



# Epigenetički biljezi u tumorima glave i vrata: posebni osvrt na tumore orofarinksa povezane s HPV-om

## Epigenetic markers in head and neck cancer: special view on HPV-associated oropharyngeal cancer

Nina Milutin Gašperov<sup>1</sup>, Ivan Sabol<sup>1</sup> , Vjekoslav Tomaić<sup>1</sup>, Magdalena Grce<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

### Deskriptori

KARCINOM PLOČASTIH STANICA GLAVE I VRATA – genetika, liječenje, virologija; TUMORI OROFARINKSA – genetika, liječenje, virologija; TUMORSKI BIOMARKERI – genetika; KARCINOGENEZA – genetika; MikroRNK – genetika; METILACIJA DNK; EPIGENETSKI MEHANIZMI; TUMOR SUPRESORSKI GENI; VIRUSNI ONKOPROTEINI – genetika; PAPILOMAVIRUSNE INFEKCIJE – genetika, virologija; HUMANI PAPILOMAVIRUS 16

### Descriptors

SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF HEAD AND NECK – genetics, therapy, virology; OROPHARYNGEAL NEOPLASMS – genetics, therapy, virology; BIOMARKERS, TUMOR – genetics; CARCINOGENESIS – genetics; MicroRNAs – genetics; DNA METHYLATION; EPIGENESIS, GENETIC; GENES, TUMOR SUPPRESSOR; ONCOGENE PROTEINS, VIRAL – genetics; PAPILOMAVIRUS INFECTIONS – genetics, virology; HUMAN PAPILOMAVIRUS 16

Godinama su se naponi u istraživanju raka usredotočili na genetičke osnove razvoja i napredovanja tumora, identificirajući mutacije i karakterizirajući puteve koji aktiviraju onkogene i inaktiviraju gene supresore tumora.<sup>1</sup> U zadnje vrijeme istraživanja su usmjerena na epigenetičke promjene kao kritične promjene uključene u iniciranje i napredovanje karcinoma. Epigenetika se odnosi na stabilne i nasljedne promjene u ekspresiji gena bez promjena u slijedu DNA.<sup>2</sup> Epigenetičke promjene su temeljni mehanizmi za karcinogenezu i mogu poslužiti kao moguće metode za rano otkrivanje, liječenje i prognostičku procjenu za pacijente s rakom.<sup>3</sup> Epigenetičke modifikacije uključuju metiliranje DNA, kovalentne modifikacije histona, preoblikovanje kromatina, učinak nekodirajuće RNA (mikroRNA) te utjecaj grupe proteina *Polycomb* u ekspresiji gena.<sup>4,5</sup> Epigenetičke promjene događaju se neustavno ili kao dio regulacije mehanizama transkripcije, promičući selektivnu prednost tumora utišavanjem gena za supresiju tumora ili disfunkcijom u genima za popravak DNA. Epigenetičke modifikacije također doprinose staničnoj plastičnosti tijekom progresije tumora i stvaranju stanica koje iniciraju tumor

**SAŽETAK.** Unatoč kontinuiranim naporima da se identificiraju molekularni biljezi za rano otkrivanje tumora glave i vrata (engl. HNC, *head and neck cancer*) te poboljšanoj terapiji, ukupno preživljenje i prognoza bolesnika s HNC-om i dalje su loši. Znanstveni dokazi sugeriraju da tumori povezani s HPV-om imaju bolju prognozu i preživljenje. Nadalje, epigenetičke promjene su općenito često uključene u karcinogenezu, napredovanje tumora glave i vrata te rezistenciju na terapiju. Stoga razumijevanje i karakterizacija epigenetičkih modifikacija povezanih s karcinogenezom tumora glave i vrata obećavaju identifikaciju epigenetičkih biljega za rano otkrivanje raka i poboljšanje terapijskih pristupa u borbi protiv raka. U ovom preglednom radu dan je osvrt na trenutno znanje o epigenetičkim modifikacijama, odnosno metiliranju DNA i mikroRNA uočenim kod HNC-a, posebno kod tumora orofarinksa pozitivnih na HPV.

**SUMMARY.** Despite continuous efforts to identify molecular markers for the early detection of head and neck cancer (HNC), and improved therapy, the overall survival and prognosis of HNC patients still remain poor. Scientific evidences suggest that HPV-associated HNC had better prognosis and survival. Furthermore, epigenetic alterations are generally frequently involved in carcinogenesis, tumor progression and resistance to therapy. Thus, understanding and characterization of epigenetic modifications associated with head and neck carcinogenesis promise the identification of epigenetic markers for the early detection of cancer and improvement of therapeutic approaches to fight cancer. In this review, the focus is on the current knowledge on epigenetic modifications regarding DNA methylation and microRNAs observed in HNC, particularly in HPV-positive oropharyngeal cancer.

ili matičnih stanica raka.<sup>6</sup> U ovom radu dan je osvrt na trenutno znanje o epigenetičkim modifikacijama uočenim kod tumora glave i vrata, posebno tumora povezanih s HPV-om, poglavito orofarinksa u kontekstu metiliranja DNA i ekspresije mikroRNA.

### Tumori glave i vrata

Tumori glave i vrata (engl. HNC, *head and neck cancer*) obuhvaćaju tumore usta, nosa, grla, grkljana, ždrijela, sinusa ili žlijezda slinovnica te se u većini slučajeva odnose na tumore pločastih epitelnih stanica (engl. SCC, *squamous cell carcinoma*) sluznice dišnog trakta i oralne šupljine. Tumori glave i vrata su sedmi po učestalosti među tumorima i deveti po redu uzroka smrti kod ljudi diljem svijeta. Godišnje se procjenjuje oko 780.000 slučajeva te 350.000 slučajeva smrti od tumora

#### Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Ivan Sabol, dr. med. <https://orcid.org/0000-0002-5753-8528>  
i dr. sc. Magdalena Grce, dr. med. <https://orcid.org/0000-0001-6178-8418>  
Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb,  
e-pošta: [isabol@irb.hr](mailto:isabol@irb.hr); [grce@irb.hr](mailto:grce@irb.hr)

Primljeno 26. ožujka 2021., prihvaćeno 25. listopada 2021.

TABLICA 1. KLINIČKE I BIOLOŠKE RAZLIKE HPV-NEGATIVNIH I HPV-POZITIVNIH TUMORA GLAVE I VRATA.

