UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MATEUS NÓBREGA AOKI

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
CÉLULAS PULMONARES E PANCREÁTICAS
TRANSFORMADAS PELO ONCOGENE KRAS**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG

08/05/2014

MATEUS NÓBREGA AOKI

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉLULAS
PULMONARES E PANCREÁTICAS
TRANSFORMADAS PELO ONCOGENE KRAS**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Aoki, Mateus Nóbrega
A638i Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células
pulmonares e pancreáticas transformada pelo oncogene KRAS / Mateus
Nóbrega Aoki. -- São Paulo, 2014.
157p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Biquímica.
Orientador: Bassères, Daniela Sanchez

1. Biologia molecular 2. Neoplasias pulmonares 3. Neoplasias
pancreáticas I. T. II. Bassères, Daniela Sanchez, orientador.

574.88 CDD

Mateus Nóbrega Aoki

Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pulmonares e pancreáticas transformadas pelo oncogene KRAS

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha esposa Tatiany Honório Porto Aoki, por todos momentos juntos. Por todo apoio, compreensão, carinho e estímulo para completar mais esse objetivo. Por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e também felizes. Sem você isso seria muito mais difícil!

A minha família: Minha mãe Jane, meu pai José, minha irmã Bárbara, meu cunhado Fernando, meu mascote Bob e minhas “sobrinhas” Lola e Duna. Por todas alegrias, companheirismo, estímulo e felicidade, que fizeram esse caminho se tornar mais fácil.

Aos meus companheiros de laboratório: Edmilson, Amanda e Aline, juntamente com Juliana Osaki, Alexasandro, Renan, Giselle, Felipe, Thompson, Karine e Viviane. Pelo ótimo convívio e relacionamento que tivemos durante todo esses anos, por todos ensinamentos e ajudas, discussões de protocolos e resultados. Um ótimo ambiente de laboratório facilita demais as coisas.

A minha orientadora Dra. Daniela Sanchez Bassères, primeramente por confiar em mim. Por todos ensinamentos e conhecimento repassado e por se mostrar uma excelente e verdadeira orientadora, aberta a discussão e trocas de ideias, buscando a melhor forma de trabalho.

A Dra. Artemis Hatzgeorgiou e todo seu grupo do Instituto Alexander Fleming, de Vari – Grécia, pelo auxílio na parte de bioinformática e metanálise realizada.

A todos do laboratório da professora Dra. Mari Cleide Sogayar, os quais me apoiaram amplamente em questão estrutural, material, científica mas também de amizade e companheirismo.

A todos funcionário, docentes e amigos do Instituto de Química e a toda pós graduação em Bioquímica, por me proporcionar um excelente ambiente, com todas condições de realizar um trabalho de qualidade.

A FAPESP pelo suporte financeiro à esta pesquisa durante todo seu curso e também a confiança no trabalho.

A CAPES e CNPq que também auxiliaram a realização e conclusão deste projeto.

A todos que de alguma forma ajudaram e fizeram com que essa caminhada fosse possível.

RESUMO

AOKI, M.N. **Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pulmonares e pancreáticas transformadas pelo oncogene KRAS**. 2014. 157p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As neoplasias induzidas pela forma oncogênica da KRAS são doenças muito comuns, para as quais não existem terapias efetivas. Uma inibição direta da KRAS falhou em ensaios clínicos e esforços intensos tem sido feitos para identificar alvos de KRAS importantes para a oncogênese. Uma via promissora regulada por KRAS, que tem sido pouco explorada é a via dos microRNAs (miRNAs). Nossa meta foi identificar miRNAs regulados pela KRAS em células pulmonares e pancreáticas, que possam contribuir para o fenótipo oncogênico. Para alcançar esta meta nós usamos duas abordagens: (1) Nós investigamos o miRNA 486-5p como um alvo de KRAS em câncer de pâncreas e de pulmão. A expressão deste miRNA havia sido correlacionada positivamente com a presença de mutações em KRAS em pacientes portadores de câncer de cólon; (2) Nós usamos uma plataforma de microarranjo para identificar miRNAs diferencialmente expressos entre células humanas primárias imortalizadas pulmonares ou pancreáticas e suas linhagens isogênicas transformadas por KRAS. Na primeira abordagem, conseguimos mostrar que a expressão do miRNA 486-5p está correlacionada ao *status* de KRAS em células primárias pulmonares, mas não em células primárias pancreáticas. Além disso, geramos células pulmonares tanto com ganho e perda de função de KRAS e demonstramos que KRAS regula a expressão do miRNA 486-5p. Também determinamos uma correlação negativa entre a expressão de KRAS e a expressão do alvo do miRNA 486-5p FoxO1, um supressor tumoral. Para avaliar como o miRNA 486-5p afeta as propriedades oncogênicas induzidas por KRAS, nós transfectamos oligonucleotídeos inibitórios para o miRNA 486-5p em células pulmonares positivas para mutações em KRAS. A inibição da expressão do miRNA 486-5p levou a uma redução da clonogenicidade e viabilidade celulares. Esta redução não está associada a um aumento de morte celular, mas a uma redução da proliferação celular. Interessantemente, a transfecção de oligonucleotídeos mímicos do miRNA 486-5p em células pulmonares negativas para mutações em KRAS ou em células com perda de função de KRAS por RNAi levou a um aumento da proliferação e clonogenicidade. Estes dados indicam que o miRNA 486-5p, não só é um alvo de KRAS em câncer de pulmão, mas também age como um oncomiR contribuindo para a proliferação celular induzida por KRAS. Na nossa segunda abordagem, nós identificamos 17 miRNAs com expressão aumentada e 3 com expressão diminuída em células primárias pancreáticas expressando KRAS oncogênica. Destes, 9 miRNAs foram também identificados por metanálise de dados de microarranjo publicados comparando amostras tumorais pancreáticas com amostras não tumorais. Apesar do experimento de microarranjo com as linhagens primárias pulmonares não ter produzido resultados estatisticamente significativos após a correção por FDR, uma tendência à expressão diferencial foi observada para vários miRNAs e nós validamos por qPCR a expressão diferencial dos miRNAs 720 e 139-3p. Em conclusão, nós conseguimos identificar miRNAs regulados pela KRAS tanto em células pulmonares, quanto pancreáticas. Um melhor entendimento das suas funções biológicas, bem como dos alvos por eles regulados nestes contextos, pode revelar novas vias para a exploração terapêutica.

Palavras-chave: KRAS; microRNA; microRNA486-5p; câncer de pulmão; câncer de pâncreas

ABSTRACT

AOKI, M.N. **Identification of microRNAs regulated by oncogenic KRAS in lung and pancreatic Cancer**. 2014. 157p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KRAS-induced lung cancer is a very common disease, for which there are currently no effective therapies. Direct targeting of KRAS has failed in clinical trials and intense efforts are underway to identify KRAS targets that play a crucial role in oncogenesis. One promising KRAS-regulated pathway that has so far been overlooked is the microRNA (miRNA) pathway. Our goal was to identify miRNAs regulated by oncogenic KRAS in lung and pancreatic cells that could contribute to the oncogenic phenotype. In order to achieve this goal we used two different approaches: (1) We investigated miRNA 486-5p as a KRAS target in lung and pancreatic cancer. The expression of this miRNA had been correlated to the presence of KRAS mutations in colon cancer patients; (2) we used a microarray platform to identify differentially expressed miRNAs between immortalized human primary pulmonary or pancreatic epithelial cell lines and their isogenic K-Ras-transformed counterparts. In our first approach, we were able to show that mi486-5p expression correlates with KRAS status in lung primary cells, but not in pancreatic primary cells. Furthermore, we generated lung cancer cells with either gain-of-function or loss-of-function of KRAS and demonstrated that KRAS regulates miRNA 486-5p in these cells. We also found, in all lung cell models analyzed, a negative correlation between expression of KRAS and expression of miR-486-5p target FoxO1, a tumor suppressor. In order to evaluate how miR-486-5p affects KRAS-induced oncogenic properties, we transfected miR-486-5p inhibitor oligonucleotides into KRAS-positive lung cancer cell lines. Inhibition of miR-486-5p expression leads to reduced clonogenic growth and viability. This reduction is not associated with increased cell death, but with decreased cell proliferation. Interestingly, transfection of miR-486-5p double-stranded RNA mimic oligonucleotides into KRAS negative lung cancer cell lines or into cells with loss-of-function of KRAS by RNAi leads to enhanced proliferation and clonogenicity. These results indicate, not only that miR-486-5p is a KRAS target in lung cancer, but also that miR-486-5p acts as an oncomiR contributing to KRAS-induced cell proliferation. In our second approach, we identified 17 upregulated microRNAs and 3 downregulated microRNAs in the primary pancreatic cell line expressing KRAS. Of these, 9 miRNAs were also identified by a metanalysis of published microarray datasets comparing pancreatic cancer patient samples to non-cancerous pancreatic tissues. Even though our array experiment in the primary pulmonary cells did not produce statistically significant results after FDR correction, differential expression trends were seen for many miRNAs and we validated miRNAs 720 and 139-3p as differentially expressed. In conclusion we were able to identify miRNAs regulated by KRAS both in lung and pancreatic cancer cells. Further understanding of their biological function, as well as the targets they regulate in these settings, could uncover novel pathways for therapy design.

Keywords: KRAS; microRNA; microRNA486-5p; lung cancer, pancreatic cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de atividade de Ras	18
Figura 2: Estratégias de terapia anti-tumoral baseada em KRAS	21
Figura 3: Biogênese canônica de microRNAs	25
Figura 4: Os microRNAs podem estar desregulados e participar no processo de transformação maligna.....	28
Figura 5: Representação do mecanismo de transcrição específica de microRNA por <i>stem-loop</i> RT primer.....	38
Figura 6:Fórmulas utilizadas para calcular a eficiência dos <i>primers</i> para reação de qRT-PCR.....	40
Figura 7: Representação do esquema de qRT-PCR para microRNAs após a reação de síntese de cDNA específica por <i>stem loop</i> RT primer.	41
Figura 8:Vetor de inibição pTripz da <i>Open Biosystems</i> ®	48
Figura 9: Resultado de qRT-PCR para PTEN	56
Figura 10: Determinação de concentração efetiva de puromicina em células A549	59
Figura 11: Cinética de concentração e temporal de doxíciclina em células A549	60
Figura 12:Avaliação da eficiência de inibição da expressão de KRAS nos clones oriundos das linhagens A549 e H358.....	61
Figura 13:Avaliação da eficiência de indução da expressão de KRAS em H1703-G12V	62
Figura 14: Expressão de microRNA486-5p nas linhagens primárias de pulmão e pâncreas.....	63
Figura 15:Expressão de alvos do microRNA 486-5p em linhagens primárias de pulmão e pâncreas ...	65
Figura 16: A inibição da expressão da KRAS por siRNA leva a uma redução na expressão do microRNA 486-5p.....	66
Figura 17: A inibição da expressão da KRAS por doxíciclina leva a uma redução na expressão do microRNA 486-5p.....	67
Figura 18: A inibição da expressão de KRAS induz um aumento da expressão de FoxO1	68
Figura 19: A indução da expressão da KRAS por doxíciclina na linhagem H1703 leva a aumento na expressão do microRNA 486-5p.	69
Figura 20: A indução da expressão de KRAS reduz a expressão de FoxO1	70
Figura 21: A inibição da expressão de KRAS reduz a viabilidade celular.....	72
Figura 22: A inibição da expressão de KRAS reduz a clonogenicidade celular	73

Figura 23: A indução da expressão de KRAS promove o crescimento celular	74
Figura 24: A indução da expressão de KRAS promove a clonogenicidade celular	74
Figura 25: A inibição da expressão do microRNA 486-5p resulta em uma diminuição das propriedades oncogênicas de células pulmonares portadoras do oncogene KRAS	77
Figura 26: A inibição da expressão do microRNA 486-5p resulta em uma diminuição das propriedades oncogênicas de células pulmonares H1703 expressando a KRAS oncogênica de forma induzível	78
Figura 27: Análise da expressão do microRNA 486-5p após a transfecção com oligo mimic.....	80
Figura 28: A indução da expressão do microRNA 486-5p resulta em um aumento da viabilidade celular em células com expressão baixa de KRAS	81
Figura 29: A indução da expressão do microRNA 486-5p resulta em um aumento da clonogenicidade celular em células H358 com expressão baixa de KRAS	82
Figura 30: A indução da expressão do microRNA 486-5p resulta em um aumento da viabilidade celular em células H1703 na ausência de expressão da forma oncogênica da KRAS	83
Figura 31: A indução da expressão do microRNA 486-5p resulta em um aumento da clonogenicidade celular em células H1703 na ausência de expressão de KRAS oncogênica	84
Figura 32: A inibição do microRNA 486-5p não apresentou diferença na expressão de caspase3 total e clivada em células H358 portadoras de KRAS oncogênica	85
Figura 33: A indução do microRNA 486-5p aumenta a proliferação de células H358 de forma dependente da KRAS	86
Figura 34: A inibição do miRNA486-5p reduz a proliferação de células H358 portadoras da forma oncogênica da KRAS	87
Figura 35: Figura ilustrativa do microarranjo de microRNA.....	88
Figura 36: Validação da expressão diferencial de microRNAs nas linhagens primárias pulmonares. ...	91
Figura 37: Gráfico das vias influenciadas pelo microRNAs diferencilmente expressos encontrados com o mesmo <i>trend</i> de expressão no microarranjo e na metanálise	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de reação de PCR para detecção de DNA genômico em amostras de RNA	36
Tabela 2: Ciclagem do PCR para detecção de DNA genômico em amostras de RNA	36
Tabela 3: Protocolo para primeira parte da reação de transcrição reversa de mRNA	37
Tabela 4: Protocolo para segunda parte da reação de transcrição reversa de mRNA.....	37
Tabela 5: Protocolo da reação de transcrição reversa de microRNA	39
Tabela 6: Ciclagem da reação de transcrição reversa de microRNA	39
Tabela 7: Sequências dos <i>primers</i> utilizados no trabalho	41
Tabela 8: Experimentos de microarranjo de miRNA em linhagens pancreáticas utilizadas para realizar a metanálise.....	45
Tabela 9: Características dos anticorpos utilizados no <i>western blotting</i>	47
Tabela 10: Concentração e eficiência dos pares de <i>primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR.....	57
Tabela 11: Alvos do microRNA 486-5p gerados por diversos programas, os quais foram utilizados para determinação da funcionalidade deste microRNA.....	64
Tabela 12: Resultado do microarranjo de microRNA para as células pulmonares	89
Tabela 13: Sinais individuais dos miR320d, let7b-5p e 320b no microarranjo pulmonar.....	90
Tabela 14: Resultado do microarranjo de microRNA para as células pancreáticas	92
Tabela 15: microRNAs observados na metanálise com maior expressão nas amostras pancreáticas tumorais em relação a normais.	93
Tabela 16: microRNAs observados na metanálise com maior expressão nas amostras pancreáticas normais em relação a tumorais	94
Tabela 17: microRNAs com expressão diferencial observada tanto no microarranjo de microRNA das linhagens HPDE e HPDE-KRAS quanto na metanálise.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Ago2: *Argonaute 2*

