -amiloide. A hipótese que nós aventamos é a de que a clivagem da APP ocorre de maneira equilibrada, de acordo com os múltiplos mecanismos que a regulam, e que perturbações nesse equilíbrio fazem com que ela tenda para um lado ou para o outro – isso é, com que haja maior formação de peptídeo β -amiloide ou sAPP α -, favorecendo o desenvolvimento da DA ou de neoplasias malignas.

Ao longo do primeiro capítulo, apresentamos alguns achados da literatura que corroboram essa hipótese. Primeiramente, evidenciamos que a clivagem da APP é um processo regulado por diversas vias intracelulares envolvendo proteínas cinases, RNAs, lipídeos, domínios de membranas e múltiplos compartimentos citoplasmáticos. Essa regulação ocorre de diferentes formas: algumas dessas moléculas agem sobre as α -secretases (cujo protótipo é a ADAM10), seja inibindo ou estimulando sua atividade, seja suprimindo ou induzindo a sua expressão; outras moléculas exercem os mesmos efeitos sobre as β -secretases (BACE1). Ainda, há reguladores que agem sobre a própria APP, alterando a sua expressão. Desse modo, nos debruçamos sobre a literatura que contemplava os principais mecanismos pelos quais a atividade e expressão das três principais proteínas envolvidas na clivagem da APP são reguladas.

Encontramos uma série de reguladores desta via; entretanto, alguns se destacaram por terem sido estudados tanto em sua relação com a clivagem da APP pela via amiloidogênica quanto pela via não-amiloidogênica (Figura 4).

Table 2
Molecules associated to APP processing and products in cancer (non-amyloidogenic pathway) and/or Alzheimer Disease (amyloidogenic pathway).

Molecule	Proposed mechanism on APP processing	Type of experiment	Alzheimer Disease	Cancer	References
Erk 1/2	EGF increases sAPP α secretion through Erk 1/2 pathway; the activation of this cascade has been related to decreased β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↓	↑	Watson and Fan, 2005; Kim et al., 2006; Canet-Aviles et al., 2002; Tang et al., 2010
RNA α RS-7	α RS-7 reduces APP and BACE1 cellular levels, promoting their degradation by lysosomal and proteasomal mechanisms.	<i>In vitro</i>	↓	*†	Shi et al., 2017; Fan et al., 2018
NGF	NGF increases ADAM 10, a major α -secretase, expression, inducing non-amyloidogenic cleavage of APP and, therefore, reduced β -amyloid levels.	<i>In vitro</i>	↓	*†	Xie et al., 2015; Bmdkhan et al., 2015
FGF2	FGF2 reduces BACE1 expression, inducing impaired β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↓	*†	Xie et al., 2015; Reiland et al., 2006
miR-98-5p	miR-98-5p downregulation reduces β -amyloid formation through regulation of SNX6 expression.	<i>In vitro</i>	↑	↓	Li et al., 2016; Wu et al., 2018
JNK	JNK phosphorylates APP in a way that lead to β -amyloid formation and inhibits its degradation.	<i>In vitro</i>	↑	* and †*	Colombo et al., 2009; Bubici and Papa, 2014
MAPK p38 α	MAPK p38 α inhibits BACE1 degradation, thus promoting increased levels of this enzyme and increased activity, leading to increased β -amyloid production.	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	↑	* and †*	Schneider et al., 2016; Wagner and Nebreda, 2009
miR-195	miR-195 negatively regulates BACE1 translation, which induces decreased β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↓	†*	Zhu et al., 2012; Iresako et al., 2014
BN1	BN1 promotes BACE1 degradation, thus reducing β -amyloid levels; its depletion is related to increased β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↓	†*	Miyagawa et al., 2016; Wang et al., 2017
SUMO	SUMO interacts with BACE1 and induces its accumulation, thus leading to increased β -amyloid formation.	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	↑	*†	Yun et al., 2013; Han et al., 2018
SEPT8	SEPT8 increased expression of stabilized BACE1, which in turn enhanced its activity and led to increased β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↑	*†	Kurkinen et al., 2016; Liu et al., 2010
NFK β	NFK β expression results in increased BACE1 transcription and enhances β -secretase activity, as well as β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↑	*†	Chen et al., 2012; Tilborghs et al., 2017
PKC	PKC activation induces increased sAPP α generation, but not increased APP expression. This effect is mediated by particular PKC isoforms, as PKC α . Others isoforms, as PKC ϵ , correlate with β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↑	↑	Racchi et al., 2003; Krause et al., 2008; Du et al., 2018
NMDA receptor	Under physiological conditions, it induces sAPP α secretion; on excitotoxicity conditions, however, it induces β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↑	*†	Rzeski et al., 2001; Lesné et al., 2005; Hoey et al., 2009
AGEs	AGEs were shown as capable of inducing β -amyloid production.	<i>In vitro</i>	↑	*†	Ko et al., 2010, 2015; Sharaf et al., 2015
RAGE	β -amyloid interacts with RAGE and triggers apoptosis cascade.	<i>In vitro</i>	↑	*†	Omyang et al., 2005; Sparvero et al., 2009
Cholesterol	Cholesterol-depleted cells showed reduced β -secretase activity and β -amyloid formation. Also, cholesterol increases β -amyloid toxicity and, when metabolized, may decrease α -secretase activity.	<i>In vitro</i>	↑	?	Simons et al., 1998; Ferrera et al., 2008; Nelson and Alkon, 2005
Sphingolipids	Sphingolipids accumulation is related to decreased APP degradation, increased γ -secretase activity and increased β -amyloid production	<i>In vitro</i>	↑	†*	Tamboli et al., 2011; Sawamura et al., 2004.
GM1 ganglioside	GM1 increases β -amyloid production through its effects on gamma-secretase; also, it reduces sAPP α secretion.	<i>In vitro</i>	↑	?	Zha et al., 2004