TABLE 1. CLINICAL AND BIOLOGICAL DIFFERENCES BETWEEN OF HPV-NEGATIVE AND HPV-POSITIVE HEAD AND NECK TUMORS

Svojsvo tumora glave i vrata / Characteristics of head and neck tumor	HPV-pozitivni tumor / HPV-positive tumor	HPV-negativni tumor / HPV-negative tumor
Prevalencija* / Prevalence*	20%	80%
Incidencija** / Incidence**	u porastu / increasing	u padu / decreasing
Etiologija / Etiology	oralni seks / oral sex	pušenje i pretjerana konzumacija alkohola / smoking and excessive alcohol consumption
Dob / Gender	< 60 godina / years	> 60 godina / years
Premaligne promjene / Premalignant changes	nepoznate / unknown	opisane / described
Mutacije gena TP53 / TP53 gene mutation	rijetke / rare	učestale / frequent
Predispozicija sijela / Predisposition	orofarinks / oropharynx	nema / none
Prognoza / Prognosis	povoljna / favorable	loša / bad

\*informativna prevalencija/informative prevalence; \*\*u razvijenim zemljama/in developed countries

glave i vrata, a petogodišnje preživljenje oboljelih je oko 40–50%.<sup>7</sup>

Čimbenici rizika razvoja tumora glave i vrata jesu izloženost karcinogenima, osobito pušenju duhana i konzumaciji alkohola, infekcija visokorizičnim tipovima HPV-a, poglavito HPV-16 te genetska predispozicija. Tumori glave i vrata su heterogeni, no često se dijele na dvije skupine: HPV-pozitivni (s boljom prognozom) i HPV-negativni tumori (s lošijom prognozom) (tablica 1); novija istraživanja ukazuju na dodatnu genetsku subklasifikaciju HPV-negativnih tumora, od kojih neki također imaju bolju prognozu.<sup>8</sup> Nadalje, zna se da je HPV najčešći uzročnik karcinoma skvamoznih stanica orofarinksa.<sup>1</sup> Iako postoje sve čvršći dokazi da je HPV-pozitivni karcinom skvamoznih stanica glave i vrata povezan s boljim preživljenjem, za što se vjeruje da je zbog boljeg odgovora na kemoterapiju, specifični mehanizmi za ove poboljšane ishode i dalje su neistraženi.<sup>9</sup>

Gotovo svi tumori glave i vrata imaju promijenjenu ekspresiju gena uključenih u stanični ciklus.<sup>10</sup> Neograničeni replikativni potencijal stanica tumora glave i vrata temelji se na ukidanju signalnih puteva produkata tumor-supresorskih gena, poglavito p53 i retinoblastoma (pRB), što dovodi do ometanja regulacije staničnog ciklusa. Smatra se da je p53 najznačajniji tumor

supresor, koji suzbija rast tumora putem aktivacije transkripcije ciljnih gena koji reguliraju brojne biološke procese.<sup>11</sup> U HPV-negativnim tumorima glave i vrata p53 je mutiran te na taj način inaktiviran u gotovo 60–84% slučajeva i stoga se gubi kontrola nad nizom staničnih procesa, što dovodi do imortalizacije pogođenih stanica, a potom transformacije (pretkanceroze) i, u konačnici, invazije. Nadalje, u HPV-negativnim tumorima učestale se kromosomske promjene i mutacije gena, za razliku od HPV-pozitivnih tumora.<sup>1</sup>

Gotovo svaki HPV-pozitivni tumor glave i vrata, od kojih su najčešći tumori orofarinksa, sadrži HPV-16, čiji se genom vrlo često ugrađuje u genom domaćina, odnosno u oko 50% slučajeva karcinoma, dok kod ostalih tumora ostaje u episomalnoj formi. Uslijed integracije virus gubi sposobnost daljnje reprodukcije, a stoga i infektivnost; ujedno gubi virusne gene koji negativno reguliraju ekspresiju onkogeno E6 i E7 koji su na taj način pretjerano izraženi. Onkoproteini E6 i E7 igraju presudnu ulogu u kancerogenezi tumora glave i vrata. Naime, onkoprotein E6 uz pomoć ubikvitin-protein ligaze E6AP veže i razgrađuje p53 (12), dok E7 veže i razgrađuje pRb uz pomoć ubikvitin-Cullin-2 kompleksa.<sup>13</sup> Njihovo zajedničko djelovanje dovodi do pretjerane proliferacije stanica bez mogućnosti popravka oštećene DNA, imortalizacije stanica, genetske nestabilnosti, gubitka stanične polarosti te konačne transformacije stanice domaćina, odnosno invazivnog karcinoma.<sup>14</sup>

Tumori glave i vrata kao heterogena skupina tumora podrijetlom s različitih sijela mogu pokazivati različito ponašanje koje histopatologija primarnog tumora nije u mogućnosti predvidjeti, ali može biti uočeno drugim metodama poput genetičkog ili epigenetičkog profiliranja gena.<sup>15</sup>

### Metiliranje DNA

Metiliranje DNA je najčešća epigenetička i iznimno važna promjena uključena u razvoj tumora glave i vrata, poglavito orofarinksa. Naime, smatra se da je jedna od važnih komponenti rezistencije na lijekove u terapiji raka upravo ta epigenetička promjena.<sup>16</sup> Metiliranje DNA je promjena koja suprimira gensku ekspresiju, a koja nije uzrokovana promjenom u slijedu DNA, a prenosi se i na stanice kćeri. Metiliranje se događa dodavanjem metilne skupine (CH<sub>3</sub>) uglavnom ugljiku na položaju br. 5 dušične baze citozin (C) unutar CG dinukleotida u tzv. CpG otocima. Promijenjeno metiliranje ili hipermetiliranje u promotorskim regijama nekih tumor-supresorskih te drugih važnih gena dovodi do promjena u biološkim procesima poput proliferacije, apoptoze, stanične diferencijacije, adhezije te u regulaciji staničnog ciklusa.<sup>17</sup> Ovo se događa poglavito u stanicama karcinoma, u kojima je zabilježena sveukupna hipometiliranost genoma (slika 1), što dodatno izaziva genomsku nestabilnost i

vodi do transformacije stanica.<sup>18</sup> Metiliranje DNA je reverzibilan proces, što otvara nove mogućnosti pri upotrebi epigenetičkih terapijskih tehnika<sup>19</sup> te razvoja epigenetičkih lijekova, od kojih su neki već odobreni od agencija za lijekove (EMA, *European Commission and Medicines Agency*; FDA, *Food and Drug Administration*)<sup>20</sup>. Kako su epigenetičke promjene dinamične i reverzibilne, jasno je i da epigenetički enzimi također mogu predstavljati prikladne mete za razvoj učinkovitijih terapijskih strategija u liječenju tumora orofarinksa.<sup>21</sup>

### Metilacijski biomarkeri

Osim u karcinomima, promjena metiliranja DNA događa se i u drugim patološkim i nepatološkim stanjima te predstavlja dobar biomarker za različita stanja kao što su i tumori glave i vrata. Do sada su proučavani različiti geni čije promijenjeno metiliranje može ukazivati na tumore glave i vrata, poglavito tumore orofarinksa. Različiti autori ističu različite gene promijenjenog metiliranja kao moguće biomarkere tumora glave i vrata.<sup>17,22–27</sup>