Akt: *v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*

Amp: Gene de resistência a ampicilina

BEGM: *Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*

BTAF1: *TATA-binding protein-associated factor*

CADM1: *Cell adhesion molecule 1*

CDK: Ciclina dependente de quinase

CENPJ: *Centromere protein J*

CML: Leucemia mielóide crônica

cPPT: *Central Polypurine tract*

DDX: *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Helicase*

DGCR8: *DiGeorge critical region 8*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DNMT3B: *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta*

dNTP: *Deoxynucleotide*

DOX: Doxíciclina

DTT: *Dithiothreitol*

E6 e E7: *Early proteins de HPV*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGF: *Epidermal growth factor*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

MAPK: *Mitogen activated protein kinases*

ERK: *extracellular signal-regulated kinases*

FDR: *False Discovery rate*

FoxO1: *Forkhead box protein O1*

FTI: Inibidores de farnesil transferase

G12V: Substituição do aminoácido 12 de glicina por valina

GAP: *GTPase activating proteins*

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDP: Guanosina difosfato

GEF: *Guanine Nucleotide Exchange Factors*

GGT: Geranilgeranil transferase

Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*

GTP: Guanosina trifosfato

HOXD10: *Homeobox D10*

HPV: *Human papillomavirus*

hTERT: *Human Telomerase reverse transcriptase*

IRES: *Internal ribosome entry site*

kDa: Quilo Dalton

KLF4: *Kruppel-like factor 4*

KRAS: *Kirsten rat sarcoma*

KSFM: *Keratinocyte serum-free medium*

MACF1: *microtubule-actin crosslinking factor 1*

MCL1: Myeloid cell leukemia 1

MEK: *Mitogen-activated protein kinase*

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MMLV: *Moloney Murine Leukemia Virus*

mRNA: RNA mensageiro

mTOR: mechanistic target of rapamycin

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NSCLC: *Non-small cell lung cancer*

Ori: Origem de replicação em eucariotos

Pasha: *Partner of Drosha*

pb: Pares de bases

PBSA: *Phosphate buffered saline* sem cálcio e magnésio

pCMV-VSVG: Vetor com promotor de *Cytomegalovirus* expressando glicoproteína G de *vesicular stomatitis virus*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

pUC: Origem de replicação em procariotos

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa após transcrição reversa

Raf: *Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

RFP: Proteína fluorescente vermelha

RIN: *RNA integrity number*

RISC: *RNA- induced silencing complex*

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferência

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

rtTA3: *Reverse tet-transactivator3*

SFB: Soro fetal bovino

shRNA: *Short hairpin RNA*

siRNA: *small interfering RNA*

Snord: *Small nucleolar RNA*

SNP: single nucleotide polymorphism

SOS: *Son of sevenless*

SV40: *Simian Virus 40*

TGF α : *Transforming growth factor alpha*

TRBP: *transactivation-response RNA-binding protein*

TRE: *Tetracycline responsive RNA Polymerase II promoter*

tRFP: Gene da proteína tubo *Red Fluorescent*

UBC: *Ubiquitin C*

UTR: *Untranslated region*

Zeo: Gene de resistência a zeocina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. KRAS	17
1.2. MicroRNAs	23
1.3. miRNAs no câncer	27
2. OBJETIVO GERAL	32
2.1. Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Linhagens celulares	33
3.2. Extração de RNA	34
3.3. Tratamento do RNA com DNase e detecção de DNA genômico no RNA	35
3.4. Reação de transcrição reversa	36
3.5. Determinação da concentração e eficiência de <i>primers</i>	39
3.6. Reação de PCR em tempo real	40
3.7. Determinação da integridade das amostras de RNA tratadas com DNase	43
3.8. Microarranjo de microRNA	43
3.9. Análise de bioinformática do microarranjo	44
3.10. Extração de proteínas	46
3.11. Western blotting	46
3.12. Produção de lentivírus com as construções de interesse	47
3.13. Quantificação viral	49
3.14. Determinação da concentração efetiva de puromicina	49
3.15. Transdução viral	49
3.16. Concentração efetiva de doxíciclina para indução	50
3.17. Cinética temporal de indução por doxíciclina	50
3.18. Seleção clonal das células H358 e A549	51
3.19. Transfecção de siRNA (<i>small interfering RNA</i>) para KRAS	51

3.20 Manipulação do microRNA 486-5p.....	52
3.21 Ensaios celulares	53
3.22 Estatística	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Geração de reagentes e padronização de ensaios	56
4.2 Identificação do microRNA 486-5p como alvo de KRAS em células pulmonares.....	63
4.2.1 Avaliação da expressão do microRNA486-5p e seus alvos nas linhagens primárias.....	63
4.2.2 Avaliação da expressão do microRNA486-5p e seus alvos nas linhagens de câncer de pulmão com inibição da expressão de KRAS	65
4.2.3 Avaliação da expressão do microRNA486-5p e seus alvos em linhagem pulmonar com expressão induzível da forma oncogênica da KRAS.....	68
4.3 Avaliação funcional do microRNA486-5p	71
4.3.1 Experimentos de análise funcional do knock down e superexpressão de KRAS.....	71
4.3.2 Experimentos de análise funcional do microRNA 486-5p	75
4.3.3 Mecanismo de ação pró-tumoral do microRNA 486-5p	84
4.4 Identificação de microRNAs diferencialmente expressos pelo ensaio de microarranjo de microRNA.....	87
4.4.1 Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pulmonares.....	88
4.4.2 Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pancreáticas.....	91
5. DISCUSSÃO	97
5.1 Avaliação do miRNA candidato 486-5p como alvo do oncogene KRAS em células de câncer de pulmão e pâncreas	98
5.2 Ensaios de microarranjos de microRNAs em linhagens primárias de células pulmonares ou pancreáticas normais imortalizadas na ausência (SALEB, HPDE) ou presença de KRAS oncogênica (SAKRAS, HPDE-KRAS)	103
6. CONCLUSÕES	109
6.1 Análise do microRNA 486-5p como alvo do oncogene KRAS no pulmão.....	109
6.2 Experimentos de microarranjos de DNA em pares isogênicos de células primárias	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
SÚMULA CURRICULAR	127
MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO	130

1. INTRODUÇÃO

1.1. KRAS

Os genes RAS foram primeiramente identificados e caracterizados como oncogenes transduzidos em linhagens celulares (Harvey, 1964; Chang *et al.*, 1982). KRAS pertence a essa superfamília juntamente com HRAS e NRAS, compartilhando atividade bioquímica básica: ligação e hidrólise de GTP, característico pela presença de sequências conservadas denominadas “*G box*” (Dever *et al.*, 1987; Bourne *et al.*, 1991). A maioria das proteínas dessa família localizam-se na face interna da membrana plasmática e são modificadas pós-traducionalmente. Evidências tanto em cultura celular (Bar-Sagi *et al.*, 1985) quanto em organismos modelos (Simon *et al.*, 1991; Han *et al.*, 1990) sugerem que todos os membros desta família contribuem para diferenciação e desenvolvimento celular (Brambilla *et al.*, 1997).

KRAS é uma pequena proteína de 22kDa com fraca ação GTPásica, que transmite sinais oriundos de receptores de membrana para efetores intracelulares, culminando em um aumento da proliferação e sobrevivência celular. Para exercer esta função, a KRAS cicla entre um estado ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado a GDP. No estado ativo, participa da ativação de diversas vias que promovem proliferação e sobrevivência celular, com destaque para Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt (Engelman *et al.*, 2006). A interconversão entre os estados ativo e inativo é controlada por duas classes de proteínas regulatórias: *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs) e *GTPase activating proteins* (GAPs). A primeira classe tem como característica proporcionar liberação do GDP da KRAS na forma inativa, e com isso permitir a ligação de GTP e sua consequente ativação. A segunda classe funciona como catalisador da ação GTPásica de KRAS, permitindo que ocorra a hidrólise do GTP e com isso tornando-a inativa.

Figura 1: Esquema de atividade de Ras, mostrando que encontra-se ativa quando ligada a GTP, sendo este último hidrolisado em GDP e fosfato, inativando-a. A ativação ocorre quando o GDP é desligado da Ras pelas GEFs, e esta pode-se então ligar a GTP (modificado de Colicelli J. *et al*, 2004)

A ativação de KRAS é mediada por receptores de membrana, como os receptores de tirosina quinase, dos quais o EGFR é o melhor compreendido. Neste caso, a ligação de EGF, TGF α , ou outros ligantes ao receptor EGFR leva a dimerização e fosforilação deste receptor, e com isso o recrutamento de outras moléculas, como Grb2 e SOS (uma GEF), e consequente ativação de KRAS. A KRAS ativada tem por função induzir a replicação e sobrevivência celulares, ativando diversas vias de sinalização, sendo que as mais bem conhecidas são as vias PI3K e RAF/MAPK. A via de PI3K tem como alvos *downstream* AKT/mTOR, que levam a uma inibição da apoptose, sendo a AKT inibida pelo supressor de tumor PTEN (Morgensztern *et al.*, 2005). A via de RAF ativa as quinases MAPK (ERK1/2), que fosforilam fatores de transcrição, como myc e creb, que são responsáveis por induzir a proliferação celular (Downward, 2003; Hilger *et al.*, 2002).

A KRAS apresenta 2 isoformas, denominadas 4A e 4B, ambas ancoradas na face interna da membrana plasmática por modificações pós-traducionais de farnesilação, proteólise e metilação em ambas isoformas e uma palmitoilação na isoforma 4A, enquanto a isoforma 4B utiliza-se de uma região de polilisina (Clarke, 1992; Kato *et al.*,

1992). As isoformas ocorrem devido a *splicing* alternativo do exon 4 (Barbacid, 1987) e a forma 4B é mais abundante (Lowy *et al.*, 1993).

O proto-oncogene KRAS representa um fator-chave na etiologia e evolução do câncer, uma vez que seu produto apresenta mutações na maioria dos pacientes portadores de câncer, principalmente nos códons 12, 13 e 61 (Grunewald *et al.*, 1989; Almoguera *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 2010). Mutações em KRAS são encontradas em torno de 30-40% de pacientes portadores de adenocarcinomas pulmonares e em 70-90% dos pacientes portadores de carcinomas pancreáticos (Raponi *et al.*, 2006; Hruban *et al.*, 1993; Lohr *et al.*, 2005). Estas mutações tem a capacidade de manter esta GTPase permanentemente na sua forma ativa pois proporcionam modificações estruturais que impedem a hidrólise do GTP da KRAS ativa para GDP. Desta forma, a KRAS passa a transmitir sinais moleculares constitutivamente, o que culmina na proliferação celular e resistência à apoptose (Mansour *et al.*, 1994; Cowley *et al.*, 1994).

Diversos fatores etiológicos e clínicos parecem estar envolvidos com as propriedades de KRAS. Enquanto taxa de mutação em EGFR é maior em asiáticos do que caucasianos, a de KRAS apresenta taxa oposta, de 25-50% em caucasianos e de 5-15% em asiáticos (Okudela *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2010). De forma esperada, uma série de estudos associam o tabaco a mutações específicas em KRAS, o que pode ser utilizado para identificar um perfil molecular do efeito carcinogênico induzido por KRAS (Riely *et al.*, 2009; Thu *et al.*, 2012; Riely *et al.*, 2008). Foi mostrado que mutações de transversão, nas quais ocorre substituição de pirimidina por purina e vice-versa, são mais comuns do que transição, nas quais ocorre substituição entre purinas ou entre pirimidinas, em pacientes com histórico de tabagismo em relação a não tabagistas (Riely *et al.*, 2008).

A investigação da participação da KRAS oncogênica no prognóstico de pacientes com câncer de pulmão também é alvo de estudos, diferentemente de pacientes com câncer de pâncreas pois a taxa de mutação em KRAS no câncer de pâncreas é extremamente alta. Graziano *et al.* (1999) e Keohavong *et al.* (1996) não observaram diferença na sobrevida entre pacientes com adenocarcinoma pulmonar em relação à presença de mutação em KRAS. De forma oposta e significativa, Slebos *et al.* (1990), demonstraram que a mutação no códon 12 apresenta prognóstico negativo para sobrevida e tempo livre de doença em pacientes com adenocarcinoma pulmonar tratados cirurgicamente. Outros 3 estudos também demonstraram de forma significativa que pacientes com adenocarcinoma pulmonar com mutação em KRAS apresentaram pior prognóstico e menor sobrevida em relação a pacientes sem mutação em KRAS (Fukuyama *et al.*, 1997; Miyake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1998). Em uma revisão sistemática e metanálise realizada mais recentemente incluindo 3620 pacientes foi observado que a presença de mutação em KRAS proporciona um prognóstico significativamente pior e, em uma análise de subgrupos histológicos, demonstrou-se que esse pior prognóstico só era observado em adenocarcinomas (Mascaux *et al.*, 2005). De forma geral, esses dados indicam que a KRAS mutada pode representar um fator importante no prognóstico de câncer de pulmão.

Visto que KRAS ativa vias de sinalização importantes no processo de transformação maligna, diversos experimentos foram conduzidos para determinar sua causalidade nesse processo. KRAS foi inicialmente descrita como a forma celular do agente transformador do vírus de sarcoma Kirsten (Chang *et al.*, 1982; Der *et al.*, 1982). Além disso, muitos estudos mostraram que a expressão da forma ativa da KRAS em camundongos é suficiente para causar a transformação neoplástica e o aparecimento de tumores (Braun *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2001). A eliminação da

atividade de KRAS, através da expressão de formas dominante-negativas ou através do bloqueio de sua expressão, é capaz de reverter células malignas para um fenótipo não maligno (Fleming *et al.*, 2005). Finalmente, a alta prevalência das mutações em KRAS dentro de um amplo espectro de neoplasias sugere que a KRAS desempenha um papel central no desenvolvimento do fenótipo maligno (Arvanitakis *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2000).

Portanto, usar a proteína KRAS como um alvo terapêutico é uma estratégia racional que deveria trazer benefícios clínicos. Diferentes estratégias terapêuticas visando inibir a atividade biológica de KRAS foram desenvolvidas, como inibição de efetores de KRAS, inibição de sua tradução, das modificações pós-traducionais, bem como o desenvolvimento de terapias imunológicas específicas direcionadas a forma oncogênica (Fig. 2).

Figura 2: Estratégias de terapia anti-tumoral baseada em KRAS. A interferência na sinalização de KRAS foi tentada em diversos níveis, incluído tradução, modificação pós-traducional, ativação/inativação, além de efetores *downstream* (Modificada de Friday B.B. and Adjei A.A., 2005)

Apesar disso, nenhuma destas estratégias obteve sucesso clinicamente por diversos motivos. Inibidores de efetores da via Raf/MEK/ERK não foram efetivos provavelmente por KRAS não utilizar somente essa via para transformação maligna, e

KRAS pode ativar vias em proporções distintas em diferentes tipos celulares (Hamad *et al.*, 2002).

A tentativa de tratamento com RNAi para depleção de KRAS mostrou efetividade em algumas linhagens celulares de NSCLC (Singh *et al.*, 2009), porém em testes clínicos existe a limitação de efetividade de métodos de *delivery* deste RNAi para células tumorais, o que está se desenvolvendo em estudos envolvendo nanopartículas (Davis *et al.*, 2010) e também de outros materiais para possibilitar um *delivery* mais eficiente (Kanasty *et al.*, 2013). O direcionamento desses siRNAs para células tumorais e não para normais é um desafio que tem sido enfrentado, visando o aumento da especificidade do tratamento (O'mahony *et al.*, 2013; Hobel *et al.*, 2013).