† indicates that the referred molecule/pathway is positively related to APP processing in the disease, i.e., upregulated.

↓ indicates that the referred molecule/pathway is negatively related to APP processing in the disease, i.e., downregulated.

* indicates that there are studies with this molecule/pathway in the disease, but they are not directly related to APP processing.

? indicates that there are no studies to our knowledge studying if the molecule/pathway affects APP processing in the disease.

AD: Alzheimer disease; APP: amyloid precursor protein.

Figura 4. Tabela do primeiro capítulo elencando os diferentes reguladores da clivagem da APP e quais destes foram estudados em ambas as vias pelas quais essa clivagem pode ocorrer. Destaque para a PKC e para a Erk 1/2, que foi estudada não apenas em ambas as vias, mas também em DA e câncer especificamente.

Algumas informações elencadas nesta tabela sobressaem-se. Primeiramente, observamos que apenas a Erk 1/2 e a PKC haviam sido estudadas por seu envolvimento com a clivagem da APP tanto em câncer quanto em DA. No caso da Erk 1/2, conforme esperávamos, os dados demonstram uma atuação antagônica nas doenças. Na DA, a superativação da via da Erk 1/2 leva à diminuição na produção de peptídeo β -amiloide (Kim et al. 2006); por outro lado, é por meio da estimulação dessa mesma via que o EGF aumenta a secreção de sAPP α em um modelo de carcinoma de nasofaringe (Tang et al. 2010). Já no caso da PKC, os dados são menos intuitivos; a PKC é capaz de induzir aumento na secreção de sAPP α e de peptídeo β -amiloide (Racchi et al. 2003; Du et al. 2018). O que determina qual das vias será favorecida é a isoforma específica da PKC que está atuando; a PKC α induz secreção de sAPP α (Racchi et al. 2003); já a PKC δ estimula a produção de peptídeo β -amiloide (Du et al. 2018). Esses dados por si só evidenciam a complexidade da regulação dessa via e como alterações em pequenos fatores dessa regulação levam a mudanças importantes na clivagem da APP.

Outro dado que merece destaque, e que também discutimos ao longo do capítulo um, é o quão pouco se estudou a via da APP no contexto das neoplasias malignas. A diversidade de fenômenos bioquímicos que já foram implicados em cânceres é imensa, o que justifica em parte que ela possa não ter sido completamente explorada ainda; entretanto, dada a abundância de conhecimentos que se têm a respeito dessa via pelos anos de estudo em DA, chama a atenção que esses conhecimentos não tenham sido transpostos para outro campo.

Por fim, nossa revisão da literatura envolvendo a regulação da clivagem da APP também demonstra um foco absoluto sobre as proteínas que possam modular esse processo. Ainda que tenhamos elencado alguns estudos envolvendo lipídeos, domínios de membrana e ácidos nucleicos, a maioria dos trabalhos revisados focava sua atenção sobre proteínas. Em especial, é notável a escassez de trabalhos que tenham explorado miRNAs que possam modular essa via e, acima de tudo, a escassez desses trabalhos em modelos de câncer.

A partir desta última observação e considerando o interesse crescente da literatura em relação aos miRNAs, inclusive dentro do nosso grupo de pesquisa, esta tese debruçou-se, em seu segundo capítulo, sobre o papel que os miRNAs podem exercer na regulação da clivagem da APP em um modelo de neoplasia maligna. O modelo utilizado foi o CEC devido à sua prevalência, à sua gravidade e em especial à sua relevância em países em desenvolvimento, como o Brasil. Ainda, nós nos propomos a analisar o papel que esses miRNAs desempenham no tumor – ou seja, se eles têm atividades que favorecem a formação tumoral, agindo como oncomiRNAs, ou se eles agem de modo a suprimir os tumores, atuando como supressores tumorais.