Među prvima proučavanim bili su promotori gena za regulaciju staničnog ciklusa, p16INK4A i p14ARF, čija bi metiliranost ukazivala na razvoj tumora orofarinksa. Pokazalo se da je p16INK4A obećavajući mogući biomarker za predviđanje kliničkog ishoda ovih tumora, posebno za preživljavanje bez recidiva.<sup>28</sup> Nešto kasnija studija pronašla je učestalo metiliranje gena OCLN, CDKN2A, MGMT, MLH1 i DAPK1 u oralnim i orofaringealnim tumorima, s tim da su samo DAPK1 i MGMT imali prediktivnu vrijednost za nodalne metastaze.<sup>29</sup>

Ranije studije su među više kandidata za biomarkere tumora orofarinksa istaknule hipermetiliranje gena CDKN2A i CDH1, s tim da je metiliranost CDKN2A bila u korelaciji s boljom prognozom.<sup>30</sup> Zanimljivo, u nedavno objavljenoj studiji DNA-metiloma tumora glave i vrata Milutina Gašperova i suradnika, metodom *Infinium MethylationEPIC BeadChip*, među raznim potencijalnim biomarkerima upravo je hipermetilirani gen CDH1, uključen u staničnu adheziju, istaknut kao dobar biljeg za razlikovanje karcinoma od oralnih lezija te od zdrave oralne sluznice.<sup>31</sup>

Nadalje, Bai i sur. prepoznaju pet gena kao prognostičke biomarkere tumora glave i vrata, a ujedno i orofarinksa, značajno povezanih sa sveukupnim preživljavanjem, a to su PAX9, STK33, GPR150, INSM1 i EPHX3.<sup>32</sup> Guerrero-Preston i sur. također su našli značajno metiliranje promotora gena PAX, ali PAX1 i PAX5, u snažnoj korelaciji s inaktivacijom tumor-supresorskih gena p53 i NOTCH1, kao i metiliranje promotora dodatnih 10 tumor-supresorskih gena (GABRB3, HOXC12, PARP15, SLCO4C1, CDKN2A, PAX1, PIK3AP1, HOXC6, PLCB1, i ZIC4), inaktivira-

nih u tumorima metiliranjem promotora i/ili mutacijom.<sup>33</sup> Vezano uz preživljenje, Paluszczak i sur. pronalaze da je metiliranje gena WIF-1, negativnog regulatora Wnt-puta, u korelaciji s kraćim preživljenjem bolesnika s tumorima usne šupljine i orofarinksa te ga smatraju mogućim prognostičkim biomarkerom.<sup>34</sup>

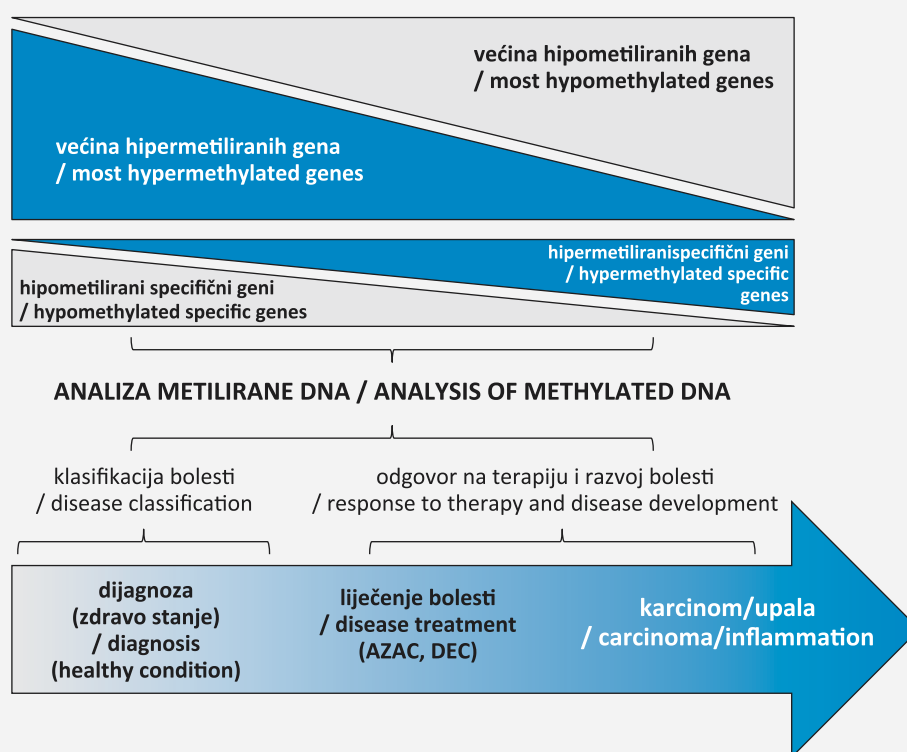
Misawa i sur. su proučavali neinvazivne biomarkere poput cirkulirajuće tumorske DNA (ctDNA) te su zaključili da ona može biti značajna u ranoj dijagnozi te poboljšati ishode bolesnika s tumorima glave i vrata.<sup>35</sup> Testovima s ctDNA pokazano je da metiliranje triju gena, CALML5, DNAC5G i LY6D, ima visoku prediktivnu sposobnost kao novi biomarker u razlikovanju plazme oboljelih od zdravih osoba.<sup>36</sup> Isti autori su proučavali odnos između statusa metilacije gena za neuropeptidne receptore, GHSR i NMUR1, i recidiva tumora glave i vrata, poglavito tumora orofarinksa, te ustanovili da značajno metiliranje promotora ovih gena korelira s lošijim preživljenjem u kirurški liječenih bolesnika.<sup>37</sup> Ista grupa autora je analizirajući gene GPCR (G protein-vezani receptori) otkrila da su značajno povezani recidivi i visoka metiliranost gena PTGDR1, PTGDR2 i PTGIR u uzorcima tumora orofarinksa povezanim s HPV-om.<sup>35</sup> Također, dokazano je da se HPV-infekcija u ovim tumorima mogla neovisno predvidjeti preko povećane metiliranosti gena iz superfamilije imunoglobulina, IGSF4.<sup>9</sup>

Nadalje, metiliranje regija mikroRNA (miR) također se proučavalo kao mogući biomarker raka. Tako su Minor i sur. pronašli da su metiliranost miR-9-1 i miR-9-3 osjetljivi i specifični biomarkeri za tumore usne šupljine i orofarinksa.<sup>38</sup>

Znanstvenici koji su istraživali korelaciju između hipermetiliranosti DNA i odgovora na zračenje našli su značajnu korelaciju između visokih razina metiliranja promotorske DNA i boljeg odgovora na liječenje, a koristeći 10 diferencijalno-metiliranih gena između onih koji su reagirali i onih koji nisu reagirali na zračenje. Dodatno su potvrdili 8 od 10 gena biomarkera: ROBO1, ULK4P3, MYOD1, LBX1, CACNA1A, IRX4, DPYSL3 i ELAVL2.<sup>39</sup>

