

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS CIRCULANTES DO GENE DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, *EGFR*, expressão gênica

Autores:

Diogo Back Sartoretto, FCM – UNICAMP

Juliana Carron, FCM – UNICAMP

Carmen Silvia Passos Lima, FCM – UNICAMP

Gustavo Jacob Lourenço (orientador), FCM – UNICAMP

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) é um tumor de alta incidência e mortalidade no mundo (1). O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é fundamental na proliferação de células do CCECP e inibidores do EGFR são utilizados como agentes terapêuticos (2, 3). O EGFR ativa os fatores de transcrição STAT3 e NF- κ B da via PI3K/Akt/mTOR e esses levam a produção de proteínas responsáveis pela progressão do CCECP (4). Pacientes com CCECP apresentam evoluções distintas e é possível que diferentes níveis de expressão do *EGFR* determinem essas diferenças (1).

Em pacientes com CCECP, é possível observar a presença de DNA e RNA tumoral circulantes no sangue periférico (5, 6). Células tumorais podem sofrer processos de morte celular, liberando o seu material genético no sangue (7). As células tumorais circulantes são fagocitadas, porém, em casos de tumor em estágios avançados, os fagócitos reduzem a sua atividade e permitem a circulação dessas células e, conseqüente, do material genético tumoral no sangue periférico (8). Dessa maneira, a análise de material genético tumoral circulante no sangue de pacientes com CCECP pode monitorar a evolução do tumor e a resposta ao tratamento (5). A presença de células tumorais circulantes do CCECP foi associada com a presença de metástase regional em pacientes com tumores inoperáveis (9).

Dessa maneira, nos pareceu de interesse avaliar a expressão de transcritos circulantes do *EGFR* em sangue periférico de pacientes com CCECP atendidos em nossa Instituição.

METODOLOGIA

Avaliamos, de forma retrospectiva, 130 pacientes com CCECP que foram atendidos no Serviço de Oncologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, seja por ocasião do diagnóstico ou durante seguimento clínico, entre julho de 2022 e março de 2023.

Aspectos clínicos e do tumor

Os aspectos clínicos (idade, sexo, cor da pele, tabagismo e etilismo) e do tumor (localização, grau de diferenciação, tamanho do tumor, número de linfonodo locorregional acometido, metástase à distância e estágio do tumor) dos 130 pacientes foram obtidos por meio dos prontuários eletrônicos dos pacientes. O diagnóstico do CCECP foi realizado em cortes histológicos do tumor e o estágio do tumor foi identificado por exame clínico, tomografia computadorizada do pescoço e radiografia do tórax (10).

Análise molecular do *EGFR*

O RNA total foi obtido das 130 amostras de sangue periférico dos pacientes com CCECP por meio do reagente Trizol® (Invitrogen®, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e o grau de pureza das amostras foram determinados por meio do espectrofotômetro Nanodrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, EUA).

As amostras de RNA (1 µg) foram tratadas com DNase (New England Biolabs®, EUA) e submetidas à síntese de cDNA com o conjunto de reagentes do *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific®, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de cDNA (amostra de estoque) foram diluídas para uma concentração de 100 ng/µl (amostra de trabalho). O cDNA foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C até o momento da quantificação da expressão gênica.

As amostras de cDNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de parte do gene endógeno *GAPDH* para avaliar a integridade do cDNA. A PCR foi realizada com a utilização de uma mistura de 16,5 µl de água estéril, 2,5 µl de tampão, 1,5 µl de MgSO₄ (50mM), 0,5 µl de dNTP (10mM), 1 µl de Taq DNA polimerase e 0,5µl de cada iniciador do *GAPDH* (10 nM) (**Tabela 1**) e 2 µl de cDNA diluídos à 100 ng/µl. Os ciclos de amplificação estão apresentados na **Tabela 2**. Após a reação, 10 µl do produto da PCR foi submetido a corrida eletroforética em cuba de eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (UV), foram obtidos fragmentos de 80 pares de base (pb).