Esses ácidos nucleicos têm sido estudados principalmente dentro do contexto do microambiente tumoral, um conceito formulado ainda na década de 1970 (Verloes e Kanarek 1976) cuja importância foi reestabelecida nos anos 2000. Nesse sentido, as VEs são possivelmente os componentes deste microambiente que têm sido mais investigadas. Dessa forma, considerando a experiência prévia do nosso grupo na avaliação de VEs em diferentes contextos (Bertoldi et al. 2018; Gomes de Andrade et al. 2018), a avaliação dos potenciais papéis de miRNAs envolvidos na regulação da clivagem da APP e seus níveis em VEs derivadas de células neoplásicas foi o objetivo do segundo capítulo desta tese.

Nós selecionamos seis miRNAs para avaliar no interior de VEs derivadas de três linhagens de células. Esses miRNAs foram selecionados por sua capacidade de modular a expressão da ADAM10, a principal α -secretase, e a da própria APP. Das três linhagens, uma era de queratinócitos saudáveis, HaCaT, tradicionalmente utilizada como controle em estudos com CEC, e as outras duas eram linhagens de CEC com diferentes graus de agressividade: CAL27, uma linhagem de células displásicas pouco agressivas, e SCC09, uma linhagem de CEC agressivo. Nosso objetivo era avaliar se havia alguma correlação entre os níveis de miRNA e a agressividade da linhagem celular.

Dos miRNAs estudados, dois têm a ADAM10 como alvo: o miRNA-92b-3p e o miR-103a-3p. Chama a atenção que dos seis miRNAs que estudamos, apenas o miR-92b-3p exerce papel supressor tumoral (Ratovitski 2014). Nossos dados indicaram um aumento nos níveis desse miRNA em VEs derivados de SCC09, a linhagem mais agressiva. Já no caso do miR-103a-3p, não houve diferença estatisticamente significativa. Dado o papel que o miR-92b-3p exerce sobre a ADAM10, inibindo a sua expressão, é possível que os níveis aumentados dessa molécula no meio intracelular levem à diminuição da atividade α -secretase e, por conseguinte, diminuam a via tumorigênico de clivagem da APP. Dessa forma, a diminuição na concentração intracitoplasmática do miR-92b-3p é um evento pró-tumorigênico. Logo, infere-se que as VEs, ao transportarem esse miRNA para o meio extracelular, favorecem a formação do tumor. O fato do miR-103a-3p não se comportar da mesma forma indica que a capacidade das VEs de regular a concentração intracelular de miRNAs de forma a favorecer a tumorigênese não é absoluta, aplicando-se a alguns miRNAs em circunstâncias específicas, as quais carecem de elucidação.

Dentre os miRNAs que atuam sobre a APP (miR-31-5p, miR-20a-5p, miR-93-5p, miR-424-5p), três comportam-se como oncomiRNAs – miR-31-5p, miR-93-5p e miR-424-5p. Quanto ao miR-20a-5p, há debates na literatura quanto ao seu papel nestes tumores. Isso porque um estudo experimental demonstrou que esse miRNA exerce função de oncomiRNA em modelos de câncer de cabeça e pescoço (Wu et al. 2018); entretanto, uma metanálise publicada quase simultaneamente indicou que pacientes com baixa expressão do miR-20a-5p apresentam pior prognóstico clínico em termos de mortalidade (Troiano et al. 2018), o que indica que esse miRNA poderia exercer um efeito contrário ao da formação e progressão tumoral. Portanto, o papel real do miR-

20a-5p não está completamente elucidado, entretanto pode-se aventar a possibilidade de que especificamente em tumores de cavidade oral ele atue como supressor tumoral. De qualquer forma, os níveis desse miRNA em VEs derivadas de tumores não foram estatisticamente diferentes dos de VEs derivadas de células saudáveis.

Dos outros três miRNAs que têm a APP como alvo, o miR-31-5p tem função de oncomiRNA bem estabelecida no CEC (Lai et al. 2018). Originalmente, especulou-se que a função tumorigênica desse ácido nucleico ocorra por meio da inibição da ACOX1, alterando processos metabólicos intracelulares. Dessa forma, é provável que a atividade oncogênica do miR-31-5p seja independente da sua função na via da APP. O miR-424-3p também tem atividade de oncomiRNA por meio de sua ação sobre a SCAI (Y. Zhang et al. 2020); já o miR-93-5p só foi estudado no contexto de neoplasias de cabeça e pescoço genericamente, no qual também atua como oncomiRNA (S. Zhang et al. 2020).

O conceito de miRNAs como supressores tumorais ou oncomiRNAs foi amplamente revisado por Xavier et al. (2020). Esta ideia inspira-se na divisão dos genes em oncogenes e genes supressores tumorais. No caso dos miRNAs que estudamos aqui, nossa hipótese inicial seria de que todos eles fossem supressores tumorais, haja vista que nossos alvos de interesse, a ADAM10 e a APP, são as proteínas essenciais da via amiloidogênica de clivagem da APP, uma via pró-tumoral. Entretanto, os dados prévios da literatura contrariam essa hipótese, provavelmente devido à interação desses miRNAs com outros elementos da sinalização intracelular.