Jedna od recentnijih studija Langdona i sur. proučavala je povezanost DNA metiliranja, prognostičkih čimbenika i preživljenja bolesnika s tumorima orofarinksa. Kod tih je bolesnika dokazana povećana metiliranost CpG mjesta unutar gena vezanih uz pušenje (SPEG, GFI1, i PPT2) i konzumaciju alkohola (KHDC3L); povezanost pušenja sa smanjenim preživljenjem dokazana je samo u slučaju gena SPEG.<sup>40</sup>

Svakako, količina studija te podataka o promijenjenom metiliranju gena u tumorima glave i vrata jest velika, a ovdje su navedeni samo najvažniji i najočitiji primjeri promijenjenih metilacijskih profila u tumorima orofarinksa. Uzimajući u obzir različitu metodologiju i opsege studija od najranijih pa do danas, čini se da se u najviše njih pojavljuje gen CDH1 (kaderin 1),



SLIKA 1. SHEMATSKI PRIKAZ STATUSA METILACIJE DNA U ZDRAVOM I BOLESNOM STANJU. U ZDRAVOM STANJU METILIRANJE JE ČESTO U VEĆINI PROMOTORA STANIČNIH GENA, ŠTO REZULTIRA ODSUTNOŠĆU EKSPRESIJE GENA. U KARCINOMU, UPALAMA I DRUGIM STANJIMA NEKI SE RELEVANTNI GENI METILIRAJU, ŠTO ZA POSLJEDICU IMA UTIŠANU FUNKCIJU. SUKLADNO TOMU, PROMIJENJENI METILACIJSKI PROFILI MOGU UKAZIVATI NA BOLESNO TKIVO, PRUŽAJUĆI VAŽNE INFORMACIJE PRIJE LIJEČENJA. EPIGENETIČKI LIJEKOWI, POPUT DEMETILACIJSKIH AGENSA, INHIBITORA DNA METILTRANSFERAZA (DNMT), NA PRIMJER AZACITIDIN (AZAC) I DECITABIN (DEC), MOGU SE KORISTITI ZA USPOSTAVLJANJE EKSPRESIJE ODREĐENIH GENA. HIPERMETILIRANI GENI PRIKAZANI SU U CRNOJ, A HIPOMETILIRANI U SIVOJ BOJI.

FIGURE 1. SCHEMATIC REPRESENTATION OF DNA METHYLATION STATUS IN HEALTHY AND ILL CONDITION. IN HEALTHY CONDITION, METHYLATION OCCURS OFTEN ON THE MOST OF CELLULAR GENE PROMOTERS, RESULTING IN THE ABSENCE OF GENE EXPRESSION. IN CANCER, INFLAMMATION AND OTHER CONDITIONS, SOME RELEVANT GENES BECOME METHYLATED AND AS SUCH, SUPPRESSED IN THEIR FUNCTION. ACCORDINGLY, ABERRANT DNA METHYLATION PROFILES CAN POINT TO THE DISEASED TISSUE, PROVIDING IMPORTANT INFORMATION PRIOR TO TREATMENT. EPIGENETIC DRUGS, SUCH AS DEMETHYLATING AGENTS (DNA METHYLTRANSFERASE (DNMT) INHIBITORS), FOR EXAMPLE AZACYTIDINE (AZAC) AND DECITABINE (DEC), MAY BE USED TO INDUCE EXPRESSION OF THE CERTAIN GENES. HYPERMETHYLATED GENES ARE PRESENTED IN BLACK, AND HYPOMETHYLATED IN GREY COLOUR.

odnosno njegovo promijenjeno metiliranje u uzorcima tumora naspram uzoraka normala. Naime, gubitak ekspresije ovoga gena pridonosi napredovanju raka povećavajući proliferaciju, invaziju i/ili metastaziranje.

### Metilacijski lijekovi

Kako je hipermetiliranje DNA reverzibilna promjena, micanje metilnih skupina, odnosno naknadno hipometiliranje vodi prema reaktivaciji genske transkripcije, odnosno očitovanju gena (slika 1). Stoga su takve epigenetičke promjene potencijalni mehanizam regulacije genske ekspresije na koji se može utjecati, a samim time i na bolest. Na tržištu već postoje demetilirajući lijekovi, analozi citozina, od kojih su trenutno u terapiji epigeničkog karcinoma najnapredniji 5-azacitozin (*azacitidine*, AZAC, 5-aza) i 2'-deoksi-5-azaci-

tidin (*decitabine*, DEC). Ti spojevi djeluju kao inhibitori DNA metiltransferaza, a pokazali su se vrlo učinkovitim u reaktivaciji epigenetički utišanih gena te u suzbijanju tumora *in vitro*.<sup>41</sup> Konkretno, demetiliranje ovim lijekovima koristilo se u terapiji raka debelog crijeva, demetilirajući promotor gena za popravak DNA, hMLH1, što je rezultiralo vraćanjem funkcije ovoga gena te senzibiliziranjem tumorskih stanica na druge lijekove, kao što su cisplatina, karboplatina ili 5-fluorouracil.<sup>16</sup> Nadalje, 5-aza je u studiji Brieger i sur. doveo do ponovnog uspostavljanja ekspresije gena HIC1, koji djeluje kao regulator rasta i represije tumora, što je dovelo do smanjene agresivnosti stanica tumora glave i vrata.<sup>42</sup>

Nedavne studije su pokazale da su HPV-pozitivni tumori glave i vrata, odnosno orofarinksa, posebno

TABLE 2. PREGLED LITERATURE: MOLEKULE miRNA POVEZANE S TUMORIMA OROFARINKSA PRONAĐENE U BAREM 2 STUDIJE  
 TABLE 2. LITERATURE REVIEW: miRNA MOLECULES ASSOCIATED WITH OROPHARYNGEAL TUMOURS FOUND IN AT LEAST 2 STUDIES

Autor/godina* / Author/year*	Tip tumora / Tumor type	Uzorci orofarinksa (ukupno tumora) / Oropharyngeal samples (total tumors)	Tip uzorka Type of sample	miRNA												Ostale Other	Izvor Source		
				21	142	205	155	106b	146a	9	145	150	25	93	125b			15b	29c
Hui 2010	TGV(OFL,HF)	24 (51)	FFPE	↑	↑	↑	↑	↑										10a, 16, 26a, 27a, 99a, 100, 130b, 143, 199b, 210, 7a/c	(60)
Summerer 2015	TGV(OFL,HF)	6 (18)	FFPE i plazma / FFPE and plazma	↑	↑													28, 574	(61)
Lajer 2011	TGV(OFO)	19 (49)	FFPE	↑	↑	↑	↑											27b, 27a, 31, 99a, 375	(62)
Vojtechova 2016	OF	23	smrznuti i FFPE / frozen and FFPE	↑														10a, 34a, 126, 335	(63)
Childs 2009	TGV(OFO,L,HF)	32 (104)	smrznuti / frozen	↑	↓														(64)
Bozinovic 2019	TGV(OFO)	10 (18)	smrznuti / frozen	↑				↑										29a, 100, 143	(53)
Jung 2012	TGV(OFO)	7 (17)	smrznuti / frozen	↑				↑										196a, 486	(65)
Hui 2013	OF	88	FFPE	↑												↑		130b, 7f, 7g	(66)
Ko 2014	TGV(OFO)	88 (167)	FFPE	↑															(67)
Zhang 2016	OF	43	smrznuti / frozen	↑														7c	(68)
Kalfert 2015	TGV(OFL,HF)	23 (51)	FFPE	↑														34a, 375	(69)
Ganci 2017	TGV(OFO,L,HF)	11 (132)	svježi / fresh	↑															(70)
Gao 2013	OF	150	FFPE		↓												↓	26b, 31, 193b	(71)
Wong 2016	TGV(OFO,L)	82 (523)	TCGA i FFPE		↓													26b, 193b, 455	(72)
Emmett 2021	TGV(OFO,L,HF)	52 (280)	FFPE		↑													16, 20b, 29a, 363	(73)
Martinez 2015	TGV(OFO)	6 (7)	serum		↑													26a, 26b, 27b, 28, 100, 107, 148a, 183, 486, 7a/f	(74)
Brito 2016	TGV(OFO)	12 (35)	FFPE		↑													183, 200b, 7a	(75)
Hess 2017	TGV(OFHf)	78 (149)	FFPE														↓		(76)