Com relação às modificações pós-traducionais, KRAS sofre farnesilação da sua citosina carboxi-terminal, o que é essencial para sua interação com a membrana plasmática. Esta localização subcelular é crucial para que a KRAS exerça sua função. Inibidores de farnesil transferase (FTI) foram testados, mas não foram efetivos, porque na ausência de farnesilação, a KRAS pode sofrer uma prenilação alternativa (geranilgeranilação), continuando, portanto, capaz de interagir com a membrana plasmática (Fiordalisi *et al.*, 2003). A inibição combinada de farnesil transferase e geranilgeranil transferase (GGT) apresentou um nível inaceitável de toxicidade, provavelmente porque a inibição de duas vias importantes de prenilação celular deve comprometer a função de diversas proteínas importantes que sofrem estas modificações (Lobell *et al.*, 2001; Lobell *et al.*, 2002).

Já estratégias envolvendo terapias imunológicas para KRAS mutante mostraram-se seguras, porém sem uma eficácia comprovada (Gjertsen *et al.*, 2001; Gjertsen *et al.*, 1995). A vacinação de pacientes com adenocarcinoma pancreático com um peptídeo de 21 aminoácidos contendo a mutação no códon 12 de KRAS (mesma mutação presente

nos pacientes), mostrou-se uma abordagem segura e tolerável, porém sem promover imunogenicidade e sem comprovação de eficiência (Abou-Alfa *et al.*, 2011).

Uma abordagem possível que pode ser bem sucedida na terapia das neoplasias induzidas por KRAS é a inibição combinada de seus alvos mais relevantes para o desencadeamento e manutenção do fenótipo maligno. Para que isto seja possível, é imprescindível que as vias moleculares envolvidas nos diferentes aspectos do fenótipo maligno desencadeado por KRAS sejam identificadas. Uma via importante regulada por KRAS que pode contribuir significativamente para o processo maligno e que permanece pouco explorada é a via dos microRNAs.

1.2. MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs de fita simples não codificadores que regulam a expressão gênica ao nível pós-transcricional, e acredita-se que podem regular entre 20-30% dos genes humanos (Ambros, 2003; Bartel *et al.*, 2004; Reinhart *et al.*, 2000). São transcritos a partir do genoma celular, sendo caracterizados até hoje mais de 1000 genes em humanos (Kozomara *et al.*, 2011). Esses genes têm localização variável no genoma, podendo estar em sequências intrônicas de genes codificadores de proteínas, dentro de regiões intrônicas e exônicas de RNAs não codificadores ou em regiões intergênicas. De forma interessante, os miRNAs podem ser expressos de forma individual ou então em *clusters*, funcionando como policistrons (Lau *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2001), compostos geralmente de dois a três miRNAs por *cluster* (Mourelatos *et al.*, 2002; Aravin *et al.*, 2003), porém com exemplos de seis ou até quarenta miRNAs por cluster (Seitz *et al.*, 2004). A maior parte dos miRNAs intrônicos de genes codificadores de proteínas é transcrito em função do mesmo promotor do gene codificador, entretanto um terço é transcrito a partir de

promotores independentes, indicando que os miRNAs podem ser transcritos de forma separada e controlada (Monteys *et al.*, 2010; Ozsolak *et al.*, 2008). Isso fica demonstrado pela expressão tecido-específica de miRNAs, como o miRNA-1 em músculo e o miRNA-122 no fígado (Chiang *et al.*, 2010; Landgraf *et al.*, 2007). De forma interessante, os promotores de miRNAs também podem conter ilhas CpG, sequências TATA *Box*, elementos de iniciação e algumas modificações de histonas, indicando que podem ser regulados por fatores de transcrição, *enhancers*, elementos de silenciamento e modificações da cromatina (Ozsolak *et al.*, 2008).

A formação e processamento dos miRNAs ocorre de forma canônica e não canônica. A primeira forma tem início a partir de transcrição de regiões genômicas pela RNA polimerase II, gerando transcritos primários denominados pri-miRNAs, sendo que estes possuem as mesmas modificações de mRNAs, como poliadenilação na extremidade 3' e adição de cap 7-metil-guanosina na extremidade 5' (Lee *et al.*, 2004). Alguns poucos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase III, como, por exemplo, alguns miRNAs virais (Borchert *et al.*, 2006; Diebel *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2005). No núcleo, os pri-miRNAs são processados pela RNase Drosha em precursores com aproximadamente 70 nucleotídeos, chamados pré-miRNAs, os quais possuem estrutura de grampo formada por pareamento intramolecular e apresentam um *overhang* de 2 nucleotídeos na extremidade 3'. Isso ocorre com auxílio de outras proteínas, como o cofator DGCR8 (DiGeorge *critical region* 8), também conhecido como Pasha, DDX5 e DDX17 (Gregory *et al.*, 2004). Em seguida os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma pela Exportina-5, em conjunto com a proteína Ran-GTP. No citoplasma são clivados em RNAs de fita dupla de cerca de 22 pb por outra RNase III denominada Dicer (Waldman *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2003), novamente gerando um *overhang* de 2 nucleotídeos nas duas extremidades. Uma das fitas é funcional e se associa ao complexo

RISC (RNA-induced silencing complex), enquanto a outra é degradada. A escolha da fita funcional é frequentemente determinada pela estabilidade termodinâmica da extremidade 5' da dupla-fita, sendo a fita menos estável a fita funcional (Pratt *et al.*, 2009).

A atividade de regulação negativa pós-transcricional dos miRNAs ocorre principalmente pela sua interação com a região 3'UTR do mRNA alvo, processo dependente de RISC e amplamente determinado pelo pareamento de 7 nucleotídeos na região 5' do miRNA (“*seed sequence*”) com o mRNA alvo. Após a ligação, ocorre a ativação do RISC, composto pela *transactivation-response RNA-binding protein* (TRBP) e *Argonaute 2* (Ago2), que irá ser responsável pela degradação do mRNA ou repressão da tradução (Van Den Berg *et al.*, 2008; Van Kouwenhove *et al.*, 2011).

Figura 3: Biogênese canônica de microRNAs. A transcrição ocorre principalmente pela RNA polimerase II, originando um transcrito primário denominado pri-miRNA, que é processado no núcleo pela Drosha, originando o segundo transcrito pre-miRNA. Este é exportado para o citoplasma e processado pela Dicer, gerando uma dupla fita de RNA. Uma das fitas é degradada e a outra é funcional, regulando a tradução de genes alvos. (modificada de Esquela-Kerscher A. and Slack F.J., 2006)

Existe, entretanto um pequeno grupo de miRNAs em que a biogênese ocorre de forma não-canônica, no qual nem todas proteínas e fatores são necessários (Babiarz *et al.*, 2008). Os “mirtrons”, por exemplo, são produzidos a partir do *splicing* de mRNA e não por ação da Drosha (Berezikov *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007).

E de forma interessante, os miRNAs tem sido observados e propostos como mensageiros e sinalizadores celulares. Por exemplo, Fabbri *et al.* (2012) demonstraram que os miRNAs 21 e 29a ligam-se ao receptor murino TLR7 (*Toll-like receptor 7*) e ao receptor humano TLR8 (*Toll-like receptor 8*) em células do sistema imunológico, provocando a ativação de NF- κ B e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias.

O mecanismo de inibição da expressão de mRNAs alvos pelos miRNAs depende do nível de complementaridade entre o miRNA e seu alvo. Em animais, a maior parte dos miRNAs agem bloqueando a tradução por não formar pareamento perfeito com o mRNA, enquanto nas plantas o pareamento é perfeito, levando à degradação do mRNA e restringindo um mRNA alvo para cada microRNA (Filipowicz *et al.*, 2008; Van Den Berg, Mols e Han, 2008).

Os miRNAs são capazes de controlar de forma fina e sensível o processo de tradução, e de forma complexa e organizada formam uma rede, sendo que um único miRNA pode regular mais de um mRNA, e um mRNA também pode ser regulado por mais de um miRNA (He *et al.*, 2004). Essa nova classe de moduladores da expressão protéica apresenta atualmente 28645 entradas segundo a versão junho de 2014 do banco de dados mirBase (www.mirbase.org). Uma série de estudos tem sido desenvolvidos no sentido de esclarecer os papéis dos miRNAs em modelos fisiológicos normais como diferenciação e crescimento, além de modelos patológicos, principalmente neoplasias.

1.3. miRNAs no câncer:

Com o aumento do conhecimento sobre os miRNAs fica cada vez mais evidente seu papel no processo de tumorigênese, com a expressão de níveis anormais em diferentes tipos e estágios tumorais (Waldman e Terzic, 2009). Os miRNAs podem agir como supressores de tumor ou oncogenes, interferindo no processo de transformação maligna. No primeiro caso os miRNAs apresentam expressão diminuída nas amostras tumorais e tem como alvos oncogenes de vias importantes para o processo de tumorigênese, como Bcl2 (alvo do miRNA15 e miRNA16-1; Cimmino *et al.*, 2005), Ras (alvo do let7, Johnson *et al.*, 2005), *myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL1; alvo do miRNA29, Garzon *et al.*, 2009; Mott *et al.*, 2007) e MYC (alvo de let-7; Sampson *et al.*, 2007). No segundo caso, os miRNAs apresentam expressão aumentada nas amostras tumorais e tem como alvos supressores de tumor como APC (alvo do miRNA155, Zhang *et al.*, 2013), SIRT1 (alvo do miRNA29c, Bae *et al.*, 2013), Dkk-3 e SMAD4 (alvos de miRNA183, Ueno *et al.*, 2013).

A influência e participação dos miRNAs no processo de transformação maligna vem sendo cada vez mais elucidadas e evidenciadas em uma série de modelos (Majid *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2011), incluindo o uso como terapias adjuvantes no tratamento de câncer e, também, como fatores prognósticos (Volinia *et al.*, 2012).

Figura 4: Os microRNAs podem estar desregulados e participar no processo de transformação maligna. Esquerda) Quando estão subexpressos e funcionam como supressores de tumor (inibindo a tradução de oncoproteínas); Direita) Quando estão com expressão elevada e funcionam como oncomiRs, inibindo a tradução de proteínas supressoras de tumor (modificada de Esquela-Kerscher A., Slack F.J., 2006).

As pesquisas envolvendo miRNAs e câncer podem ser divididas essencialmente em três fases: primeiramente quantitativas, na determinação de miRNAs em modelos tumorais em relação a células normais (Jiang *et al.*, 2005; Yanaihara *et al.*, 2006). Em segundo lugar, a sua regulação no contexto dos mRNA celulares, quais são seus alvos e sua rede de regulação (Weiss *et al.*, 2008; Seike *et al.*, 2009). E, por último, e ainda em fase de expansão, pesquisas que propõem terapias para câncer baseadas nessas

moléculas (Gandellini *et al.*, 2011; Frezzetti *et al.*, 2011). Além disso, a presença destas moléculas no sangue é extensivamente estudada como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de diversas patologias, como o miRNA21, miRNA155 e miRNA223, que apresentam expressão elevada em pacientes com diversos tipos de câncer (Roth *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2011).

Devido ao crescente interesse em se investigar o papel dos miRNAs na oncogênese, e devido à importância do oncogene KRAS, não é de se surpreender que diferentes miRNAs já foram identificados, capazes de regular a expressão do oncogene KRAS. A expressão do miRNA18a em células de carcinoma escamoso A431, por exemplo, reduz a expressão de KRAS especificamente (sem afetar H-Ras ou N-Ras) e reduz a proliferação celular e crescimento na ausência de substrato (Tsang *et al.*, 2009). Além disso, Shin *et al.*, 2011, identificaram uma redução na expressão do miRNA181a em amostras de carcinoma oral e identificaram a KRAS como um alvo, sendo que a superexpressão deste miRNA em células de carcinoma oral diminui sua taxa de crescimento em cultura organotípica tridimensional. Finalmente, o miRNA mais bem estudado que tem como um alvo a KRAS é a família de miRNAs let-7 (Johnson *et al.*, 2005). Sabendo que alguns membros da família let-7 apresentam expressão reduzida em pacientes com câncer de pulmão (Johnson *et al.*, 2005), dois estudos independentes demonstraram em modelos celulares e ensaios xenográficos de tumorigênese que alguns membros desta família (Let-7a e Let-7g) não só reduzem a expressão da proteína KRAS bem como suprimem o desenvolvimento de tumores pulmonares (Kumar *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2005). Mais recentemente foi demonstrado que em células de glioblastoma, o let-7 também reduz a expressão das Ras GTPases, reduz a proliferação e migração celulares, e a habilidade destas células crescerem na forma de tumores xenográficos (Lee *et al.*, 2011).

Mutações em KRAS e miRNAs foram investigados por Ratner *et al.*, 2010 que realizaram genotipagem para a região 3'UTR da KRAS e mutações nesta região foram observadas como relacionadas com potencial prejuízo na inibição do mRNA deste gene por miRNAs. Já a presença de SNPs na região 3'UTR da KRAS também foi descrita com maior frequência em pacientes com câncer de pulmão, correlacionando-se com uma menor expressão de let7 e maior expressão de KRAS (Chin *et al.*, 2008). Além disso, esse SNP está associado a um maior risco de câncer ovariano, principalmente em pacientes com BRCA1 e BRCA2 normais (Ratner *et al.*, 2012).

Já a indução de expressão de miRNAs por KRAS é uma área pouco explorada, sendo encontrados poucos e recentes artigos que buscam uma relação entre estas moléculas (Pichler *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2012; Mosakhani *et al.*, 2012) mas nenhum propondo uma relação direta. Na primeira descrição, células tumorais de cólon portadoras de KRAS mutada apresentam miRNAs diferencialmente expressos em relação a células portadoras de KRAS normal, destacando-se os miRNAs 146-3p e 486-5p (Ragusa *et al.*, 2010). De forma semelhante, amostras primárias metastáticas de tumores de cólon com mutação em KRAS apresentaram expressão aumentada dos miRNAs 127-3p, 92a e 486-3p, enquanto diminuída do miRNA378 em relação a ausência de mutação em KRAS (Mosakhani *et al.*, 2012). Um terceiro estudo com linhagens celulares de cólon portadoras de KRAS oncogênicas cultivadas em cultura 2D e 3D apontou um aumento na expressão de miRNA15b, miRNA16, miRNA23a, miRNA24, miRNA103 e miRNA222 em ambas as condições de cultura e de miRNA181a, miRNA200c e miRNA210 somente na condição 3D (Ota *et al.*, 2012). Todos esses resultados demonstram que a ativação oncogênica de KRAS gera alteração no perfil de expressão de miRNAs em células de cólon e sugerem que estes miRNAs podem contribuir para a transformação maligna induzida por KRAS.

Nós postulamos que a ativação da KRAS oncogênica leva a alterações na expressão de alguns miRNAs críticos, cuja perda ou ganho de função tem como resultado final o favorecimento das propriedades oncogênicas celulares. O foco deste projeto foi, portanto, identificar miRNAs diferencialmente expressos, que não só sejam regulados pela forma oncogênica da KRAS, mas também que desempenhem um papel importante no surgimento e na manutenção do fenótipo maligno. Esta contribuição é importante porque espera-se que vá contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos neoplásicos induzidos pela KRAS oncogênica, bem como permitir o desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais.

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral identificar miRNAs regulados pelo oncogene KRAS, que sejam importantes no desenvolvimento e/ou manutenção do fenótipo maligno.