Um dos principais interesses em torno da atividade pró-tumoral ou supressora tumoral dos miRNAs é quais são os mecanismos que regulam a sua expressão intracelular e a sua atividade. A partir dos nossos resultados e em conjunto com a literatura prévia, nós hipotetizamos que a liberação de miRNAs por meio das VEs é um dos mecanismos envolvidos nesta regulação (Figura 5).

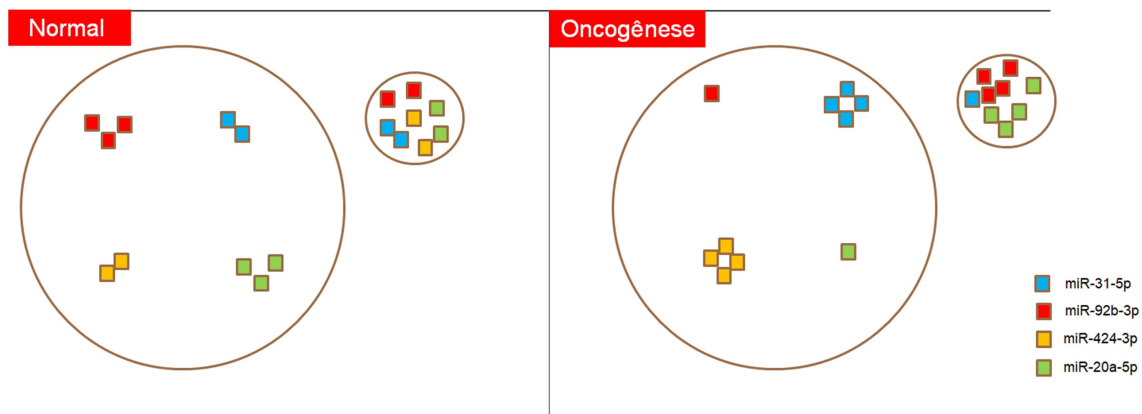


Figura 5. À esquerda, situação de homeostase com expressão habitual de miRNAs intracelular e no interior das VEs; à direita, modificações na expressão dessas moléculas que estão associadas ao CEC. Chang et al, 2013; Peng e Croce 2016; Zeljic et al, 2018; (Lai et al. 2018).

Assim sendo, nós propusemos a hipótese de que o transporte de miRNAs para o meio extracelular por meio de VEs é um dos mecanismos pelos quais a expressão desses ácidos nucleicos no interior das células é regulada. Os processos específicos pelos quais os miRNAs são empacotados nas VEs ainda são pouco elucidados; uma revisão recente demonstrou o papel de sequências de nucleotídeos terminais específicas e de alterações pós-transcricionais como urodinilação (Mills et al. 2019); de qualquer forma, o que se sabe é que os miRNAs não são aleatoriamente distribuídos em VEs, mas sim arranjados de acordo com sinais biológicos bem regulados (Figura 6).

Dessa forma, no contexto de CEC, considerando nossos dados indicando que a secreção de miRNAs pelas VEs é um mecanismo de regulação dos níveis intracelulares desses ácidos nucleicos, de modo que a secreção de alguns oncomiRNAs esteja aumentada e a de alguns miRNAs supressores tumorais esteja diminuída, o que favorece a proliferação e perpetuação desses tumores.