TABLICA 2. NASTAVAK  
TABLE 2. CONTINUED

Author/year* / Author/year*	Tip tumora / Tumor type	Uzorci orofarinksa (ukupno tumora) / Oropharyngeal samples (total tumors)	Tip uzorka Type of sample	miRNA												Ostale Other	Izvor Source		
Miller 2015	OF	53	FFPE	21	142	205	155	106b	146a	9	145	150	25	93	125b	15b	29c	20b, 107, 126, 143, 148a, 193b, 199b, 222, 335, 363, 574	(77)
Wan 2017	TGV(O,F,O,L,HF)	57 (101)	slina / saliva						↑									196a, 210, 222, 455	(78)
Ahmad 2019	TGV(O,F,L,HF)	20 (51)	FFPE													↑			(79)
Mayne 2020	OF	40	serum															27a, 574	(80)
Hess 2019	TGV(O,F,O,HF)	75 (162)	FFPE															210, 7g	(81)

\*Podebljanim slovima označene su studije koje su proučavale prognostičke biljege / Bold letters indicate studies that have investigated prognostic markers. TGV/HNT, tumori glave i vrata/head and neck tumors; OF, orofarinks/oropharynx; O, oralni/oral; L, larinks/larynx; HF, hipofarinks/hypopharynx; FFPE, formalinom fiksirano tkivo/Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; ↑, povišenje/increase; ↓, smanjenje/decrease.

osjetljivi na 5-aza, djelomično zbog smanjenja ekspresije gena HPV-a, a djelomično zbog obnavljanja tumor-supresora p53 i pRB. Pokazano je da 5-aza djeluje na HPV-pozitivne tumore glave i vrata tako da inducira replikaciju i dvostruke lomove DNA vezane uz transkripciju, što se događa prvenstveno kod demetilirane DNA.<sup>43</sup> Također, pokazano je da terapija ovih tumora s 5-aza može biti učinkovita kao alternativna ili kao nadopuna standardnih citotoksičnih terapija.<sup>44</sup> Međutim, u slučajevima HPV-pozitivnih tumora potreban je dodatni oprez kod upotrebe demetilirajućih lijekova, budući da može doći do aktivacije virusa mičanjem metilnih skupina s određenih mjesta u inaktiviranom virusnom genomu.<sup>45</sup>

### Nekodirajuća mikroRNA

Od njihova otkrića ranih 90-ih godina prošlog stoljeća,<sup>46</sup> molekule mikroRNA (miRNA) bile su perspektivni kandidati za biljege različitih tumora, pa tako i za tumore glave i vrata.<sup>47,48</sup> Molekule miRNA su male nekodirajuće molekule RNA, svega 18–24 nukleotida duljine, koje se vežu na ciljane mRNA molekule i utječu na njihovu stabilnost te posljedično ekspresiju ciljnih gena.<sup>49</sup> Trenutno je u najvećoj bazi molekula miRNA (miRBase v22) opisano više od 38.589 različitih molekula miRNA iz 271 organizma, dok ih je za čovjeka opisano 2.654.<sup>50</sup> Poznato je kako su miRNA molekule uključene u brojne fiziološke procese, uključujući proliferaciju, rast i razvoj organizama, metabolizam, apoptozu te su promijenjene u brojnim bolestima i promjenama.<sup>51</sup> Nažalost, dugogodišnji optimizam i potraga za idealnim miRNA-bilježima još uvijek nije urodila čvrstim rezultatima<sup>52,53</sup> niti u jednom od proučavanih tipova tumora glave i vrata. Mogući čimbenici koji su utjecali na slabu podudarnost dosadašnjih rezultata sigurno su bile razlike u metodama izolacije i detekcije molekula miRNA, prisustvo izomiR-a (subvarijante iste molekule miRNA),<sup>54</sup> te u konačnici velika heterogenost tumora glave i vrata koji imaju svoje specifične profile.<sup>55</sup> Osim toga, heterogenosti doprinose i različiti tipovi analiziranih materijala (svježe tkivo, parafinski preparati [engl. FFPE, *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*], serum, slina). Budući da su molekule miRNA male, moguće ih je retrospektivno evaluirati i u parafinskim rezovima, što svakako olakšava pristup uzorcima. No, neki rezultati upućuju na to da, iako je tehnički izvedivo, postoji razmjerno malo slaganje u rezultatima dobivenim na različitom tipu tkiva te se tako samo 30–40% diferencijalno izraženih miRNA preklapa između svježih i parafinskih uzoraka istih pacijenata.<sup>56</sup>

Velika većina studija miRNA bila je fokusirana ili općenito na tumore glave i vrata u cjelini ili samo na pojedine subtipove, pa je relativno teško pronaći literaturu specifičnu za tumore orofarinksa,<sup>57</sup> iako je dosta

pažnje posvećeno HPV-pozitivnim tumorima.<sup>58</sup> Primjer podzastupljenosti područja orofarinksa svakako je nedavno objavljena sveobuhvatna metaanaliza prognostičkog značaja miRNA u tumorima glave i vrata koja je identificirala 116 radova, od kojih se 62 pretežno odnosilo na tumore usne šupljine, 19 na grkljan (larinks), 19 na nazofarinks, 2 na hipofarinks te 14 radova na miješanim lokacijama uključujući i orofarinks.<sup>59</sup>

U tablici 2 sažeti su trenutno dostupni rezultati s fokusom na područje orofarinksa. Pronađeno je trideset studija u kojima je bio barem dio uzoraka iz područja orofarinksa, dok je svega šest od njih bilo fokusirano isključivo na područje orofarinksa. Kako bi se smanjila kompleksnost, prikazane su samo miRNA koje su pronađene u barem dvjema od pronađenih studija, a u obzir su uzete samo studije s barem pet tumora orofarinksa. Kako je i prethodno spomenuto, uočeno je relativno slabo slaganje i preklapanje molekula miRNA impliciranih u razvoju tumora orofarinksa. Tako između 23 studije njih većina (12 studija) ukazuje na povišenje razine miR-21, dok su sljedeće najčešće implicirane bile miR-142 i miR-205 (u 5 studija). No, treba naglasiti da niti jedna od tih najčešćih miRNA nema u potpunosti konzistentne rezultate u pogledu smjera deregulacije u tumorima, osim miR-21.