2.1 Objetivos específicos:

- 2.1.1 Identificar os miRNAs diferencialmente expressos em linhagens primárias imortalizadas na presença ou ausência do oncogene KRAS através de experimentos com microarranjos de DNA ou através da análise de expressão individual de miRNAs candidatos.
- 2.1.2 Confirmar a expressão diferencial dos miRNAs em células neoplásticas humanas portadoras da forma oncogênica da KRAS através de inibição da expressão da KRAS por interferência de RNA;
- 2.1.3 Investigar o papel funcional desempenhado pelos miRNAs identificados mais promissores na transformação neoplástica pela KRAS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Linhagens celulares:

Foram utilizadas 8 linhagens celulares nos experimentos:

- 3.1.1 Duas linhagens primárias isogênicas de pulmão humano imortalizadas com hTERT e SV40, uma expressando KRAS oncogênica (G12V) e outra não o fazendo, denominadas Sakras e Saleb, respectivamente (Lundberg *et al.*, 2002);
- 3.1.2. Duas linhagens primárias de pâncreas humano imortalizadas com antígenos E6 e E7 do HPV, uma expressando KRAS oncogênica (G12V) e outra não o fazendo, denominadas HPDE-KR e HPDE, respectivamente (Ouyang *et al.*, 2000);
- 3.1.3. Duas linhagens pulmonares tumorais humanas com mutação em KRAS, uma linhagem de adenocarcinoma designada A549 (ATCC CCL-185) e uma linhagem de carcinoma brônquio-alveolar designada H358 (ATCC CRL-5807), manipuladas ou não para inibição de KRAS por interferência de RNA;
- 3.1.4. Linhagem celular de carcinoma escamoso pulmonar humano, designada H1703 (ATCC CRL-5889), que não é portadora de mutações oncogênicas em KRAS, modificada para expressar KRAS oncogênica na presença de doxiciclina (H1703 G12V) e sua linhagem controle (H1703 T-RExB), a qual não apresenta expressão de KRAS na presença de doxiciclina. Estas células foram geradas através do sistema induzível de expressão *T-RExTM System* (Invitrogen[®]) e já se encontravam disponíveis no laboratório.

As linhagens primárias de células pulmonares e pancreáticas foram cultivadas em meio livre de soro BEGM (Lonza[®]) e meio livre de soro KSFM (Invitrogen[®]), respectivamente.

As linhagens tumorais pulmonares A549 e H358 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), enquanto as linhagens tumorais pulmonares H1703 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, blasticidina 3mg/mL e zeocina 10mg/mL.

Após a utilização das células A549 e H358 para a obtenção de células *knockdown* (ver procedimento 3.10-3.16), o cultivo passou a ser feito em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2µg/mL de puomicina.

Todas as linhagens foram cultivadas em uma atmosfera úmida constituída de 95% de O₂ e 5% de CO₂ à temperatura de 37°C. A subcultura foi feita sempre que as células atingiram 80 a 90% de confluência, utilizando-se solução de tripsina 0,1% (w/v) diluída em PBSA, adicionada de EDTA 0,53mM. Os estoques celulares foram criopreservados no meio de cultivo contendo dimetilsulfóxido 10% à temperatura de -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.2 Extração de RNA:

Para extração do RNA as células primárias foram lavadas duas vezes com PBS e descoladas com solução de tripsina (Lonza[®]). A inativação da tripsina foi realizada por diluição com volume dez vezes maior de PBS, seguida de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O RNA do *pellet* celular foi extraído com o Kit *Absolutely* RNA miRNA Kit (Agilent Technologies[®]) seguindo as instruções do fabricante.

A extração de RNA das linhagens tumorais foi feita lavando-se a placa duas vezes com PBS e descoladas com volume necessário de tripsina 0,1%. A inativação da tripsina foi realizada com o mesmo volume de meio contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante retirado e ao pellet foi adicionado 500µL de TRIzol (Invitrogen®) para extração do RNA de acordo com o protocolo do fabricante.

A quantificação foi realizada em Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*®) e a qualidade das amostras determinada pela razão de absorbância 260/280 nm, sendo consideradas viáveis para uso quando observadas entre 1,8 e 2. Para controle da qualidade e eficiência da extração de RNA total, incluindo miRNA, foi realizada reação de qRT-PCR em termociclador ABI 7300 (*Applied Biosystems*®) para a detecção de genes de alta expressão de mRNA (GAPDH e Actina) e de miRNAs (miRNA21 e let7).

3.3 Tratamento do RNA com DNase e detecção de DNA genômico no RNA:

Todo RNA extraído foi tratado com DNase a fim de se eliminar qualquer resquício de DNA genômico contaminante. Foi tratado 1µg de RNA com 1U de DNase (Fermentas®) e incubado a 37°C por 30 minutos. A DNase foi então inativada com 1µL de EDTA 50mM a 65°C por 10 minutos.

A fim de confirmar a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA das linhagens primárias de pulmão e pâncreas, foi realizada uma PCR para o gene de múltipla cópia Tubulina. Como amostra positiva foi utilizado DNA genômico humano. O protocolo consistia no seguinte:

Tabela 1: Protocolo de reação de PCR para detecção de DNA genômico em amostras de RNA

Reagente	Volume
Taq DNA Pol <i>buffer</i> 10x	2 μ L
dNTP (10mM)	1 μ L
MgCl ₂ (25mM)	1,5 μ L
DTT (0,1M)	1 μ L
<i>Primer</i> tubulina F (1 μ M)	2 μ L
<i>Primer</i> tubulina R (1 μ M)	2 μ L
RNA ou DNA (500ng)	2 μ L
Água MiliQ	8,5 μ L
Total	20 μ L

Tabela 2: Ciclagem do PCR para detecção de DNA genômico em amostras de RNA

1 ciclo	95°C - 10 minuto
	95°C - 45 segundos
35 ciclos	60°C - 45 segundos
	72°C - 45 segundos
1 ciclo	72°C - 5 minutos

Após a reação de PCR, o produto foi tratado com 1 μ L de RNase, afim de degradar o RNA presente.

3.4 Reação de transcrição reversa:

A transcrição reversa foi realizada de acordo com 2 protocolos:

3.4.1. Transcrição reversa de mRNA:

Para esta síntese foi utilizada a enzima MMLV-RT (Invitrogen[®]), iniciadores randômicos “*random primers*” e 1µg do RNA previamente extraído e tratado com DNase, segundo o protocolo abaixo:

Tabela 3: Protocolo para primeira parte da reação de transcrição reversa de mRNA

Reagente	Volume
dNTP (10mM)	1µL
<i>Random primers</i> (200ng/µL)	1µL
Água MiliQ	6µL
RNA (1µg)	5µL
Total	13µL

O volume final foi incubado a 65°C por 5 minutos e colocado imediatamente no gelo. A este volume foram adicionados os respectivos reagentes da tabela abaixo:

Tabela 4: Protocolo para segunda parte da reação de transcrição reversa de mRNA

Reagente	Quantidade
<i>Reverse transcription buffer</i> 5x	4µL
DTT (0,1M)	2µL
MMLV-RT	1µL
Total	7µL

O conjunto final foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e depois a 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. Ao final da reação a amostra foi diluída 3 vezes com água MiliQ e armazenada a -20°C.

3.4.2. *Transcrição reversa de microRNA:*

Neste caso utilizamos uma reação de transcrição reversa para cada miRNA por amostra, utilizando 50ng de RNA previamente extraído e tratado com DNase. Para a transcrição reversa específica de cada miRNA foi utilizado um sistema de *primer* em *loop*, sendo que este possui uma região em *loop* constante e uma região de complementaridade específica à região *seed sequence* 5' do microRNA, garantindo uma transcrição reversa específica (figura 5).

Figura 5: Representação do mecanismo de transcrição específica de microRNA por *stem-loop* RT *primer*, o qual permite uma amplificação subsequente utilizando um *primer* reverso universal e um *primer forward* específico para cada microRNA desejado.

O protocolo de reação de transcrição reversa está descrito nas tabelas seguintes:

Tabela 5: Protocolo da reação de transcrição reversa de microRNA

Reagente	Volume
<i>Reverse transcription buffer 5x</i>	4 μ L
dNTP (10mM)	0,5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	2 μ L
DTT (0,1M)	1 μ L
<i>Primer stem loop</i> (1 μ M)	1 μ L
MMLV-RT (200U/ μ L)	0,25 μ L
RNA (50ng)	5 μ L
Água MiliQ	6,5 μ L
Total	20 μ L

Tabela 6: Ciclagem da reação de transcrição reversa de microRNA

1 ciclo	25°C – 5 minutos
	30°C - 30 segundos
60 ciclos	42°C - 30 segundos
	50°C - 1 segundo
1 ciclo	70°C – 15 minutos

3.5 Determinação da concentração e eficiência de *primers*:

Para determinação da concentração de cada par de *primers* a serem utilizados na reação de PCR em tempo real foram testadas as concentrações de 200, 400, 600 e 800nM. A concentração que apresentou menor ciclo *threshold* e curva de dissociação apresentando somente um pico foi a utilizada. Para determinação da eficiência de cada

par de *primer*, após a determinação da concentração ótima, foi realizada reação de PCR em tempo real nas diluições de cDNA de 1:15, 1:30, 1:60, 1:120 e 1:240. Os resultados dos ciclos *threshold* foram então relacionados à concentração do cDNA correspondente, e gerado um gráfico. A equação da reta do gráfico foi gerada e seu coeficiente angular foi dividido por -1. O resultado foi então utilizado para calcular a eficiência de cada par de *primer* segundo método de Pfaffl (2001), cujo cálculo está descrito na figura 6.

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

Figura 6: Fórmulas utilizadas para calcular a eficiência dos *primers* para reação de qRT-PCR utilizadas no presente trabalho, a fim de realizar os cálculos de diferença de expressão.

3.6 Reação de PCR em tempo real:

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em termociclador ABI 7300 (ABI[®]), com *primers* específicos para mRNA desenhados com auxílio do programa *Primer Express 2.0[®]* (Applied Biosystems[®]), com a detecção realizada por fluorescência de *Sybr Green* e em duplicata técnica e experimental.

Para a quantificação relativa de miRNAs foi utilizado um sistema com um par de *primers*, sendo que o *forward* é específico ao respectivo miRNA e o *reverse* é chamado de universal pois possui complementaridade à região originada a partir do *stem loop* na síntese de cDNA (figura 7).

Figura 7: Representação do esquema de qRT-PCR para microRNAs após a reação de síntese de cDNA específica por *stem loop RT primer*.

A quantificação relativa foi realizada pelo método $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t$). Para normalização das reações de qRT-PCR foram utilizados como controle endógeno de mRNA os genes GAPDH, rRNA18S ou Actina. Para miRNAs foram utilizados Snord44, Snord47 ou Snord48. A expressão relativa destes genes em cada amostra foi utilizada para determinar qual o conjunto de endógenos mais estável, utilizando o programa *Genorm*[®], de acordo com suas instruções.

Os genes e miRNAs analisados, bem como a sequência dos *primers* utilizados estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 7: Sequências dos *primers* utilizados no trabalho

Primer	Sequência
KRAS Forward	5'- CCCAGGTGCGGGAGAGA - 3'
KRAS Reverse	5'- CAGCTCCAACCTACCACAAGTTT- 3'
PTEN Forward	5'- AAAGGGACGAACTGGTGTAATG -3'
PTEN Reverse	5'- TGGTCCTTACTTCCCATAGAA -3'
FoxO1 Forward	5'-GGGTGTGTCAGGCTGAGGGTTA-3'
FoxO1 Reverse	5'- CAGTTCCTGCTGTCAGACAATCTG - 3'
Actina Forward	5'- GGCACCCAGCACAATGAAG- 3'
Actina Reverse	5'- CCGATCCACACGGGAGTACTTG- 3'
miR19b RT	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGTTT-3'
miR19b Forward	5'- TGTGCAAATCCATGCAAAACT- 3'

Let7b RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCACA- 3'
Let7b Forward	5'- TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTGTC- 3'
miR720 RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGGAGG- 3'
miR720 Forward	5'- TCTCGCTGGGGCCTCC- 3'
miR130 RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATGCCCT- 3'
miR130 Forward	5'- CAGTGCAATGTAAAAAGGGCATG- 3'
miR139-3p RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTCCAA- 3'
miR139-3p Forward	5'- GGAGACGCGGCCCTG- 3'
CADM1 Forward	5'- TCCCAACAGGCAGACCATT- 3'
CADM1 Reverse	5'- CTGAAACCTGCTGTCCTTCAAA- 3'
CENPJ Forward	5'- GTGCTGGGCAGTGCACACT- 3'
CENPJ Reverse	5'- TGCTTCTGGCTCTGATCATCA- 3'
MACF1 Forward	5'- AGAGCGTGTGTGGTCAGAGT- 3'
MACF1 Reverse	5'- CTTGGTGAACGTTTTCTTCTGAAC- 3'
BTAF1 Forward	5'- TGTAGTTATGCGGGCCAGAAT- 3'
BTAF1 Reverse	5'- CAAATACAGCAACAAAGTGCTCCTA- 3'
GADPH Forward	5'- GAGCCGCATCTTCTTTTGC- 3'
GAPDH Reverse	5'- CCATGGTGTCTGAGCGATGT- 3'
miR486-5p RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTCGGG- 3'
miR486-5p Forward	5'- TCCTGTACTGAGCTGCCC- 3'
miR486-3p RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATCCTGT- 3'
miR486-3p Forward	5'- CGGGGCAGCTCAGTACAG- 3'
Snord44 RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGTCAGTTAG- 3'
Snord44 Forward	5'- AATGCTGACTGAACATGAAGGTCTT- 3'
Snord47 RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTC- 3'
Snord47 Forward	5'- AAACCGTTCCATTTTGATTCTGAG- 3'
Snord48 RT	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGTCAG- 3'
Snord48 Forward	5'- ACTCTGAGTGTGTCGCTGATGC- 3'
microRNA Universal Reverse	5'- CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT- 3'

3.7 Determinação da integridade das amostras de RNA tratadas com DNase:

As amostras que foram utilizadas para o experimento de microarranjo foram submetidas à análise de integridade de RNA por *Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies®)*, com Nano Chip, aplicando 80-120 ng de RNA de cada amostra. Este, basicamente, analisa a integridade dos rRNAs 18S e 28S, calculando RIN (RNA *integrity number*) por algoritmo próprio, sendo que as amostras foram consideradas íntegras e aptas para uso quando este valor foi superior a 7.

3.8 Microarranjo de microRNA:

Após a extração de RNA das amostras e da determinação da qualidade e integridade foi realizado o microarranjo de miRNAs. As lâminas foram provenientes da *Agilent Technologies® (AMADID 029297 Human miRNA Release 14.0 Rev2)* compostas por 15000 spots, sendo utilizadas 2 lâminas, cada uma composta de 8 arrays, possibilitando quadruplicata para cada linhagem primária. O protocolo foi segundo o determinado pelo fabricante, consistindo basicamente na utilização de 100 ng de RNA total, com posterior desfosforilação, marcação com Cy3-pCp e secagem da amostra. Posteriormente as amostras foram hibridizadas a 55°C por 20 horas e lavadas com os tampões específicos. As lâminas foram escaneadas a 5µm de resolução usando o *DNA Microarray Scanner with SureScan High-Resolution Technology (Agilent Technologies®)* e as intensidades de fluorescência extraídas usando o *Feature Extraction Software®*.