A quantificação da expressão do gene *EGFR* foi realizada por meio da PCR quantitativa (qPCR), utilizando 300 ng de cDNA de cada amostra e o conjunto de reagentes do kit *SYBR Green PCR Master Mix*® (Applied Biosystems®, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Todas as reações foram realizadas em triplicata e controles negativos (água estéril) também foram utilizados. Os iniciadores e os ciclos de amplificação utilizados nas reações estão apresentados nas **Tabelas 1 e 2**. A expressão gênica foi calculada pela aplicação da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1. Sequências de iniciadores utilizados em reações da cadeia da polimerase

Gene	Sequência direta (5'-3')	Sequência reversa (5'-3')
<i>GAPDH</i> (PCR)	AAGATCATCAGCAATGCCTCCT	GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC
<i>EGFR</i> (qPCR)	GGCAGGAGTCATGGGAGAAA	GGATCTTAGGCCCATTCGTTG
<i>GAPDH</i> (qPCR)	AAGATCATCAGCAATGCCTCCT	GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC

PCR: reação em cadeia da polimerase. qPCR: PCR quantitativa

Tabela 2. Ciclos de amplificação utilizados nas reações da cadeia da polimerase

Tipo de PCR	Etapas da PCR			
	Ciclos	Desnaturação	Hibridização	Extensão
PCR convencional	35	15 segundos a 95° C	30 segundos a 55°C	1 minuto a 72°C
PCR quantitativa	45	15 segundos a 95° C	1minuto a 60°C	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspectos clínicos e do tumor

As frequências das distribuições dos 130 pacientes com CCECP de acordo com a idade, o sexo, a cor da pele, os hábitos de fumar e ingerir bebidas alcoólicas estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Frequências das distribuições dos 130 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço por idade, sexo, cor da pele, grau de instrução e hábitos do tabagismo e etilismo

Variável	Número de pacientes (variação ou %)
Idade mediana em anos	62 (25 a 85)
Idade média em anos	
≤ 60	60 (46,2)
> 60	70 (53,8)
Sexo	
Masculino	114 (87,7)
Feminino	16 (12,3)
Cor da pele	
Branca	101 (77,7)
Preta	6 (4,6)
Parda	23 (17,7)
Tabagista	
Sim ou ex	109 (83,8)
Não	11 (8,5)
Sem informação	10 (7,7)
Etilista	
Sim ou ex	99 (76,1)
Não	14 (10,8)
Sem informação	17 (13,1)

A idade média dos pacientes foi de 60 anos, e a maioria deles era do sexo masculino (87,7%), tinha a cor da pele branca (77,7%), era fumante ou ex-fumante (83,8%) e etilista ou ex-etilista (76,1%). Esses resultados indicam que nossa amostra é representativa da doença (11).

As frequências das distribuições dos 130 pacientes com CCECP de acordo com a localização, o grau de diferenciação, o tamanho do tumor, o número de linfonodo locorregional acometido, metástase à distância, estágio TNM estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Frequências das distribuições dos 130 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço por localização, grau de diferenciação, tamanho do tumor, número de linfonodo locorregional acometido, metástase à distância e estágio TNM

Variável	Número de pacientes (%)
Localização do tumor	
Cavidade oral	39 (30,0)
Orofaringe	35 (26,9)
Nasofaringe	9 (6,9)
Hipofaringe	12 (9,3)
Laringe	35 (26,9)

Grau de diferenciação	
Bem diferenciado	7 (5,4)
Moderadamente diferenciado	88 (67,7)
Pouco diferenciado	16 (12,3)
Indiferenciado	6 (4,6)
Sem informação	13 (10,0)
Tamanho do tumor	
T1	10 (7,7)
T2	17 (13,1)
T3	32 (24,6)
T4	65 (50,0)
Desconhecido	6 (4,6)
Linfonodo locorregional	
Nenhum	45 (34,6)
N1	22 (16,9)
N2	33 (25,4)
N3	22 (16,9)
Desconhecido	8 (6,2)
Metástase à distância	
Sim	8 (6,1)
Não	105 (80,8)
Sem informação	17 (13,1)
Estágio TNM	
I	5 (3,9)
II	7 (5,4)
III	24 (18,5)
IV	90 (69,2)
Sem informação	4 (3,0)

30% dos tumores estavam localizados na cavidade oral. A maioria (67,7%) foi classificada como moderadamente diferenciada. Metade deles apresentou tumores invasivos (T4), 60% tiveram linfonodos locorregionais acometidos e a maioria não apresentou metástase à distância (80,8%), embora tenha apresentado tumores em estágios avançados (TNM III ou IV). Esses dados demonstram que nossa amostra é representativa da doença (11).

Análise molecular do *EGFR*

A média dos valores de quantificação da concentração do RNA total das 130 amostras foi de 570,3 ng/μl (desvio padrão (DP): 321,6 ng/μl). A mediana foi de 533,3 ng/μl (variância: 65,3 a 2079,8 ng/μl). A média e a mediana dos valores do grau de pureza (razão de absorvância 260 e 280 nm) das 130 amostras de RNA total foram 2,02 (DP: 0,05). Considerando os valores da razão de absorvância 260 e 230 nm, a média foi 1,74, a mediana foi 1,79 e o DP foi 0,23.