Ekspresija miRNA 21 je učestalo poremećena u tumorima glave i vrata, ali i u drugim tipovima tumora. Uloga miR-21 nedavno je sažeta u preglednom radu Feng i Tsao.<sup>82</sup> Ukratko, ciljni geni miR-21 uključeni su u procese proliferacije i apoptoze, a bitna je i za regulaciju T-stanične imunosti. Povišena razina miR-21 značajka je razvoja mnogih solidnih tumora, kao što su gliom, rak dojke, rak debelog crijeva, rak nemalih stanica pluća te hematološki tumori. Posebno je zanimljiv prognostički značaj ove miRNA u tumorima općenito, ali i posebno u tumorima glave i vrata, što je dodatno potvrđeno nedavnom metaanalizom.<sup>83</sup>

MikroRNA 142 također je uključena u brojne važne procese poput staničnog rasta, diferencijacije, apoptoze, pa sve do embrionalnog razvoja i imunološkog odgovora.<sup>84</sup> Povezana je s raznim tumorima uključujući rak pluća, dojke, debelog crijeva, prostate, jajnika i vrata maternice, no, ovisno o kontekstu tumora, ili je utišana ili prekomjerno izražena.<sup>85</sup> Kao i za miR-21, postoje podatci o prediktivnoj vrijednosti ove miRNA u nekim tumorima. Za tumore glave i vrata ne postoje dokazi na razini metaanalize, no, postoje pojedinačne studije za neke subtipove tumora glave i vrata, gdje se ova miRNA pokazala kao potencijalni biljeg ishoda bolesti.<sup>86,87</sup>

Srednje učestale miRNA (miR-9, miR-106b, miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-205; tablica 2) zastupljene u manjem broju studija također su dovoljno učestalo proučavane da svaka ima barem jedan za-

seban pregledni rad posvećen toj miRNA u kontekstu raka.<sup>88–94</sup> Redovito, svaka od navedenih može djelovati ili kao onkogen ili kao tumor-supresor, ovisno o kontekstu pojedinih tumora. Stoga nije neobično što i radovi u kontekstu tumora orofarinksa ponekad pokazuju povećanje, a ponekad smanjenje ovih molekula miRNA. S druge strane, miR-9 i miR-106b pokazale su veliku konzistentnost rezultata iako u samo po četiri od 23 studije svaka. Zanimljivo je i podsjetiti kako je metiliranje genomskih regija miR-9 gore već bilo opisano kao relevantno za nastanak tumora orofarinksa.<sup>38</sup>

Unatoč velikoj heterogenosti materijala i metoda te analiziranim tipovima tumora glave i vrata, moguće je pronaći određeno preklapanje u rezultatima analiza molekula miRNA. Redovito su učestalo opažene miRNA bile interesantni biljezi i u drugim tipovima tumora, a za gotovo sve molekule miRNA moguće je pronaći i radove koji evaluiraju prognostički učinak. Ipak, u toj količini podataka, pa čak i ukoliko se analiza ograniči samo na tumore orofarinksa, teško je odrediti najbitnije miRNA molekule s uvjerljivo konzistentnim rezultatima. Najbliže tomu je svakako miRNA-21.

### Zaključak

Tumori glave i vrata su sami po sebi vrlo kompleksna i heterogena skupina, a kada se uvede analiza genetičke i/ili epigenetičke komponente u nastanku ovih tumora, još se dodatno produbi problematika. Analiza epigenetičke komponente, najčešće metiliranja DNA i regulacije pomoću miRNA, zapravo je analiza fine regulacije ekspresije gena. Kako je i prikazano, ovo je područje u posljednje vrijeme veliko polje interesa znanstvenika, a rezultati istraživanja su vrlo različiti i sveobuhvatni. Budući da je to ujedno i polje identifikacije novih, potencijalnih biomarkera ovih bolesti te njihovih predstadija, potrebno je vrlo detaljno i sustavno pristupiti ovom problemu te iz velikog skupa podataka odabrati najbolje potencijalne epigenetičke biljege, genske biomarkere s promijenjenim metiliranjem i/ili najvažnije miRNA, koje značajno mijenjaju ekspresiju gena u bolesnom stanju. U ovom radu nastojali smo istaknuti najvažnije epigenetičke biljege u tumorima glave i vrata povezanim s HPV-om, poglavito tumorima orofarinksa.

### Kratice

HPV, papilomavirus čovjeka (od engl. *human papillomavirus*); HNC (od engl. *head and neck cancer*); SCC (od engl. *squamous cell carcinoma*); E6/E7, rani protein 6/7 (od engl. *early protein 6/7*); E6AP, E6-povezani protein (od engl. *E6-associated protein*); FFPE, formalinom fiksirano tkivo (od engl. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*); FDA (od engl. *Food and Drug Administration*); DNMT (od engl. *DNA methyltransferase*); AZAC (od engl. *azacitidine*); DEC (od engl. *de-*

*citabine*); TGV, tumori glave i vrata; OF, orofarinks; O, oralni; L, larinks; HF, hipofarinks.

### Simboli

↑ – povišenje; ↓ – smanjenje.

### Zahvala

Za financijsku potporu istraživačkih projekata autori zahvaljuju Hrvatskoj zakladi za znanost (projekt IP-2016-06-2246, voditelj VT; projekt IP-2013-11-4758, voditelj MG) te Međunarodnom centru za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (ICGEB – *Early Career Return Grant*, projekt br. CRP/16/018, voditelj VT).