3.9 Análise de bioinformática do microarranjo:

3.9.1 Análise de alvos e vias:

O resultado do microarranjo de miRNA das linhagens primárias pancreáticas foi analisado por bioinformática utilizando o programa DIANA *mirPath* (disponível em <http://diana.imis.athena-innovation.gr>), utilizando *p value threshold* menor de 0,05, no qual os miRNAs com expressão diferencial nas linhagens pancreáticas são analisados quanto a alvos reais e confirmados (banco de dados Tarbase).

3.9.2 Metanálise:

Uma segunda análise realizada por bioinformática foi a metanálise, a qual é capaz de observar se os resultados do microarranjo de microRNA das linhagens engenheiradas HPDE e HPDE KRAS são concordantes com microarranjos já publicados de pacientes com tumor de pâncreas e células tumorais pancreáticas frente a pâncreas normal. Isso foi possível graças à alta taxa (maior que 90%) de mutação de KRAS em pacientes e linhagens tumorais de pâncreas em relação a pâncreas normal, tornando razoável a premissa de que as amostras tumorais analisadas nestes estudos são mutantes para KRAS. Foram utilizados os 5 experimentos de microarranjo de microRNA abaixo, obtidos através de banco de dados (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/browse.html>).

Tabela 8: Experimentos de microarranjo de miRNA em linhagens pancreáticas utilizadas para realizar a metanálise.

Paper	Methods	GEO/Array express accession number
<i>A set of 72 differentially expressed microRNAs provide a molecular signature for pancreatic cancer (Laurila et al, 2012)</i>	<i>16 pancreatic cancer cell lines and 4 normal pancreatic RNA samples were hybridized on Agilent vs1 microRNA microarranjos</i>	E-GEOD-28955
<i>Pancreatic cancer and pancreatitis microRNA profiles (Bauer et al, 2012)</i>	<i>Three markers have been validated by qPCR. n = 22 normal controls, n = 27 pancreatitis samples, and n = 136 pancreatic cancer samples have been screened for the complete microRNA repertoire</i>	E-GEOD-24279
<i>Integrative Survival-Based Molecular Profiling of Human Pancreatic Cancer microRNA (Tran et al, 2011)</i>	<i>42 human PDAC tumors and 7 non-malignant pancreas samples snap-frozen at the time of surgery were chosen</i>	E-GEOD-32678
<i>Global microRNA expression profiling of microdissected tissues from diseased and non-diseased pancreatic tissues (Hahn et al, 2011)</i>	<i>microRNA expression profiling of microdissected pancreatic tissues. Four different sources of RNA: normal pancreatic ductal cells, acinar cells, chronic pancreatitis and xenograft tissues derived from primary pancreatic ductal adenocarcinomas.</i>	E-GEOD-25820
<i>Discovery of microRNAs and other small RNAs in solid human tumors (Meiri et al, 2010)</i>	<i>The samples were from 17 different tissue types and blood samples and were divided among normal (n = 8), tumor (n = 15), tumor adjacent (n = 5) and metastasis indications (n = 8)</i>	E-GEOD-20414

Primeiramente foi calculado o valor médio do sinal de cada miRNA na replicata em cada experimento, seguido por padronização e normalização de nomenclatura e *output* dos dados (já que os experimentos usaram plataformas distintas), para que pudessem ser comparáveis. As amostras foram divididas em 2 grupos: o primeiro consistia das amostras de pacientes e linhagens tumorais (estas sabidamente ou potencialmente portadoras de KRAS mutada) e o segundo grupo foi composto de amostras de pâncreas normal, sem mutação em KRAS. Após o tratamento dos dados e divisão nos 2 grupos, a metanálise foi realizada utilizando o programa Genomica (*Segal Lab of Computational Biology*), criando um “*module map*” de acordo com as instruções do programa.

Esta metanálise permitiu a identificação de microRNAs com expressão diferencial entre os grupos descritos acima em todos estes 5 experimentos.

3.10 Extração de proteínas:

Para as extrações de proteínas, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado, descoladas da placa com *scraper* e tampão RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM, benzamidina 1mM, leupeptina 0,5µg/mL, aprotinina 0,5µg/mL, pepstatina 1mg/mL, fluoreto de sódio 50mM, ortovanadato de sódio 0,2mM) na presença de inibidores de proteases (*Protease inhibitor cocktail*, Roche[®]) e fosfatases (*Phosphatase inhibitor cocktail* 1, Sigma[®]), transferidas a um tubo tipo eppendorf e mantidas em gelo por 5 minutos e em seguida em bloco quente por 2 minutos, procedimento repetido quatro vezes. Após isso foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos para separação de restos celulares, coletado o sobrenadante e transferido para um outro tubo tipo eppendorf. A quantificação protéica foi feita por método de Bradford em espectrofotômetro (Biomate3, *Thermoscientific*[®]) a 595nm.

3.11 Western blotting:

Todos os ensaios de *western blotting* foram realizados utilizando-se 50µg de proteínas totais, corridas em gel de poliacrilamida 12% por 2 horas a 100V. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 1 hora e 30 minutos a 120V a 4°C, e coradas com *Ponceau* para confirmação da transferência. A membrana foi lavada com TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 0.05% Tween 20) três vezes por 5

minutos, bloqueadas com 5% de leite em TBST por 1 hora, e então lavada com TBST três vezes por 5 minutos. A membrana foi incubada com o respectivo anticorpo primário *overnight* a 4°C, todos com 0,1% de azida sódica e 3% de albumina de soro bovino (BSA), seguindo a tabela abaixo:

Tabela 9: Características dos anticorpos utilizados no *western blotting*

Anticorpo	Referência	Diluição	Tamanho	Secundário
PanRas	EMD Millipore, Cat#OP-40	1:1000	22kDa	<i>Mouse</i>
Anti-HÁ	Sigma-Aldrich, Cat# H3663	1:1000	20-22KDa	<i>Mouse</i>
FoxO1	Cell Signaling, Cat#2880	1:500	81kDa	<i>Rabbit</i>
PTEN	Cell Signaling, Cat#9559	1:500	54kDa	<i>Rabbit</i>
Caspase3 total	Cell Signaling, Cat#9662	1:1000	35kDa	<i>Rabbit</i>
Caspase3 clivada	Cell Signaling, Cat#9664	1:1000	17-19kDa	<i>Rabbit</i>
Actina	Santa Cruz, Cat#1615	1:2000	43kDa	<i>Goat</i>

Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes com TBST e incubada com anticorpo secundário adequado conjugado a fluorescência com excitação a 700nm diluído em 3% de BSA em TBST . A membrana foi então escaneada em aparelho *Odyssey* (Licor®).

3.12 Produção de lentivírus com as construções de interesse:

Foram construídas três partículas lentivirais, duas contendo sequências de *short hairpin* RNA (shRNA) distintas para inibição da KRAS denominadas shKRAS1 (V3THS-314004; *Open Biosystems*®) e shKRAS2 (V3THS-314009; *Open Biosystems*®) e outra contendo uma sequência de inibição sem alvos humanos previstos, denominada

shNSCtle (RHS-4743; *Open Biosystems*[®]). O vetor lentiviral utilizado tem como propriedade o gene de resistência à puromicina e o promotor induzível por doxíciclina regulando a expressão do shRNA e da proteína fluorescente turbo-RFP (“*Red Fluorescent Protein*”) (figura 8).

Figura 8: Vetor de inibição pTripz da *Open Biosystems*[®] utilizado no presente trabalho, demonstrando seus elementos. cPPT: *Central Polypurine tract*; Zeo: Gene de resistência a Zeocina; TRE: *Tetracycline responsive RNA Polymerase II promoter*; tRFP: Gene da proteína tubo *Red Fluorescent*; UBC: promotor para controlar expressão de rtTA3 e IRES-puro; rtTA3: *Reverse tetracycline-controlled transactivator 3*; IRES: *Internal ribosome entry site*; Puro': Gene de resistência a puromicina; sv40 Ori: Origem de replicação em eucariotos; pUC: Origem de replicação em procariotos; Amp: gene de resistência a ampicilina

A produção foi feita seguindo o protocolo abaixo:

- Dia 1: Plaqueamento de 10^6 células 293T em placa 10cm;
- Dia 2: Para cada construção de interesse foi feito um *packing mix*, o qual consiste de 2,6µg pCMV-dR8.2 dvpr, 0,325µg pCMV-VSVG e água MilliQ para volume final de 26uL. Ao volume final de cada *packing mix* foi adicionado 2,6µg do vetor lentiviral de interesse. Em um tubo separado foi adicionado 182µL de DMEM sem soro fetal bovino e 16µL Fugene6 (Roche[®]). Este volume foi adicionado a cada tubo com o vetor de interesse produzido no passo anterior, e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. O volume total foi adicionado em cada placa, levadas a estufa a 37°C e 5% CO₂ por 16 horas.

- Dia 3: Após as 16 horas da transfecção, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM com 10% de SFB;

- Dias 4 e 5: O meio de cultura foi coletado, centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para retirada das células 293T. Os sobrenadantes contendo os vírus foram aliquotados em volume de 1mL e congelados a -80°C até a utilização.

3.13 Quantificação viral:

A quantificação da produção viral foi feita com o kit de Lenti-X™ p24 *Rapid Titer Kit* (Clontech®), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Eon (Biotek®) com o *software* Gen5 (Biotek) a 450nm.

3.14 Determinação da concentração efetiva de puromicina:

As células A549 e H358 parentais foram testadas para a determinação da concentração efetiva de puromicina para posterior seleção. Foram testadas concentrações de 0 µg/mL, 25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5 µg/mL de puromicina por 10 dias com troca a cada 3 dias, para determinar a menor concentração capaz de matar todas as células, sendo esta concentração utilizada posteriormente no processo de seleção.

3.15 Transdução viral:

As células A549 e H358 foram transduzidas com uma MOI de 0,5 e 0,8 µg/mL de polibreno para os vetores shKRAS1, shKRAS2 e shNSCtle. Foram plaqueadas 2×10^5

células em um poço de 9 cm², e adicionado volume viral suficiente para a MOI referida. Um dia após a transdução, foi iniciado o processo de seleção por puromicina, seguindo a concentração efetiva determinada. A seleção foi feita por 15 dias, com troca de meio a cada 2-3 dias, e então as células foram descoladas com tripsina 0,1% e congeladas a -80°C com 10% de DMSO.

3.16 Concentração efetiva de doxíciclina para indução:

Após a seleção por puromicina por 15 dias, as linhagens transduzidas A549 e H358 passaram por uma cinética de indução com doxíciclina por 5 dias. Cada linhagem foi cultivada em placa de 6 poços, e utilizada concentração de doxíciclina de 0 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL, 1500 ng/mL e 2000 ng/mL em cada poço, com o meio trocado diariamente.

Após este período as células foram observadas em microscopia de fluorescência em comprimento de onda de 553 nm, sendo observada a proporcionalidade e intensidade de fluorescência emitida.

3.17 Cinética temporal de indução por doxíciclina:

Após a determinação da concentração ótima de doxíciclina em cada uma das linhagens encontradas no experimento anterior foi realizada cinética temporal. As linhagens transduzidas A549 e H358 foram plaqueadas em 3 poços de 9cm², e induzidas com doxíciclina na concentração ótima pelos tempos de 1, 3 e 5 dias de indução.

Após este período as células foram observadas em microscopia de fluorescência em comprimento de onda de 553 nm, sendo observada a proporcionalidade e intensidade de fluorescência emitida.

3.18 Seleção clonal das células H358 e A549:

A fim de se obter as células A549 e H358 com inibição uniforme da expressão de KRAS através de interferência de RNA, foi realizada a seleção clonal das células após a transdução e seleção descritas anteriormente. Para tanto, as células foram descongeladas em meio apropriado sem a presença de doxiciclina, plaqueadas na quantidade de 1000 em placa de 150cm², a fim de se obter células aderidas de forma individual. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂, com troca de meio a cada 3 dias, até o aparecimento de colônias celulares isoladas.

Após o aparecimento destas colônias, a placa teve o meio retirado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e, com auxílio de anéis de clonagem e graxa de silicone, foram isoladas algumas colônias de cada linhagem celular e de cada vetor com solução de tripsina e transferidas para placa de cultura de 9cm² na presença e ausência de doxiciclina na concentração e período ótimo determinados, sendo observadas diariamente em microscopia de luz e de fluorescência a 553 nm. Posteriormente o RNA foi extraído e o mRNA da KRAS quantificado por qRT-PCR.

3.19 Transfecção de siRNA (*small interfering RNA*) para KRAS (siKRAS):

Além da inibição de KRAS de forma estável por shRNA foi realizada a inibição transiente nas linhagens pulmonares A549 e H358 utilizando um *pool* contendo 5 *small*

interfering RNAs (siRNAs) para a KRAS humana (Dharmacon *siGenome Smart Pool siRNA Design*[®]). Foram plaqueadas 2×10^5 células em um poço de 9 cm² em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro feral bovino. No dia seguinte, o meio foi retirado, as células lavadas duas vezes com PBS e adicionado 1 mL de meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino. Em seguida, 10 µL do siRNA *pool* 2 µM foi misturado com 4 µL do reagente de transfecção DharmaFECT[®] (Dharmacon RNAi *Technologies*) e mantido à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse tempo, o conjunto siRNA + DharmaFECT foi adicionado ao poço contendo as células e deixados a 37°C e 5% CO₂ durante 4 horas. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e deixado a 37°C, 5% CO₂ durante 3 dias.

Após esse período, o meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS. A extração de RNA foi feita com 500 µL de TriReagent[®] segundo o protocolo padrão, utilizando clorofórmio, álcool isopropílico e etanol absoluto. O RNA extraído foi quantificado em *NanoDrop* (*Thermo Scientific*[®]) a 260 e 280nm e o mRNA da KRAS quantificado por qRT-PCR.

3.20 Manipulação do microRNA 486-5p:

Para ensaio funcional da manipulação do miRNA486-5p foram utilizados oligos de RNA modificados microRNAVana[®] *Mimic* e *Inhibitors* (Invitrogen[®]), os quais foram transfectados segundo os protocolos abaixo.

3.20.1 Inibição da expressão do miR486-5p:

Para a inibição, as células foram cultivadas em placas de 9cm² até atingirem confluência mínima de 80%. Para transfecção foi utilizado oligo de inibição do miRNA 486-5p (*antimicroRNA 486-5p*) na concentração final de 50 nM e 3 µL do reagente de transfecção DharmaFECT (Dharmacon[®]), que foram incubados conjuntamente em meio RPMI sem soro por 20 minutos. O coquetel de transfecção foi então aplicado às células e as mesmas foram incubadas *overnight* a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte o meio foi retirado e adicionado meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino.

3.20.2 Indução da expressão do miR486-5p:

Para superexpressão do miRNA486-5p houve a transfecção com oligo de superexpressão (*microRNA 486-5p mimic*) nas concentrações finais de 5 nM e 50 nM seguindo o mesmo protocolo descrito para inibição.