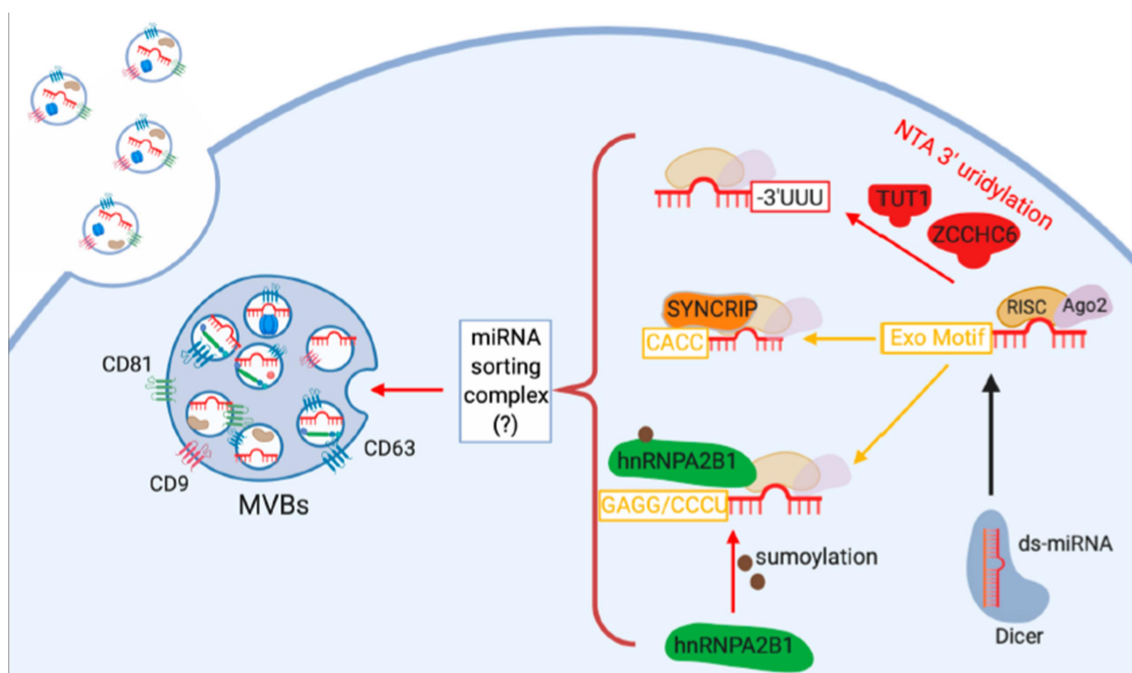


Figura 6. Os sinais envolvidos na secreção de miRNAs em VEs ainda são pouco compreendidos; nesta imagem, de Mills et al. 2019, estão representados alguns desses mecanismos.

A exemplo do que acontece na oncogenética, campo no qual os oncogenes são foco de mais estudos do que os genes supressores tumorais, os oncomiRNAs também foram mais estudados do que os miRNAs supressores tumorais. Em uma revisão publicada por Xavier e colegas (2020) avaliou-se o papel que as VEs desempenham nas diferentes etapas da carcinogênese, a partir do clássico conceito dos “hallmarks of cancer” proposto por Hanahan e Weinberg (2011); interessante, uma parcela significativa dos dados elencados nesta revisão referem-se a ácidos nucleicos, em especial miRNAs, e a maior parte desses dados dizem respeito a oncomiRNAs. Do nosso conhecimento, dois estudos principais trabalharam com o conceito de miRNAs supressores tumorais: um envolvendo carcinoma urotelial e o miRNA-23b (Ostenfeld et al. 2014) e outro a respeito do papel do miR-202-3p em leucemia linfocítica crônica (Farahani et al. 2015), ambos demonstrando a relação entre níveis aumentados deste miRNAs em VEs e desenvolvimento dos tumores estudados.

Assim sendo, os miRNAs constituem um campo de estudo a ser desbravado, em especial no contexto das VEs e do CEC, pelos seus potenciais papéis oncogênicos e supressores tumorais. Nós fornecemos evidências, ao longo desta tese, de que miRNAs envolvidos na regulação da APP provavelmente têm seus níveis modificados em linhagens de CEC devido a alterações na sua secreção por meio de VEs. Ainda, nós

partimos de uma estratégia de pesquisa pouco ortodoxa, adotando conhecimentos bem sedimentados a respeito de uma via molecular amplamente estudada em outra doença e buscando aplicar esses conhecimentos à cancerologia. A partir deste trabalho, sedimentam-se perspectivas para explorar diferentes papéis que as VEs exercem não apenas como mediadoras da comunicação intercelular, mas também como reguladoras da concentração intracelular de proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas.

8. Conclusão

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem concluir que:

- Câncer e doença de Alzheimer estão inversamente associadas em termos de incidência;
- Alterações na homeostase da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) podem justificar essa associação;
- MicroRNAs regulam a clivagem da APP e podem estar entre os mecanismos desregulados nos processos patológicos;
- MicroRNAs podem atuar como supressores tumorais ou promotores da oncogênese;
- MicroRNAs supressores tumorais, a exemplo dos que regulam a clivagem da APP, são menos estudados do que os oncomiRNAs;
- As vesículas extracelulares são um mecanismo por meio do qual a concentração intracelular de miRNAs pode ser regulada e, desta forma, estão implicadas na formação de uma série de tumores.