## LITERATURA

- Grce M, Sabol I, Milutin-Gašperov N. Genetika i epigenetika tumora glave i vrata. U: Prgomet D, ur. Tumori glave i vrata. Zagreb: Medicinska naklada; 2019; str. 8–20.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012;13:679–92.
- Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome. *Epi-genetics.* 2011;6:804–19.
- Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017; 18:1506.
- Fardi M, Solali S, Farshdousti Hagh M. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes Dis.* 2018;5:304–11.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105–11.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M i sur. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359–86.
- Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11: 9–22.
- Chen KM, Stephen JK, Havard S, Mahan M, Divine G, Worsam MJ. IGSF4 Methylation as an Independent Marker of Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Neck Surg.* 2015;141: 257–63.
- TCGA. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517:576–82.
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14: 359–70.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63:1129–36.
- Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J i sur. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007;81(18):9737–47.
- Grce M, Sabol I, Milutin Gašperov N. The transforming properties of human papillomavirus oncoproteins. *Period Biol.* 2012;114:479–87.
- Lleras RA, Smith RV, Adrien LR, Schlecht NF, Burk RD, Harris TM i sur. Unique DNA methylation loci distinguish anatomic site and HPV status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5444–55.
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull.* 2017;7:339–48.
- Arantes LMRB, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014;50:587–92.
- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983;301:89–92.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27–56.
- Fardi M, Solali S, Farshdousti Hagh M. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes Dis.* 2018;5:304–11.
- Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Rampazzo E, Giunco S, Del Mistro A, Menegaldo A i sur. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(3): 457–74.
- Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Owczarek AJ. Aberrant DNA methylation of the p16, APC, MGMT, TIMP3 and CDH1 gene promoters in tumours and the surgical margins of patients with oral cavity cancer. *J Cancer.* 2018;9:1896–904.
- Wen G, Wang H, Zhong Z. Associations of RASSF1A, RARβ, and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97:e9971.
- Liu G. CDH1 promoter methylation in patients with cervical carcinoma: a systematic meta-analysis with trial sequential analysis. *Future Oncol.* 2017;14:51–63.
- Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Monti V, Del Corso G i sur. DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(8): 1494–500.
- Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, Karagas MR, Wrensch MR, Yeh RF i sur. Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2009;30 (3):416–22.
- Demokan S, Chang X, Chuang A, Mydlarz WK, Kaur J, Huang P i sur. KIF1A and EDNRB are differentially methylated in primary HNSCC and salivary rinses. *Int J Cancer.* 2010;127 (10):2351–9.
- Al-Kaabi A, van Bockel LW, Pothén AJ, Willems SM. p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Dis Markers.* 2014;2014:260549.
- Melchers LJ, Clausen MJ, Mastik MF, Slagter-Menkema L, van der Wal JE, Wisman GB i sur. Identification of methylation markers for the prediction of nodal metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Epigenetics.* 2015; 10(9):850–60.
- Mielcarek-Kuchta D, Paluszczak J, Seget M, Kiwerska K, Biczysko W, Szyfter K i sur. Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. *Tumour Biol.* 2014;35(8):7441–9.



31. Milutin Gašperov N, Sabol I, Božinović K, Dediol E, Mravak-Stipetić M, Licastro D *i sur.* DNA Methylome Distinguishes Head and Neck Cancer from Potentially Malignant Oral Lesions and Healthy Oral Mucosa. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6853.
32. Bai G, Song J, Yuan Y, Chen Z, Tian Y, Yin X *i sur.* Systematic analysis of differentially methylated expressed genes and site-specific methylation as potential prognostic markers in head and neck cancer. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):22687–702.
33. Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN *i sur.* Key tumor suppressor genes inactivated by “greater promoter” methylation and somatic mutations in head and neck cancer. *Epigenetics.* 2014;9(7):1031–46.
34. Paluszczak J, Sarbak J, Kostrzevska-Poczekaj M, Kiwerska K, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R *i sur.* The negative regulators of Wnt pathway-DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. *Tumour Biol.* 2015;36(4):2855–61.
35. Misawa K, Imai A, Kanazawa T, Mima M, Yamada S, Mochizuki D *i sur.* G Protein-Coupled Receptor Genes, PTGDR1, PTGDR2, and PTGIR, Are Candidate Epigenetic Biomarkers and Predictors for Treated Patients with HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Microorganisms.* 2020;8(10):1504.
36. Misawa K, Imai A, Matsui H, Kanai A, Misawa Y, Mochizuki D *i sur.* Identification of novel methylation markers in HPV-associated oropharyngeal cancer: genome-wide discovery, tissue verification and validation testing in ctDNA. *Oncogene.* 2020;39(24):4741–55.
37. Misawa K, Mima M, Satoshi Y, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D *i sur.* Neuropeptide receptor genes GHSR and NMUR1 are candidate epigenetic biomarkers and predictors for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):1007.
38. Minor J, Wang X, Zhang F, Song J, Jimeno A, Wang XJ *i sur.* Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2012;48(1):73–8.
39. Kurokawa T, Nakagawa T, Matsusaka K, Fukuyo M, Mima M, Misawa K *i sur.* Establishment of epigenetic markers to predict irradiation efficacy against oropharyngeal cancer. *Cancer Sci.* 2020;111(4):1407–16.
40. Langdon R, Richmond R, Elliott HR, Dudding T, Kazmi N, Penfold C *i sur.* Identifying epigenetic biomarkers of established prognostic factors and survival in a clinical cohort of individuals with oropharyngeal cancer. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):95.
41. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer.* 2008;123:8–13.
42. Brieger J, Pongsapich W, Mann SA, Hedrich J, Fruth K, Pogozelski B *i sur.* Demethylation treatment restores h1c1 expression and impairs aggressiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(9):678–83.
43. Hajek M, Biktasova A, Sewell A, Gary C, Cantalupo P, Anderson KS *i sur.* Global Genome Demethylation Causes Transcription-Associated DNA Double Strand Breaks in HPV-Associated Head and Neck Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2020;13(1):21.
44. Biktasova A, Hajek M, Sewell A, Gary C, Bellinger G, Deshpande HA *i sur.* Demethylation Therapy as a Targeted Treatment for Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(23):7276–87.
45. Milutin Gašperov N, Sabol I, Planinić P, Grubišić G, Fističić I, Čorušić A *i sur.* Methylated Host Cell Gene Promoters and Human Papillomavirus Type 16 and 18 Predicting Cervical Lesions and Cancer. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129452.
46. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843–54.
47. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene.* 2006;25:6188–96.
48. Tran N, O'Brien CJ, Clark J, Rose B. Potential role of microRNAs in head and neck tumorigenesis. *Head Neck.* 2010;32:1099–111.
49. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116:281–97.
50. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D155–62.
51. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem.* 2011;67:129–39.
52. Kaczkowski B. A Decade of Global mRNA and miRNA Profiling of HPV-Positive Cell Lines and Clinical Specimens. *Open Virol J.* 2012;6:216–31.
53. Božinović K, Sabol I, Dediol E, Milutin Gašperov N, Manojlović S, Vojtechova Z *i sur.* Genome-wide miRNA profiling reinforces the importance of miR-9 in human papillomavirus associated oral and oropharyngeal head and neck cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):2306.
54. Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S *i sur.* MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol.* 2011;12(12):R126.
55. Chamorro Petronacci CM, García García A, Padín Iruegas E, Rivas Mundiña B, Lorenzo Pouso AI, Pérez Sayáns M. Identification of Prognosis Associated microRNAs in HNSCC Subtypes Based on TCGA Dataset. *Med Kaunas Lith.* 2020;56:535.
56. Vojtechova Z, Zavadil J, Klozar J, Grega M, Tachezy R. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLOS ONE.* 2017;12:e0179645.
57. Ghafouri-Fard S, Gholipour M, Taheri M, Shirvani Farsani Z. MicroRNA profile in the squamous cell carcinoma: prognostic and diagnostic roles. *Heliyon.* 2020;6:e05436.
58. Emmett S, Whiteman DC, Panizza BJ, Antonsson A. An Update on Cellular MicroRNA Expression in Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology.* 2018;95:193–201.
59. Lubov J, Maschietto M, Ibrahim I, Mlynarek A, Hier M, Kowalski LP *i sur.* Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms. *Oncotarget.* 2017;8(33):55511–24.
60. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W *i sur.* Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1129–39.
61. Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P *i sur.* Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer.* 2015;113(1):76–82.
62. Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs E *i sur.* Different miRNA signatures of oral and pharyn-