3.21 Ensaios celulares:

3.21.1 Ensaio de viabilidade celular com brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT):

Em todos ensaios de MTT, 10⁴ células foram plaqueadas por poço de placa de 96 poços em respectivo meio de cultura e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ *overnight*. No dia seguinte, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e carenciadas com o respectivo meio contendo 0,2% de SFB por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período for adicionado 10µL de MTT (10 mg/mL) em cada poço, a placa foi embrulhada em papel alumínio e incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas. Após a

observação da formação de cristais, o meio foi retirado, 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente no escuro por 1 hora. Em seguida a placa foi lida em leitor de microplacas Eon (Biotek[®]) com o *software* Gen5 (Biotek[®]) a 600nm. Cada condição foi realizada em octuplicata técnica e duplicada experimental.

3.21.2 Ensaio de formação de colônia:

Em todos os ensaios de formação de colônia 500 células foram plaqueadas em placa de 20 cm² e mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO₂ por 12 dias, com troca de meio a cada 2-3 dias. Após esse período, as células foram fixadas com formaldeído 10%, coradas com cristal violeta e o número de colônias contadas. Todas as condições foram realizadas em duplicata técnica e experimental.

3.21.3 Curva de crescimento:

Foram plaqueadas 7×10^4 células em cada poço de placa de 6 poços com respectivo meio de cultura e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 12 dias, com troca de meio a cada 2-3 dias. No dia de coleta, o meio foi retirado, as células lavadas com PBSA e descoladas com 400 μ L tripsina 0,1%. Em seguida as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBSA e o volume total foi adicionado a um tubo *ependorf* contendo 100 μ L de formaldeído 37% para fixação. As células foram mantidas em geladeira e contadas em contador *Beckman Z2* (Beckman Coulter[®]). Todas condições foram realizadas em duplicata técnica e experimental.

3.21.4. Ensaio de proliferação por timidina tritiada:

10^4 células foram plaqueadas em seu respectivo meio de cultura em uma placa de 96 poços. No dia seguinte os poços foram lavados com PBS e 100 μ L de meio com 0,2% de SFB foram adicionados a cada poço. Após 24 horas, houve troca para o respectivo meio de cultura na presença de 10% de SFB e, após 6 horas, 0,25 μ Ci/mL de timidina tritiada foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram, então, lavadas com PBS, soltas com 100 μ L de tripsina 0,1% e submetidas ao sistema *Cell Harvester*, o qual realiza a lise celular e prende o DNA em um filtro de lã de vidro. A cada fragmento individual de lã de vidro foi adicionado 400 μ L de líquido de cintilação e a amostra lida em cintilador automático (*Tri-Carb 2910TR*, *Perkin-Elmer*[®]). Todas condições foram realizadas em octuplicata técnica e duplicata experimental.

3.22 Estatística

As análises de qRT-PCR e ensaios celulares foram feitas com auxílio do programa *GraphPad Prism* 5.0, com os valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Foi utilizado o teste *t-student* para as comparações entre os grupos, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Nos experimentos de análise do microarranjo, os dados gerados foram normalizados e analisados pelo método *Lowess* ou SVR (Fujita *et al.*, 2006) com correção por FDR (*false discovery rate*), sendo o microRNA detectado em no mínimo 3 dos 4 arrays. Na metanálise foi utilizado modelo de *Random effects* e normalização pelo método de *Lowess*, sendo as análises realizadas no programa R versão 2.5.1, utilizando *p-value* com correção por FDR.

4. RESULTADOS

4.1 Geração de reagentes e padronização de ensaios

4.1.1 Determinação da concentração e eficiência dos pares de primers

De forma semelhante ao brometo de etídeo, o *Sybr Green* utilizado nas reações de PCR em tempo real tem a propriedade de se intercalar entre regiões de dupla fita de DNA, por isso é importante realizar o controle da reação a fim de minimizar interferentes. Os *primers* foram desenhados levando em conta propriedades relevantes, como formação de dímeros e *hairpins*, o que poderia causar interferência na reação.

Diferentes concentrações de *primers* foram testadas para determinar a ideal, ou seja, a que apresentou menor ciclo *threshold* e um único pico na curva de dissociação devido à inexistência de interferentes anteriormente citados. Como exemplo, mostramos abaixo a determinação da concentração do par de *primers* PTEN, demonstrando que a concentração ótima é de 600nM, e que apresentava somente um pico na curva de dissociação, não apresentando amplificação inespecífica.

Figura 9: Resultado de qRT-PCR para PTEN. a. Ciclo *threshold* nas concentrações de 200, 400, 600 e 800nM; b. Curva de dissociação do produto de amplificação nas dadas concentrações.

A eficiência de amplificação é um fator que foi utilizado para o cálculo final da expressão por qRT-PCR. A concentração ótima de cada par de *primers*, além de sua eficiência de amplificação está demonstrada na tabela abaixo:

Tabela 10: Concentração e eficiência dos pares de *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR

Par de primer	Concentração	Eficiência
KRAS	200nM	144,8%
PTEN	600nM	114,2%
Foxo1	400nM	94,8%
CADM1	800nM	123,2%
CENPJ	600nM	106,6%
MACF1	600nM	113,3%
BTAF1	600nM	125%
GAPDH	800nM	143,6%
Actina	400nM	117,3%
rRNA18S	200nM	135,3%
microRNA 486-5p	200nM	155,6%
microRNA 19b	400nM	86,25%
Let7b	400nM	114,9%
microRNA 720	200nM	80,47%
microRNA 130	200nM	125,26%
microRNA 139-3p	400nM	102,11%
Snord44	200nM	141,4%
Snord47	200nM	116%
Snord48	200nM	112%

A partir destes dados, toda reação de qRT-PCR foi realizada com a concentração de *primer* ótima, e a eficiência da amplificação foi utilizada para cálculo da expressão relativa. A eficiência acima de 100% indica que o ciclo *threshold* de amostras com o dobro da concentração de cDNA apresentou uma variação menor do que 1. Os dados de eficiência dos *primers* foram utilizados para normalização e cálculos.

4.1.2 Geração e caracterização de células H358 e A549 expressando shRNAs para inibição induzível da expressão de KRAS

Para verificar se existe uma relação de causalidade entre a expressão de KRAS e a expressão de miRNAs de interesse, nós utilizamos as linhagens pulmonares portadoras da forma oncogênica da KRAS H358 e A549 para gerar linhagens estáveis com inibição induzível por doxíciclina da expressão de KRAS. A inibição da expressão de KRAS foi feita por shRNA via lentivírus, utilizando-se 2 *hairpins* distintos, como descrito nos métodos. Como controle foi utilizado um shRNA sem homologia a genes humanos (NSCtle).

Após a produção, coleta e quantificação das partículas lentivirais foi obtida uma concentração praticamente constante de $6,6 \times 10^7$ partículas virais/mL em todas as construções virais produzidas (shKRAS1, shKRAS2 e shNSCtle), indicando que a eficiência de produção viral foi independente do vetor de interesse utilizado.

4.1.3 Determinação da concentração efetiva de puromicina

Para realizar a seleção das células transduzidas com shRNA para inibição de KRAS e shRNA controle e manter uma pressão seletiva constante, estas foram mantidas em cultura com meio contendo o antibiótico puromicina. Diversas concentrações foram testadas para determinar a dose mínima suficiente para matar a totalidade das células em período de 10 dias. Esta concentração foi denominada de concentração efetiva de puromicina. Tanto para a linhagem A549 (Figura 10) quanto para a linhagem H358 (dados não mostrados) a concentração efetiva de puromicina foi de 0,5 µg/mL.

Figura 10: Determinação de concentração efetiva de puromicina em células A549. a. Meio na ausência de puromicina; b. Meio contendo puromicina na concentração de 0,25 µg/mL; c. Meio contendo puromicina na concentração de 0,5 µg/mL. Aumento de 40x, após 10 dias.

Esta concentração de puromicina foi então utilizada para a seleção das células transduzidas e foi mantida sempre no meio de cultura para garantir a presença das sequências oriundas do vetor lentiviral na célula.

4.1.4 Determinação da concentração efetiva de doxíciclina e da cinética temporal para indução

Como a expressão do shRNA, bem como da proteína fluorescente vermelha (*Red Fluorescent Protein* ou turboRFP) presentes no vetor lentiviral é induzível por doxíciclina, nós realizamos uma cinética de concentração de doxíciclina para determinar a quantidade capaz de induzir a expressão da proteína repórter RFP de forma eficiente. Nós observamos na linhagem A549 níveis de fluorescência diretamente proporcionais à concentração de doxíciclina (Figura 11, painel A). Resultados semelhantes foram obtidos para a linhagem H358 (dados não mostrados). A concentração limite do teste, de 2 µg/mL, foi a que apresentou maior fluorescência em ambas as linhagens, e foi então a utilizada para posteriores induções.

Após a determinação da concentração de doxíciclina de 2 µg/mL a ser usada para a indução da expressão dos shRNAs foi realizada um cinética temporal com o intuito de determinar o tempo mínimo de indução da proteína marcadora turboRFP nas

células transduzidas, observadas por microscopia de fluorescência. Na linhagem A549 (Figura 11, Painei B) e H358 (dados não mostrados) foi possível observar uma relação direta da intensidade da fluorescência e tempo de cultura.

Figura 11: Cinética de concentração e temporal de doxiciclina em células A549. Painei A) Linhagem A549 após indução com doxiciclina em diversas concentrações, pelo período de 5 dias, com troca de meio diário; a. 0,25 µg/mL; b. 0,5 µg/mL; c. 1 µg/mL; d. 1,5 µg/mL; e. 2 µg/mL; aumento de 40x. Painei B) Linhagem A549 após a seleção, com indução com doxiciclina na concentração de 2 µg/mL; a. 1 dia de indução; b. 3 dias de indução; c. 5 dias de indução aumento de 40x.

Com esta cinética conclui-se que o tempo mínimo para atingir um nível eficiente de indução da expressão em ambas as linhagens é de 5 dias, sendo que em todos os experimentos seguintes foram utilizados tempos iguais ou superiores a este.

4.1.5 Seleção de clones

Como observado na figura anterior, a expressão da proteína turboRFP no *pool* celular foi de intensidade variável (Figura 11, painei B), mesmo as células estando sob seleção de puromicina. Por isso procedeu-se a seleção de clones nas linhagens A549 e

H358 para que a expressão do shRNA fosse alta e uniforme em toda a população clonal utilizada, a fim de evitar possível heterogeneidade da população. Os clones obtidos que apresentaram expressão mais alta e uniforme da proteína turboRFP após a administração de doxíciclina foram avaliados quanto à eficiência de inibição de expressão de KRAS. O clone de cada linhagem e construção que apresentou menor expressão de KRAS foi selecionado para futuros ensaios, sendo para a linhagem A549 os clones 1 (shKRAS1) e 3 (shKRAS2), enquanto para a linhagem H358 foram clones 3 (shKRAS1) e 1 (shKRAS2) (Figura 12). Foi possível observar que a expressão relativa de KRAS nos clones de células A549 e H358 selecionados apresentou expressão menor do que 50% quando na presença de doxíciclina em relação à ausência e que nas linhagens NSCtle foi praticamente constante (razão +DOX/-DOX de aproximadamente 1), demonstrando que somente a doxíciclina não é responsável pela inibição da KRAS (Figura 12).

Figura 12: Avaliação da eficiência de inibição da expressão de KRAS nos clones oriundos das linhagens A549 (A) e H358 (B). A expressão KRAS foi avaliada nas células indicadas acima por PCR quantitativo em tempo real. GAPDH e actina foram usados como controles endógenos para normalização da expressão (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa *Genorm*). A expressão de KRAS está representada pela razão entre a expressão na presença e a expressão na ausência de doxíciclina (+DOX / -DOX), sendo esta última normalizada para 1 em todas as amostras. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculadas pelo teste t de amostras não pareadas das amostras expressando shRNA para KRAS comparadas a amostras expressando o shRNA controle.

4.1.6 Validação da indução da expressão de KRAS por doxíciclina na linhagem H1703-G12V

A expressão de KRAS nas linhagens H1703 foi determinada por qRT-PCR em pontos de 1, 4, 7, 10 e 12 dias na presença de doxíciclina (Figura 13). Pode-se observar que a expressão de KRAS foi significativamente superior na linhagem H1703 G12V na presença de doxíciclina quando comparada tanto a G12V na ausência de doxíciclina quanto com TrexB na presença de doxíciclina, confirmando que o modelo de superexpressão de KRAS oncogênica em células pulmonares H1703 G12V é funcional e que a presença de doxíciclina no meio das células controles não é capaz de elevar a expressão deste oncogene.

Figura 13: Avaliação da eficiência de indução da expressão de KRAS na linhagem H1703-G12V. A expressão KRAS foi avaliada nas linhagens H1703-TrexB e H1703-G12V por PCR quantitativo em tempo real. GAPDH foi usado como controle endógeno para normalização da expressão. Doxi) células tratadas com 2 ug/mL de doxíciclina pelos tempos indicados; SEM) células não tratadas com doxíciclina. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculadas pelo teste t de amostras não pareadas quando comparamos as amostras induzidas com doxíciclina com as amostras não induzidas.

4.2 Identificação do microRNA 486-5p como alvo de KRAS em células pulmonares

4.2.1 Avaliação da expressão do microRNA486-5p e seus alvos nas linhagens primárias

Devido ao longo processo de importação e agendamento do *scanner* para leitura das lâminas dos experimentos de microarranjo de miRNAs, nós resolvemos investigar inicialmente o miRNA486-5p como um potencial alvo da forma oncogênica de KRAS. A razão da escolha deste microRNA se deveu à observação de uma correlação positiva entre a expressão deste miRNA e a presença de mutações oncogênicas em KRAS em pacientes com câncer de cólon (Ragusa *et al.*, 2010). Inicialmente nós investigamos a expressão deste miRNA nos modelos celulares pulmonares e pancreáticos com presença e ausência do oncogene KRAS (HPDE-KRAS/HPDE e SAKRAS/SALEB). Como pode ser observado na figura 14, houve um aumento de 5,7 vezes na expressão do miRNA486-5p na linhagem primária pulmonar SAKRAS em relação a SALEB ($p > 0,01$). Já a na linhagem pancreática HPDE não houve diferença na expressão deste microRNA, demonstrando que este microRNA pode estar sendo regulado pelo oncogene KRAS no contexto pulmonar e não no pancreático.

Figura 14: Expressão de microRNA486-5p nas linhagens primárias de pulmão (A) e pâncreas (B), ambas imortalizadas na presença (SAKRAS e HPDE-KRAS, respectivamente) e ausência (Saleb e HPDE, respectivamente) de *KRAS* oncogênico. A expressão do miRNA486-5p foi avaliada nas células

indicadas acima por PCR quantitativo em tempo real. Os RNAs não codificadores Snord47 e Snord48 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa *Genorm*). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) calculadas pelo teste t de amostras não pareadas.

Em seguida, para avaliar se esta expressão aumentada do miRNA486-5p nas células SAKRAS poderia ser biologicamente relevante, nós resolvemos avaliar se este aumento estava correlacionado com uma menor expressão de mRNAs alvos do microRNA486-5p.

Para escolher os alvos a serem avaliados nós utilizamos diferentes programas de predição de alvos que utilizam algoritmos distintos e escolhemos os alvos que apresentavam maior *score* nestes programas.