Esse conjunto de resultados permite uma compreensão mais abrangente dos mecanismos envolvidos na regulação da clivagem da APP, um processo amplamente estudada em DA, porém que também está implicado em uma série de neoplasias. Em especial, enfatizamos o papel que os miRNAs podem exercer na regulação deste processo biológico e como perturbações na concentração desses ácidos nucleicos podem corroborar o desenvolvimento de neoplasias malignas, principalmente carcinoma espinocelular oral. Por fim, nossos resultados vão ao encontro da literatura e sugerem as vesículas extracelulares como um mecanismo regulador da concentração intracelular de miRNAs, de modo a impactar significativamente no desenvolvimento de condições patológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ai, Ruixue, Yan Tao, Yilong Hao, Lu Jiang, Hongxia Dan, Ning Ji, Xin Zeng, Yu Zhou, e Qianming Chen. 2017. “Microenvironmental Regulation of the Progression of Oral Potentially Malignant Disorders towards Malignancy”. *Oncotarget* 8 (46): 81617–35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20312>.
- Bagan, Jose, Gracia Sarrion, e Yolanda Jimenez. 2010. “Oral Cancer: Clinical Features”. *Oral Oncology* 46 (6): 414–17. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.009>.
- Bang, Oh Young, e Eun Hee Kim. 2019. “Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Therapy for Stroke: Challenges and Progress”. *Frontiers in Neurology* 10: 211. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00211>.
- Becker, Annette, Basant Kumar Thakur, Joshua Mitchell Weiss, Han Sang Kim, Hector Peinado, e David Lyden. 2016. “Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis”. *Cancer Cell* 30 (6): 836–48. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>.
- Bertoldi, Karine, Laura Reck Cechinel, Bruna Schallenberger, Giana Blume Corssac, Samuel Davies, Irene Clemes Külkamp Guerreiro, Adriane Belló-Klein, Alex Sander R. Araujo, e Ionara Rodrigues Siqueira. 2018. “Circulating Extracellular Vesicles in the Aging Process: Impact of Aerobic Exercise”. *Molecular and Cellular Biochemistry* 440 (1–2): 115–25. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3160-4>.
- Colombo, Marina, Graça Raposo, e Clotilde Théry. 2014. “Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 255–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- Dos Santos Costa, Sara Ferreira, Peter A. Brennan, Ricardo Santiago Gomez, Eduardo Rodrigues Fregnani, Alan Roger Santos-Silva, Manoela Domingues Martins, Gilberto de Castro-Junior, Siavash Rahimi, e Felipe Paiva Fonseca. 2018. “Molecular Basis of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: Is It Any Different from Older Patients?” *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 47 (6): 541–46. <https://doi.org/10.1111/jop.12642>.
- Fabbri, Muller, Mircea Ivan, Amelia Cimmino, Massimo Negrini, e George A. Calin. 2007. “Regulatory Mechanisms of MicroRNAs Involvement in Cancer”. *Expert Opinion on Biological Therapy* 7 (7): 1009–19. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.7.1009>.
- Farahani, Mosavar, Carlos Rubbi, Luning Liu, Joseph R. Slupsky, e Nagesh Kalakonda. 2015. “CLL Exosomes Modulate the Transcriptome and Behaviour of Recipient Stromal Cells and Are Selectively Enriched in MiR-202-3p”. *PLOS ONE* 10 (10): e0141429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141429>.
- Freedman, Daryl Michal, Jincuo Wu, Honglei Chen, Ralph W. Kuncl, Lindsey R. Enewold, Eric A. Engels, Neal D. Freedman, e Ruth M. Pfeiffer. 2016. “Associations

- between cancer and Alzheimer's disease in a U.S. Medicare population". *Cancer Medicine* 5 (10): 2965–76. <https://doi.org/10.1002/cam4.850>.
- Galvão, Fernando, Kamila Castro Grokoski, Bruno Batista da Silva, Marcelo Lazzaron Lamers, e Ionara Rodrigues Siqueira. 2019. "The Amyloid Precursor Protein (APP) Processing as a Biological Link between Alzheimer's Disease and Cancer". *Ageing Research Reviews* 49 (janeiro): 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.11.007>.
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Christina Fitzmaurice, Christine Allen, Ryan M. Barber, Lars Barregard, Zulfiqar A. Bhutta, Hermann Brenner, et al. 2017. "Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study". *JAMA Oncology* 3 (4): 524. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>.
- Gomes de Andrade, Gisele, Laura Reck Cechinel, Karine Bertoldi, Fernando Galvão, Paulo Valdeci Worm, e Ionara Rodrigues Siqueira. 2018. "The Aging Process Alters IL-1 β and CD63 Levels Differently in Extracellular Vesicles Obtained from the Plasma and Cerebrospinal Fluid". *Neuroimmunomodulation* 25 (1): 18–22. <https://doi.org/10.1159/000488943>.
- Ha, Minju, e V. Narry Kim. 2014. "Regulation of MicroRNA Biogenesis". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (8): 509–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- Hanahan, Douglas, e Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hoffmann, J., C. Twisselmann, M. P. Kummer, P. Romagnoli, e V. Herzog. 2000. "A Possible Role for the Alzheimer Amyloid Precursor Protein in the Regulation of Epidermal Basal Cell Proliferation". *European Journal of Cell Biology* 79 (12): 905–14. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00117>.
- Kawakubo-Yasukochi, Tomoyo, Masahiko Morioka, Yoshikazu Hayashi, Takuya Nishinakagawa, Mai Hazekawa, Shintaro Kawano, Seiji Nakamura, e Manabu Nakashima. 2016. "The SQUU-B Cell Line Spreads Its Metastatic Properties to Nonmetastatic Clone SQUU-A from the Same Patient through Exosomes". *Journal of Oral Biosciences* 58 (1): 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.job.2015.10.001>.
- Kim, Su-Kyoung, Hyun-Jung Park, Hyun Seok Hong, Eun Joo Baik, Min Whan Jung, e Inhee Mook-Jung. 2006. "ERK1/2 Is an Endogenous Negative Regulator of the Γ secretase Activity". *The FASEB Journal* 20 (1): 157–59. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4055fje>.
- Kuriyama, Naoya, Yusuke Yoshioka, Shinsuke Kikuchi, Nobuyoshi Azuma, e Takahiro Ochiya. 2020. "Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Tumor Neovasculation". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (dezembro): 611039. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611039>.
- Lai, Yi-Hsuan, Hsuan Liu, Wei-Fan Chiang, Ting-Wen Chen, Lichieh Julie Chu, Jau-Song Yu, Shu-Jen Chen, Hua-Chien Chen, e Bertrand Chin-Ming Tan. 2018. "MiR-31-5p-ACOX1 Axis Enhances Tumorigenic Fitness in Oral Squamous Cell Carcinoma Via