Os produtos da PCR convencional de seis amostras de pacientes com CCECP obtidos após a amplificação do *GAPDH*, realizada para avaliar a integridade das amostras de cDNA, estão representados na **Figura 1**. Observamos que o *GAPDH* foi amplificado em todas as 130 amostras.

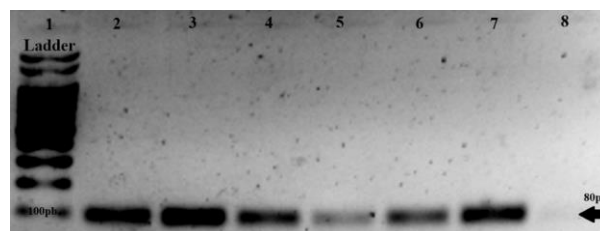


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1% com fragmentos de 80 pares de bases (pb) obtidos após a amplificação do gene *GAPDH* por meio da reação em cadeia da polimerase. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100 pb, está apresentado na coluna 1. Os resultados obtidos de indivíduos inseridos no estudo estão apresentados nas colunas 2 a 7. O controle negativo está apresentado na coluna 8.

Não observamos a expressão do gene *EGFR* nas amostras dos 130 pacientes com CCECP analisadas. A **Figura 2** apresenta a expressão do *EGFR* e do *GAPDH* de 13 amostras de pacientes com CCECP.

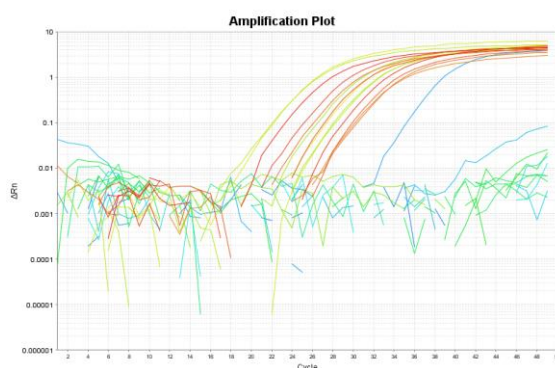


Figura 2. Gráfico de expressão gênica de 13 amostras. Considerando o gene endógeno *GAPDH*, houve expressão gênica em todas as amostras, representadas pelas curvas em vermelho e amarelo. As curvas ficaram próximas da curva de expressão da linhagem celular de carcinoma de células escamosas de hipofaringe (FADU) utilizada como controle positivo, demonstrando que o gene endógeno foi bem expresso nas amostras. O gene de interesse *EGFR* representado pelas curvas em azul e verde não apresentou expressão significativa e desse modo não houve comparação direta com a expressão do endógeno. Em comparação, a amostra de cDNA de FADU expressou o *EGFR* na curva em azul em contraponto com as outras curvas. Não houve contaminação dos controles negativos das amostras.

CONCLUSÕES

Não observamos expressão do gene *EGFR* nas amostras de sangue periférico dos pacientes com CCECP. Embora a literatura mostre resultados sobre a avaliação da expressão do *EGFR* em RNA total do sangue periférico, acreditamos ser necessário realizar novos estudos utilizando amostras de DNA de exossomos desses pacientes.

BIBLIOGRAFIA

1. Patel B, Saba NF. Current aspects and future considerations of EGFR inhibition in locally advanced and recurrent metastatic squamous cell Carcinoma of the head and neck. *Cancers (Basel)*, 13(14):3545, 2021.
2. Rajaram P, et al. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. *Indian J Dent Res*, 28(6):687-694, 2017.
3. Harari PM, Huang SM. Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49(2):427-433, 2001.
4. Psyrri A, Seiwert TY, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer: EGFR, PI3K, and more. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 246-255, 2013.
5. Lousada-Fernandez F, et al. Liquid Biopsy in Oral Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(6):1704, 2018.
6. Tosevska A, et al. Cell-Free RNA as a Novel Biomarker for Response to Therapy in Head & Neck Cancer. *Front Oncol*, 12:869108, 2022.
7. Thierry AR, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*, 35(3):347-376, 2016.
8. Kong L, Birkeland AC. Liquid Biopsies in Head and Neck Cancer: Current State and Future Challenges. *Cancers (Basel)*, 13(8):1874, 2021.
9. Hristozova T, et al. The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN). *Ann Oncol*, 22(8):1878-1885, 2011.
10. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17(6):1471-1474, 2010.
11. Mendenhall WM, et al. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 9 ed, 2011.