Tabela 11: Alvos do microRNA 486-5p gerados por diversos programas, os quais foram utilizados para determinação da funcionalidade deste microRNA.

microRNA.org ¹	mirWalk ²	DIANA ³	TargetScan ⁴
BTAF1	DBF4	MACF1	FoxO1
CADM1		FoxO1	PTEN
PTEN		PTEN	

1. www.microrna.org;

2. www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/

3. <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>;

4. www.targetscan.org

Interessantemente, dos alvos preditos acima, FoxO1 e PTEN já foram validados experimentalmente como alvos do miRNA486-5p em outro contexto (Small *et al.*, 2010). Ao avaliar estes alvos, nós observamos que os alvos CADM1, CENPJ, MACF1, FoxO1 e PTEN apresentaram uma expressão significativamente menor ($p < 0,05$) nas linhagens SAKRAS em relação a SALEB (Fig. 15). O alvo BTAF não apresentou diminuição estatisticamente significativa. Já na linhagem HPDE-KRAS, como

esperado, não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão dos alvos do miRNA486-5p. O alvo DBF4 não apresentou amplificação em nenhuma das quatro linhagens analisadas.

Figura 15: Expressão de alvos do microRNA 486-5p nas linhagens primárias de pulmão (A) e pâncreas (B), ambas imortalizadas na presença (SAKRAS e HPDE KRAS, respectivamente) e ausência (Saleb e HPDE, respectivamente) de *KRAS* oncogênico. A expressão dos alvos foi avaliada nas células indicadas acima por PCR quantitativo em tempo real. Os genes GAPDH e actina foram usados como controles endógenos para normalização da expressão (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculadas pelo teste t de amostras não pareadas.

4.2.2 Avaliação da expressão do microRNA486-5p e seus alvos nas linhagens de câncer de pulmão com inibição da expressão de *KRAS*

Para verificar se existe uma relação de causalidade nesta correlação observada entre *KRAS* e o miRNA486-5p (e seus alvos), nós inibimos a expressão de *KRAS* por interferência de RNA em linhagens pulmonares tumorais A549 e H358, as quais possuem mutação do gene *KRAS*, usando duas abordagens diferentes: 1. Transfecção transitória com siRNA (“*small interfering RNA*”) para inibição de *KRAS*; 2. Transdução estável com dois vetores lentivirais de inibição, os quais apresentavam sequências

distintas de shRNA (“*short hairpin RNA*”) para “*knockdown*” da KRAS, sendo que a expressão do shRNA é induzível por doxíciclina.

Através da primeira abordagem, nós transfectamos as células A549 e H358 com um *smartpool* contendo 4 sequências inibitórias para a KRAS. Com isso nós conseguimos uma redução de expressão da KRAS de 95% e 90% nas linhagens A549 e H358, respectivamente (Fig. 16A). Esta redução observada na expressão de KRAS nestas linhagens resultou em uma redução significativa da expressão do miRNA486-5p (Fig. 16B) de 38% na linhagem A549 e 39% na linhagem H358.

Figura 16: A inibição da expressão da KRAS por siRNA leva a uma redução na expressão do microRNA 486-5p. A expressão KRAS (painel A) e do microRNA486-5p (painel B) foi avaliada nas linhagens A549 e H358 por PCR quantitativo em tempo real. GAPDH e actina foram usados como controles endógenos para normalização da expressão de KRAS e Snord44 e 47 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão do miRNA486-5p (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm). siRNA) células transfectadas com siRNA *smartpool* contendo 4 sequências inibitórias distintas para KRAS; siCtle) células transfectadas com um siRNA sem homologia a genes humanos conhecidos. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$, calculadas pelo teste t de amostras não pareadas (comparação siRNA x siCtle).

Através da segunda abordagem, nós utilizamos os clones selecionados das linhagens A549 e H358 com inibição induzível de KRAS para avaliar se a inibição de KRAS levaria a uma inibição da expressão do miRNA486-5p. Neste caso foi possível avaliar o efeito de duas sequências de shRNA inibitórias independentemente. Interessantemente, foi possível observar que os clones de A549 e H358 selecionados apresentavam na presença de doxíciclina e, conseqüentemente menor expressão de

KRAS (figura 12), expressão significativamente menor de miRNA486-5p independentemente do shRNA expresso (figura 17). Este resultado corrobora o resultado de inibição transiente de KRAS nestas linhagens e o resultado observado nas linhagens primárias pulmonares Saleb e SAKRAS.

Figura 17: A inibição da expressão da KRAS por doxíciclina leva a uma redução na expressão do microRNA486-5p. A expressão de microRNA486-5p em H358 (painel A) e A549 (painel B) por PCR quantitativo em tempo real na presença (Doxi) e ausência (Sem) de doxíciclina. Snord47 e 48 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão do miRNA486-5p (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm). Doxi) células mantidas em cultura com 2 µg/mL de doxíciclina; Sem) Células mantidas em cultura sem doxíciclina. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$, calculadas pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Doxi x Sem).

Para validar a funcionalidade do miRNA486-5p neste contexto, nós avaliamos a expressão dos seus alvos FoxO1 e PTEN em função da inibição de KRAS nos modelos celulares com inibição induzível de KRAS avaliados acima. Pode-se observar, em ambas as linhagens e com as duas sequências distintas de shRNA, que a presença de doxíciclina leva a uma diminuição da expressão de RAS e a um aumento da expressão de FoxO1. Estas alterações não são observadas nas células controle (NSCtle) tratadas com doxíciclina. Não observamos diferenças na expressão de PTEN em nenhuma das condições analisadas.

Figura 18: A inibição da expressão de KRAS induz um aumento da expressão de FoxO1. Western blotting de células A549 (A) e H358 (B) com (+) ou sem (-) indução da inibição de KRAS por doxíciclina (Doxi). shKRAS1) células com potencial de expressar o shRNA1 para KRAS; shKRAS2) células com potencial de expressar o shRNA2 para KRAS; NSCtle) células com potencial de expressar o shRNA sem homologia a genes humanos. As proteínas detectadas pelos anticorpos estão indicadas. Actina foi usada como controle de *loading*.

4.2.3 Avaliação da expressão do microRNA486-5p e seus alvos em linhagem pulmonar com expressão induzível da forma oncogênica da KRAS

Após a observação de que as linhagens pulmonares primárias na presença de KRAS oncogênica apresentam maior expressão de miR486-5p e de que linhagens tumorais pulmonares com *knockdown* de KRAS apresentavam uma menor expressão deste mesmo microRNA, foram realizados experimentos de ganho de função de KRAS para avaliar se a indução da expressão da forma oncogênica da KRAS levaria a um aumento da expressão deste miRNA. Para tanto nós utilizamos a linhagem pulmonar H1703 (que não é portadora de mutação em KRAS), cuja expressão da forma oncogênica de KRAS pode ser induzida por doxíciclina. Neste modelo nós observamos que a indução da expressão de KRAS por doxíciclina na linhagem H1703-G12V leva a um aumento da expressão do miRNA486-5p em relação às mesmas células na ausência de doxíciclina. Este efeito não é mediado simplesmente pela presença de doxíciclina no meio, uma vez que a linhagem H1703 TrexB, mesmo na presença de doxíciclina, não apresentou aumento de expressão do miRNA486-5p.

Figura 19: A indução da expressão da KRAS por doxíciclina na linhagem H1703 leva a aumento na expressão do microRNA486-5p. A expressão do microRNA486-5p foi avaliada nas linhagens H1703-TrexB e H1703-G12V por PCR quantitativo em tempo real na presença (Doxi) e ausência (Sem) de doxíciclina. Snord47 e 48 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão do miRNA486-5p (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm). O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Doxi x Sem).

Esse resultado, juntamente com os anteriormente observados, permite identificar que a expressão de KRAS oncogênica em células pulmonares leva a um aumento na expressão do miRNA486-5p, e mais do que isso, uma regulação causal, no qual a modulação da expressão deste oncogene também é acompanhado por um mesmo perfil de expressão do miRNA486-5p. Para avaliar os alvos do miRNA486-5p na linhagem H1703, nós primeiramente determinamos que o tratamento com doxíciclina da linhagem H1703-G12V leva à indução da expressão da KRAS oncogênica, detectada através do tag HA (Fig. 20A), enquanto as células controle H1703-TrexB não expressam esta oncoproteína, mesmo na presença de doxíciclina. Interessantemente, de forma semelhante ao observado nas linhagens A549 e H358, a expressão de FoxO1 foi inversamente proporcional a expressão de KRAS, sendo que a linhagem H1703-G12V na presença de doxíciclina apresentou maior expressão de KRAS e menor de FoxO1 em relação a mesma linhagem na ausência de doxíciclina, fato não observado na linhagem

controle H1703-TrexB, enquanto PTEN não apresentou diferença na sua expressão (figura 20B).

Figura 20: A indução da expressão de KRAS reduz a expressão de FoxO1. Western blotting de células H1703-TrexB e H1703-G12V com (+) ou sem (-) indução da expressão de KRAS por doxíciclina. A) As células foram tratadas pelos tempos indicados com doxíciclina e a expressão de KRAS avaliada por Western Blotting com anticorpo anti-HA. B) As células H1703-TrexB e H1703-G12V foram tratadas por 72h com doxíciclina e a expressão de FoxO1 e PTEN avaliada por Western Blotting. Actina foi usada como controle de *loading*.

Os resultados mostrados até aqui demonstram que o microRNA 486-5p tem sua expressão alterada de forma dependente da expressão de KRAS nas linhagens pulmonares estudadas. Os nossos resultados também demonstram que o fator de transcrição FoxO1, um alvo validado do miRNA486-5p também tem sua expressão regulada pela KRAS oncogênica, apresentando neste caso uma correlação inversa de expressão. Estes resultados estabeleceram o miRNA486-5p como alvo do oncogene KRAS em células tumorais pulmonares e serviram de base para a análise funcional deste microRNA.

4.3. Avaliação funcional do microRNA486-5p

Tendo em vista a relação direta e de causalidade entre a expressão de KRAS e miRNA486-5p, e inversa com o supressor de tumor FoxO1, nós decidimos investigar o papel deste microRNA na manutenção de algumas propriedades oncogênicas celulares reguladas por KRAS, ou seja, se este apresentava participação direta na transformação maligna induzida por KRAS.

Para tanto, o primeiro passo foi determinar o papel do oncogene KRAS sobre algumas propriedades oncogênicas celulares. Isto se fez necessário, pois sabe-se que algumas linhagens perdem a dependência do oncogene transformador em cultura.

4.3.1 Experimentos de análise funcional do knockdown e superexpressão de KRAS

Para a confirmação de que as linhagens A549 e H358 são dependentes do oncogene KRAS, nós utilizamos as linhagens estáveis geradas com *knockdown* induzível de KRAS em experimentos de viabilidade celular por MTT e formação de colônia.

No MTT, quando comparado a células expressando o shRNA controle (NSCtle), as células expressando o shRNA1 e 2 para KRAS apresentaram uma diminuição de 21% e 37% na viabilidade celular na linhagem A549 e 30% e 26% na linhagem H358 (figura 21).

Figura 21: A inibição da expressão de KRAS reduz a viabilidade celular. As células A549 (A) ou H358 (B) foram induzidas a expressar os shRNAs indicados acima com 2 µg/mL de doxíciclina por 5 dias e a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT. shKRAS1) células com potencial de expressar o shRNA1 para KRAS; shKRAS2) células com potencial de expressar o shRNA2 para KRAS; NSCtle) células com potencial de expressar o shRNA sem homologia a genes humanos. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação shKRAS x NSCtle).

No ensaio de formação colônia, observamos que, quando comparado a células expressando o shRNA controle (NSCtle), as células expressando o shRNA1 e 2 para KRAS apresentaram uma diminuição de 55% e 60% no número de colônias na linhagem A549, e de 55% e 67% na linhagem H358 (figura 22).

Figura 22: A inibição da expressão de KRAS reduz a clonogenicidade celular. As células A549 (A) ou H358 (B) foram induzidas a expressar os shRNAs indicados acima com 2 µg/mL de doxíciclina por 5 dias e a clonogenicidade celular foi avaliada através do ensaio de formação de colônias. C) Imagem representativa de 3 experimentos independentes. shKRAS1) células com potencial de expressar o shRNA1 para KRAS; shKRAS2) células com potencial de expressar o shRNA2 para KRAS; NSCtle) células com potencial de expressar o shRNA sem homologia a genes humanos. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação shKRAS x NSCtle).

Para a confirmação de que a indução da expressão da forma oncogênica da KRAS aumenta as propriedades oncogênicas das células H1703, nós realizamos os ensaios de curva de crescimento e de formação de colônia.

Em todos os ensaios as linhagens acima citadas foram comparadas na presença e ausência de doxíciclina. No experimento de curva de crescimento, a linhagem H1703-G12V induzida por doxíciclina apresentou um crescimento 35% superior a não induzida

e a linhagem H1703 TrexB induzida apresentou crescimento 10% inferior a não induzida (figura 23).

Figura 23: A indução da expressão de KRAS promove o crescimento celular. Curva de crescimento para células H1703 G12V (A) ou H1703 TrexB (B) induzidas (Doxi) ou não (Sem) com doxiciclina 2 µg/mL pelos tempos indicados. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Doxi x Sem).

O ensaio de formação de colônia realizado com as linhagens H1703 demonstraram um aumento significativo de 85% no número de colônias na linhagem H1703 G12V na presença de doxiciclina em relação à ausência de doxiciclina, enquanto a linhagem H1703-TrexB apresentou um aumento de somente 2% (figura 24).

Figura 24: A indução da expressão de KRAS promove a clonogenicidade celular. Ensaio de formação de colônias para células H1703 G12V ou H1703 TrexB induzidas (Doxi) ou não (Sem) com doxiciclina 2 µg/mL. A) Imagem representativa de 3 experimentos independentes. B) Quantificação das colônias formadas. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Doxi x Sem).

Os resultados acima mostram que a inibição da expressão de KRAS nas linhagens pulmonares A549 e H358 é capaz de reduzir algumas propriedades oncogênicas celulares, enquanto a superexpressão de KRAS em células H1703 G12V aumenta as propriedades oncogênicas celulares. Portanto, como estas linhagens são funcionalmente afetadas por alterações na expressão da oncoproteína KRAS, elas constituem modelos válidos para se estudar a relevância funcional do miRNA486-5p para o fenótipo maligno.

4.3.2. Experimentos de análise funcional do microRNA 486-5p

Visto a relação direta e de causalidade entre a expressão de KRAS e microRNA486-5p, e inversa com o supressor de tumor FoxO1, nós decidimos investigar o papel deste microRNA na manutenção das propriedades oncogênicas celulares, ou seja, se este apresentava participação direta na transformação maligna induzida por KRAS.

Para avaliar o impacto funcional do miRNA486-5p sobre o fenótipo maligno celular nós realizamos experimentos tanto de inibição de sua expressão quanto de super-expressão. Para a inibição nós transfectamos as linhagens de interesse transientemente com um oligo inibitório (*antimicroRNA* ou *antimiR*) com sequência complementar à sequência do microRNA. Para induzir a expressão do miRNA486-5p nós transfectamos as linhagens de interesse com oligo dupla-fita indutório (*mimic*), com sequência idêntica à do microRNA. Estas manipulações foram realizadas de acordo com a expressão de KRAS oncogênica nas linhagens, sendo que a inibição do miRNA486-5p foi realizada em células que expressam a KRAS oncogênica e a super-expressão em linhagens na qual a expressão do oncogene foi inibida ou estava ausente.