the Promigratory Prostaglandin E2". *Theranostics* 8 (2): 486–504.
<https://doi.org/10.7150/thno.22059>.

Lanni, Cristina, Mirco Masi, Marco Racchi, e Stefano Govoni. 2021. "Cancer and Alzheimer's Disease Inverse Relationship: An Age-Associated Diverging Derailment of Shared Pathways". *Molecular Psychiatry* 26 (1): 280–95.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0760-2>.

Li, Ling, Chao Li, Shaoxin Wang, Zhaohui Wang, Jian Jiang, Wei Wang, Xiaoxia Li, et al. 2016. "Exosomes Derived from Hypoxic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Deliver MiR-21 to Normoxic Cells to Elicit a Prometastatic Phenotype". *Cancer Research* 76 (7): 1770–80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1625>.

Maacha, Selma, Ajaz A. Bhat, Lizandra Jimenez, Afsheen Raza, Mohammad Haris, Shahab Uddin, e Jean-Charles Grivel. 2019. "Extracellular Vesicles-Mediated Intercellular Communication: Roles in the Tumor Microenvironment and Anti-Cancer Drug Resistance". *Molecular Cancer* 18 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0965-7>.

Mills, Joseph, Marina Capece, Emanuele Cocucci, Anna Tessari, e Dario Palmieri. 2019. "Cancer-Derived Extracellular Vesicle-Associated MicroRNAs in Intercellular Communication: One Cell's Trash Is Another Cell's Treasure". *International Journal of Molecular Sciences* 20 (24): 6109. <https://doi.org/10.3390/ijms20246109>.

Mittal, Sonam, Prachi Gupta, Pradeep Chaluvally-Raghavan, e Sunila Pradeep. 2020. "Emerging Role of Extracellular Vesicles in Immune Regulation and Cancer Progression". *Cancers* 12 (12): 3563. <https://doi.org/10.3390/cancers12123563>.

Ng, Jia Hui, N. Gopalakrishna Iyer, Min-Han Tan, e Gustaf Edgren. 2017. "Changing Epidemiology of Oral Squamous Cell Carcinoma of the Tongue: A Global Study". *Head & Neck* 39 (2): 297–304. <https://doi.org/10.1002/hed.24589>.

Ostenfeld, Marie Stampe, Dennis K. Jeppesen, Jens R. Laurberg, Anders T. Boysen, Jesper B. Bramsen, Bjarke Primdal-Bengtson, An Hendrix, et al. 2014. "Cellular Disposal of MiR23b by RAB27-Dependent Exosome Release Is Linked to Acquisition of Metastatic Properties". *Cancer Research* 74 (20): 5758–71.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3512>.

Peng, Yong, e Carlo M Croce. 2016. "The role of MicroRNAs in human cancer". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1 (janeiro): 15004.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.

Principe, Simona, Salvador Mejia-Guerrero, Vladimir Ignatchenko, Ankit Sinha, Alexandr Ignatchenko, Willa Shi, Keira Pereira, et al. 2018. "Proteomic Analysis of Cancer-Associated Fibroblasts Reveals a Paracrine Role for MFAP5 in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma". *Journal of Proteome Research* 17 (6): 2045–59.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00925>.

Qadir, Fatima, Mohammad Arshad Aziz, Chrisdina Puspita Sari, Hong Ma, Haiyan Dai, Xun Wang, Dhires Raithatha, et al. 2018. "Transcriptome reprogramming by cancer

exosomes: identification of novel molecular targets in matrix and immune modulation”. *Molecular Cancer* 17 (1): 97. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0846-5>.

Racchi, M., M. Mazzucchelli, A. Pascale, M. Sironi, e S. Govoni. 2003. “Role of Protein Kinase C α in the Regulated Secretion of the Amyloid Precursor Protein”. *Molecular Psychiatry* 8 (2): 209–16. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001204>.

Ramakers, Christian, Jan M Ruijter, Ronald H.Lekanne Deprez, e Antoon F.M Moorman. 2003. “Assumption-Free Analysis of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Data”. *Neuroscience Letters* 339 (1): 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4).

Ratovitski, Edward A. 2014. “Phospho- Δ Np63 α /microRNA network modulates epigenetic regulatory enzymes in squamous cell carcinomas”. *Cell Cycle* 13 (5): 749–61. <https://doi.org/10.4161/cc.27676>.