- geal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*. 2011;104(5):830–40.
63. Vojtechova Z, Sabol I, Salakova M, Smahelova J, Zavadil J, Turek L i sur. Comparison of the miRNA profiles in HPV-positive and HPV-negative tonsillar tumors and a model system of human keratinocyte clones. *BMC Cancer*. 2016;16:382.
  64. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M i sur. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2009;174(3):736–45.
  65. Jung HM, Phillips BL, Patel RS, Cohen DM, Jakymiw A, Kong WW i sur. Keratinization-associated miR-7 and miR-21 regulate tumor suppressor reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) in oral cancer. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29261–72.
  66. Hui AB, Lin A, Xu W, Waldron L, Perez-Ordóñez B, Weinreb I i sur. Potentially prognostic miRNAs in HPV-associated oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2154–62.
  67. Ko YH, Won HS, Sun DS, An HJ, Jeon EK, Kim MS i sur. Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int*. 2014;64(10):499–507.
  68. Zhang X, Gee H, Rose B, Lee CS, Clark J, Elliott M i sur. Regulation of the tumour suppressor PDCD4 by miR-499 and miR-21 in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer*. 2016;16:86.
  69. Kalfert D, Pesta M, Kulda V, Topolcan O, Ryska A, Celakovský P i sur. MicroRNA profile in site-specific head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res*. 2015;35(4):2455–63.
  70. Ganci F, Sacconi A, Manciooco V, Sperduti I, Battaglia P, Covello R i sur. MicroRNA expression as predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016; 38 Suppl 1:E189–97.
  71. Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL i sur. A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013;119(1):72–80.
  72. Wong N, Khwaja SS, Baker CM, Gay HA, Thorstad WL, Daly MD i sur. Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Med*. 2016;5(7):1619–28.
  73. Emmett SE, Stark MS, Pandeya N, Panizza B, Whiteman DC, Antonsson A. MicroRNA expression is associated with human papillomavirus status and prognosis in mucosal head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2021;113:105136.
  74. Victoria Martinez B, Dhahbi JM, Nunez Lopez YO, Lamperska K, Golusinski P, Luczewski L i sur. Circulating small non-coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(22):19246–63.
  75. Brito BL, Lourenço SV, Damascena AS, Kowalski LP, Soares FA, Coutinho-Camillo CM. Expression of stem cell-regulating miRNAs in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(9):647–54.
  76. Hess J. Predictive Factors for Outcome and Quality of Life in HPV-Positive and HPV-Negative HNSCC. *Recent Results Cancer Res*. 2017;206:233–42.
  77. Miller DL, Davis JW, Taylor KH, Johnson J, Shi Z, Williams R i sur. Identification of a human papillomavirus-associated oncogenic miRNA panel in human oropharyngeal squamous cell carcinoma validated by bioinformatics analysis of the Cancer Genome Atlas. *Am J Pathol*. 2015;185(3):679–92.
  78. Wan Y, Vagenas D, Salazar C, Kenny L, Perry C, Calvopiña D i sur. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(59):99990-100001.
  79. Ahmad P, Sana J, Slavik M, Gurin D, Radova L, Gablo NA i sur. MicroRNA-15b-5p predicts locoregional relapse in head and neck carcinoma patients treated with intensity-modulated radiotherapy. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16(2):139–46.
  80. Mayne GC, Woods CM, Dharmawardana N, Wang T, Krishnan S, Hodge JC i sur. Cross validated serum small extracellular vesicle microRNAs for the detection of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 2020;18(1):280.
  81. Hess J, Unger K, Maihoefer C, Schüttrumpf L, Wintergerst L, Heider T i sur. A five-microRNA signature predicts survival and disease control of patients with head and neck cancer negative for HPV infection. *Clin Cancer Res*. 2019;25(5):1505–16.
  82. Feng Y-H, Tsao C-J. Emerging role of microRNA-21 in cancer (Review). *Biomed Rep*. 2016;5:395–402.
  83. Irimie-Aghiorghiesei AI, Pop-Bica C, Pintea S, Braicu C, Cojocneanu R, Zimța AA i sur. Prognostic Value of MiR-21: An Updated Meta-Analysis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *J Clin Med*. 2019;8(12):2041.
  84. Shrestha A, Mukhametshina RT, Taghizadeh S, Vásquez-Pacheco E, Cabrera-Fuentes H, Rizvanov A i sur. MicroRNA-142 is a multifaceted regulator in organogenesis, homeostasis, and disease. *Dev Dyn*. 2017;246(4):285–90.
  85. Pahlavan Y, Mohammadi Nasr M, Dalir Abdolahinia E, Pirdel Z, Razi Soofiyani S, Siahpoush S i sur. Prominent roles of microRNA-142 in cancer. *Pathol Res Pract*. 2020;216(11):153220.
  86. Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P i sur. Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 2015;113(1):76–82.
  87. Takeuchi T, Kawasaki H, Luce A, Cossu AM, Misso G, Scrima M i sur. Insight toward the MicroRNA Profiling of Laryngeal Cancers: Biological Role and Clinical Impact. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3693.
  88. Qin AY, Zhang XW, Liu L, Yu JB, Li H, Wang SZ i sur. MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *Eur J Cell Biol*. 2013;92(2):54–60.
  89. Gulei D, Raduly L, Broseghini E, Ferracin M, Berindan-Neagoie I. The extensive role of miR-155 in malignant and non-malignant diseases. *Mol Aspects Med*. 2019;70:33–56.
  90. Lerner C, Wemmert S, Bochen F, Kulas P, Linxweiler M, Hasenfus A i sur. Characterization of miR-146a and miR-155 in blood, tissue and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma patients and their impact on cell proliferation and migration. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(4):757–66.
  91. Khafaei M, Rezaie E, Mohammadi A, Shahnazi Gerdehsang P, Ghavidel S, Kadkhoda S i sur. miR-9: From function to therapeutic potential in cancer. *J Cell Physiol*. 2019 Jan 28.
  92. Kolenda T, Guglas K, Teresiak A, Bliźniak R, Lamperska K. Low let-7d and high miR-205 expression levels positively influence HNSCC patient outcome. *J Biomed Sci*. 2019;26:17.
  93. Yang C, Dou R, Yin T, Ding J. MiRNA-106b-5p in human cancers: diverse functions and promising biomarker. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2020;127:110211.
  94. Sawant D, Lilly B. MicroRNA-145 targets in cancer and the cardiovascular system: evidence for common signaling pathways. *Vasc Biol Bristol Engl*. 2020;2:R115–28.