Sakha, Sujata, Tomoki Muramatsu, Koji Ueda, e Johji Inazawa. 2016. “Exosomal MicroRNA MiR-1246 Induces Cell Motility and Invasion through the Regulation of DENND2D in Oral Squamous Cell Carcinoma”. *Scientific Reports* 6 (1): 38750. <https://doi.org/10.1038/srep38750>.

Sento, Shinya, Eri Sasabe, e Tetsuya Yamamoto. 2016. “Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells Induced by Tumor Cell-Derived Exosomes”. *PLOS ONE* 11 (2): e0148454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148454>.

Song, Xiaowei, Xihu Yang, Rahul Narayanan, Vishnu Shankar, Sathiyaraj Ethiraj, Xiang Wang, Ning Duan, Yan-Hong Ni, Qingang Hu, e Richard N. Zare. 2020. “Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosed from Saliva Metabolic Profiling”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (28): 16167–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001395117>.

Sun, Li-Ping, Kai Xu, Jing Cui, Dao-Ying Yuan, Bo Zou, Jun Li, Jian-Lin Liu, Ke-Yi Li, Zhen Meng, e Bin Zhang. 2019. “Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miR-382-5p promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma”. *Oncology Reports* 42 (4): 1319–28. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7255>.

Sy, Ko, Lin Sc, Chang Kw, Wong Yk, Liu Cj, Chi Cw, e Liu Ty. 2004. “Increased Expression of Amyloid Precursor Protein in Oral Squamous Cell Carcinoma.” *International Journal of Cancer* 111 (5): 727–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.20328>.

Tang, Can-E, Yong-Jun Guan, Bin Yi, Xin-Hui Li, Ke Liang, Hai-Yan Zou, Hong Yi, et al. 2010. “Identification of the Amyloid β -Protein Precursor and Cystatin C as Novel Epidermal Growth Factor Receptor Regulated Secretory Proteins in Nasopharyngeal Carcinoma by Proteomics”. *Journal of Proteome Research* 9 (12): 6101–11. <https://doi.org/10.1021/pr100663p>.

Théry, Clotilde, Kenneth W. Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D. Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, et al. 2018. “Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the

- MISEV2014 Guidelines”. *Journal of Extracellular Vesicles* 7 (1): 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- Troiano, G., F. Mastrangelo, V.C.A. Caponio, L. Laino, N. Cirillo, e L. Lo Muzio. 2018. “Predictive Prognostic Value of Tissue-Based MicroRNA Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Journal of Dental Research* 97 (7): 759–66. <https://doi.org/10.1177/0022034518762090>.
- Valadi, Hadi, Karin Ekström, Apostolos Bossios, Margareta Sjöstrand, James J. Lee, e Jan O. Lötvall. 2007. “Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells”. *Nature Cell Biology* 9 (6): 654–59. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>.
- Verloes, R., e L. Kanarek. 1976. “Tumour Microenvironment Studies Open New Perspectives for Immunotherapy”. *Archives Internationales De Physiologie Et De Biochimie* 84 (2): 420–22.
- Weingarten, Jens, Melanie Weingarten, Martin Wegner, e Walter Volkandt. 2017. “APP—A Novel Player within the Presynaptic Active Zone Proteome”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00043>.
- Wu, Hong, Pai Pang, Min-Da Liu, Song Wang, Shan Jin, Fa-Yu Liu, e Chang-Fu Sun. 2018. “Upregulated miR-20a-5p expression promotes proliferation and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting of TNFRSF21”. *Oncology Reports* 40 (2): 1138–46. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6477>.
- Xavier, Cristina P. R., Hugo R. Caires, Mélanie A. G. Barbosa, Rui Bergantim, José E. Guimarães, e M. Helena Vasconcelos. 2020. “The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance”. *Cells* 9 (5): 1141. <https://doi.org/10.3390/cells9051141>.
- ZHANG, G., Z. CHEN, Y. ZHANG, T. LI, Y. BAO, e S. ZHANG. 2020. “Inhibition of miR-103a-3p suppresses the proliferation in oral squamous cell carcinoma cells via targeting RCAN1”. *Neoplasma* 67 (março). https://doi.org/10.4149/neo_2020_190430N382.
- Zhang, Shuiting, Yanjuan He, Chao Liu, Guo Li, Shanhong Lu, Qiancheng Jing, Xiyu Chen, et al. 2020. “MiR-93-5p Enhances Migration and Invasion by Targeting RGMb in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck”. *Journal of Cancer* 11 (13): 3871–81. <https://doi.org/10.7150/jca.43854>.
- Zhang, Yu, Kaiqi Tang, Lizhu Chen, Meng Du, e Zhi Qu. 2020. “Exosomal CircGDI2 Suppresses Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Through the Regulation of MiR-424-5p/SCAI Axis”. *Cancer Management and Research* 12 (agosto): 7501–14. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S255687>.