4.3.2.1. A inibição da expressão do microRNA 486-5p reduz as propriedades oncogênicas celulares

Primeiramente nós realizamos a inibição da expressão do miRNA486-5p nas linhagens H358 e A549, portadoras da forma oncogênica da KRAS. Como pode ser visto na figura 29, a transfecção com oligo inibitório (*antimiR*) foi eficiente, levando a quase 100% de inibição da expressão do miRNA486-5p em 24 horas. Embora esta inibição seja transiente, com os níveis do microRNA486-5p sendo re-estabelecidos após 12 dias, esta inibição foi suficiente para resultar tanto em uma diminuição da viabilidade celular, quanto da capacidade de formação de colônias nestas linhagens (figura 25). Especificamente, nós observamos uma redução de viabilidade nas células A549 e H358 de 35% e 23%, e uma diminuição da capacidade de formação de colônias de 26% e 30%, respectivamente.

Figura 25: A inibição da expressão do microRNA486-5p resulta em uma diminuição das propriedades oncogênicas de células pulmonares portadoras do oncogene KRAS. As linhagens celulares A549 e H358 foram transfectadas com 50 nM oligo inibitório do microRNA486-5p (antimiR) ou oligo controle sem complementaridade a microRNAs conhecidos (AntimiR Ctle). A) A expressão do microRNA486-5p foi avaliada nas linhagens transfectadas por PCR quantitativo em tempo real pelos tempos indicados após a transfecção. Snord47 e 48 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão do miRNA486-5p (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm). B) A viabilidade das células A549 ou H358 foi avaliada 72h após a transfecção através do ensaio de MTT. C) A clonogenicidade das células A549 e H358 transfectadas foi avaliada através do ensaio de formação de colônias. Esquerda) Quantificação das colônias formadas. Direita) imagens representativas de 3 experimentos independentes. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação AntimiR x AntimiR Ctle).

Para corroborar estes resultados nós realizamos a inibição da expressão do miRNA486-5p na linhagem H1703-G12V induzida com doxíciclina (e que portanto também expressa a KRAS oncogênica). Como pode ser visto na figura 26, a inibição da

expressão do microRNA também foi eficiente nesta linhagem com níveis de inibição semelhantes aos observados para as células A549 e H358. Mais importante, a inibição da expressão do miRNA486-5p nesta linhagem também levou a uma redução de 24% da viabilidade celular (figura 26B) e a uma diminuição de 30% na capacidade de formação de colônias em relação ao *antimiR* controle (figura 26C). Interessantemente, no caso do ensaio de formação de colônias, a inibição da expressão do miRNA486-5p na linhagem H1703-TrexB cultivadas na presença de doxíciclina não afetou a capacidade de formação de colônias (figura 26C), sugerindo desta forma que o efeito da inibição do miR486-5p depende da presença de KRAS.

Figura 26: A inibição da expressão do microRNA 486-5p resulta em uma diminuição das propriedades oncogênicas de células pulmonares H1703 expressando a KRAS oncogênica de forma induzível. As células H1703-G12V ou H1703-TrexB foram transfectadas com 50 nM do oligo inibitório do microRNA486-5p (*antimiR*) ou oligo controle sem complementaridade a microRNAs conhecidos (*AntimiR Ctle*). A) As células H1703-G12V foram induzidas a expressar a forma oncogênica de KRAS com doxíciclina 2 µg/mL e a expressão do microRNA486-5p foi avaliada nas linhagens transfectadas e induzidas por PCR quantitativo em tempo real pelos tempos indicados após a transfecção. Snord47 e 48 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão do miRNA486-5p (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm). B) As células H1703-G12V foram induzidas a expressar a forma oncogênica de KRAS com doxíciclina 2 µg/mL e a viabilidade foi avaliada 72h após a transfecção através do ensaio de MTT. C) As linhagens celulares H1703-G12V e TrexB foram tratadas (doxi) ou não (Sem) com doxíciclina 2 µg/mL e a formação de colônias foi avaliada. Esquerda) Quantificação das colônias formadas. Direita) Imagens representativas de 3

experimentos independentes. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação AntimiR x AntimiR Ctle).

4.3.2.2. A superexpressão do microRNA 486-5p aumenta as propriedades oncogênicas celulares

Uma vez que os estudos anteriores de perda de função mostraram que a inibição do miRNA486-5p reduz algumas propriedades oncogênicas de células portadoras de KRAS oncogênica, nós resolvemos realizar estudos de ganho de função para avaliar se a indução da expressão do miRNA486-5p poderia contribuir para aumentar a oncogenicidade celular. A superexpressão do miRNA foi realizada com concentrações finais de 5 η M e 50 η M do miRNA486-5p *mimic* ou miRNA *mimic* controle tanto em células H358 *knockdown* para KRAS quanto em células H1703-G12V na ausência de doxiciclina, condições em que ambas apresentam níveis baixos ou ausentes da forma oncogênica da KRAS (figuras 12 e 13). Estas duas concentrações foram testadas para avaliar qual delas levaria a um aumento fisiologicamente relevante da expressão do miRNA486-5p. Considerando-se que nós observamos uma maior expressão do miRNA486-5p em células portadoras de KRAS oncogênica, que variava de aproximadamente 2 vezes a 10 vezes em relação às células controle com expressão reduzida ou ausente da forma oncogênica de KRAS (ver figuras 16 e 17), nós concluímos que ambas as concentrações de oligo *mimic* utilizadas levam a uma expressão supra-fisiológica deste microRNA (maior que 20 vezes) tanto na linhagem H358 quanto na linhagem H1703-G12V (figura 27). Esta superexpressão, no entanto, é transiente, sendo revertida aos níveis iniciais 10 dias após a transfecção com o oligo *mimic*.

Apesar da expressão supra-fisiológica do miRNA486-5p, nós resolvemos não testar concentrações inferiores do oligo *mimic*, pois, apesar de termos usado uma

concentração de oligo 10 vezes menor que a concentração recomendada pelo fabricante (de 50 nM), a diferença na indução do miRNA486-5p não foi 10 vezes menor, não havendo portanto uma correlação direta entre a concentração de oligo usada para transfecção e o acúmulo de miRNA486-5p nas células. Finalmente, nós achamos que o uso de uma concentração de oligo menor que 5 nM poderia gerar muita variabilidade experimental.

Figura 27: Análise da expressão do microRNA 486-5p após a transfecção com oligo mimic. As células H358 com inibição induzível da KRAS (A) e as células H1703-G12V (B) foram transfectadas com 5 nM ou 50 nM de oligo estimulatório do microRNA 486-5p (mimic) ou oligo controle sem homologia a microRNAs conhecidos (Mimic Ctle). Antecedendo á transfecção, as células H358 foram induzidas a expressar os shRNAs1 ou 2 para KRAS ou shRNA controle com 2 µg/mL de doxíciclina por 5 dias. As células H1703-G12V foram transfectadas e mantidas na ausência de doxíciclina. A expressão do microRNA486-5p foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real pelos tempos indicados após a transfecção e os valores estão expressos como a razão da expressão das células transfectadas com oligo mimic em relação as células transfectadas com oligo mimic Ctle (mimic/ mimic Ctle). Snord47 e 48 foram usados como controles endógenos para normalização da expressão do miRNA486-5p (através de fatores de calibração individuais obtidos utilizando o programa Genorm).

Para contornar, pelo menos em parte, este problema nós resolvemos comparar o efeito biológico da superexpressão do miRNA486-5p, tanto em células com expressão baixa de KRAS oncogênica, quanto em células portadoras desta oncoproteína. Como pode ser visto na figura 28, a superexpressão do miRNA486-5p em células H358 expressando shRNA 1 ou shRNA 2 para KRAS, na presença de doxíciclina, levou a um aumento da viabilidade celular detectada pelo ensaio de MTT em relação às mesmas células transfectadas com oligo *mimic* controle (também na presença de doxíciclina). Na

concentração de 5 η M foi observado um aumento de 7% e 15,5% na viabilidade nas linhagens H358 induzidas a expressar o shRNA1 e 2 para KRAS, respectivamente. Na concentração de 50 η M houve um aumento de 15% e 17% na viabilidade nas linhagens H358 induzidas a expressar o shRNA1 e 2 para KRAS, respectivamente. Interessantemente, em ambos os casos, a superexpressão do miRNA486-5p na linhagem H358 induzida a expressar o shRNA controle (e que, portanto, ainda expressa níveis normais da KRAS mutante) não afetou a viabilidade celular. Este resultado indica que a presença do miRNA486-5p, mesmo em quantidades aparentemente suprafisiológicas, só tem efeito em células com baixa expressão de KRAS. Isto sugere, que apesar da concentração do miRNA486-5p ser menor nas células expressando KRAS do que nas células transfectadas com o oligo *mimic*, que esta concentração já seja saturante, e que aumentá-la acima deste nível não acarreta consequências funcionais.

Figura 28: O aumento da abundância do microRNA 486-5p resulta em um aumento da viabilidade celular em células com expressão baixa de KRAS. As células H358 foram induzidas a expressar os shRNAs1 ou 2 para KRAS ou shRNA controle com 2 μ g/mL de doxíciclina por 5 dias. Em seguida as células foram transfectadas com 5 η M ou 50 η M de oligo estimulatório do microRNA486-5p (mimic) ou oligo controle sem homologia a microRNAs conhecidos (Mimic Ctl). A viabilidade foi avaliada 72h após a transfecção através do ensaio de MTT. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Mimic x Mimic Ctl).

Resultados semelhantes foram obtidos no ensaio de formação de colônia (figura 29). A superexpressão do miRNA486-5p em células H358 e A549 com com inibição de expressão de KRAS (shRNAs1 e 2 na presença de doxíciclina) causou um aumento

significativo na capacidade de formar colônias, tanto na concentração de 5 η M quanto na concentração de 50 η M do oligo *mimic* em relação às mesmas células transfectadas com o oligo *mimic* controle. Novamente este efeito não foi observado nas células sem redução na expressão de KRAS (células expressando o shRNA NSCtle, que não possui homologia para genes humanos).

Figura 29: O aumento da abundância do microRNA 486-5p resulta em um aumento da clonogenicidade celular em células H358 com expressão baixa de KRAS. As células H358 foram induzidas a expressar os shRNAs 1 ou 2 para KRAS ou shRNA controle com 2 μ g/mL de doxíciclina por 5 dias. Em seguida as células foram transfectadas com 5 η M ou 50 η M de oligo estimulatório do microRNA 486-5p (*mimic*) ou oligo controle sem homologia a microRNAs conhecidos (*Mimic Ctle*). A clonogenicidade foi avaliada através do ensaio de formação de colônias. A) Quantificação das colônias formadas; B) Imagens representativas de 3 experimentos independentes. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Mimic x Mimic Ctle).

Para corroborar estes resultados nós também avaliamos o efeito da super-expressão do miRNA486-5p em células pulmonares tumorais que não apresentam

mutação oncogênica em KRAS. Para tanto nós utilizamos a linhagem H1703-G12V cultivadas na ausência de doxíciclina (e, portanto, na ausência de expressão de KRAS oncogênica). Quando estas células foram transfectadas com miRNA486-5p *mimic* houve um aumento de 18% e 9% na viabilidade quando comparado ao microRNA *mimic* controle nas concentrações de 50 η M e 5 η M, respectivamente (figura 30).

Figura 30: A indução da abundância do microRNA 486-5p resulta em um aumento da viabilidade celular em células H1703 na ausência de expressão da forma oncogênica da KRAS. As células H1703 G12V foram mantidas na ausência de doxíciclina durante o experimento (e portanto na ausência de expressão da KRAS oncogênica). As células foram transfectadas com 5 η M ou 50 η M de oligo estimulatório do microRNA 486-5p (*mimic*) ou oligo controle sem homologia a microRNAs conhecidos (*Mimic Ctle*). A viabilidade foi avaliada 72h após a transfecção através do ensaio de MTT. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação *Mimic* x *Mimic Ctle*).

Estes resultados foram corroborados pelo ensaio de formação de colônia, sendo que a transfecção com o miRNA486-5p *mimic* causou um aumento significativo na capacidade de formação de colônias de 61% na concentração de 5 η M e de 74% na concentração de 50 η M em relação ao *mimic* controle (figura 31).

Figura 31: Um aumento na abundância do microRNA 486-5p resulta em um aumento da clonogenicidade celular em células H1703 na ausência de expressão de KRAS oncogênica. As células H1703 G12V foram mantidas na ausência de doxomicina durante o experimento (e portanto na ausência de expressão da KRAS oncogênica). As células foram transfectadas com 5 nM ou 50 nM de oligo estimulatório do microRNA486-5p (Mimic) ou oligo controle sem homologia a microRNAs conhecidos (Mimic Ctle). A clonogenicidade foi avaliada através do ensaio de formação de colônias. A) Quantificação das colônias formadas; B) Imagens representativas de 3 experimentos independentes. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Mimic x Mimic Ctle).

O conjunto dos resultados de inibição e de indução da expressão do miRNA486-5p aponta que ele desempenha um papel pró-tumoral dependente de KRAS em células pulmonares e sugere que este miRNA participa de forma direta na transformação maligna induzida por KRAS.

4.3.3. Mecanismo de ação pró-tumoral do microRNA 486-5p

Como o miRNA486-5p promove um aumento da viabilidade celular, tanto em ensaios de MTT quanto em ensaios de formação de colônia, o próximo passo foi investigar o mecanismo responsável pelo aumento da viabilidade celular. Como a viabilidade celular pode ser afetada tanto por alterações na capacidade proliferativa celular, quanto na capacidade de sobrevivência celular, nós resolvemos investigar como o miRNA486-5p afeta o processo de apoptose e proliferação celular.

Como o miRNA486-5p promove um aumento da viabilidade celular, nós hipotetizamos que caso ele promovesse a viabilidade através da indução de mecanismos anti-apoptóticos, então a inibição da expressão deste microRNA em células portadoras de KRAS oncogênica deveria aumentar o número de células apoptóticas. Para testar esta hipótese nós avaliamos por *western blotting* a quantidade de caspase 3 clivada em relação à caspase 3 total em células H358 com inibição da expressão do miRNA486-5p (figura 32). A inibição da expressão do miRNA486-5p com oligo inibitório não causou aumento de clivagem de caspase 3, indicando que o miRNA486-5p não afeta a taxa de apoptose.

Figura 32: A inibição do microRNA 486-5p não apresentou diferença na expressão de caspase3 total e clivada em células H358 portadoras de KRAS oncogênica. As células H358 foram transfectadas com 50 nM oligo inibitório do microRNA486-5p (antimiR) ou oligo controle sem complementaridade a microRNAs conhecidos (AntimiR Ctle) e avaliadas por western blotting 96 h após a transfecção. Os anticorpos usados estão indicados. Actina foi usada como controle de *loading*.

Outra possibilidade para o aumento de viabilidade causado pelo miRNA486-5p é que este microRNA contribua para aumentar a capacidade de proliferação celular. Para avaliar esta possibilidade, nós realizamos ensaio de incorporação de timidina tritiada em células H358 com inibição de KRAS (expressando os shRNAs1 e 2 para

KRAS na presença de doxiciclina) transfectadas com 5 η M ou 50 η M do miRNA486-5p *mimic*. Como pode ser visto na figura 33, a inibição da expressão de KRAS reduz a incorporação de timidina tritiada. Esta redução é parcialmente revertida quando a abundância do miRNA486-5p é aumentada por transfecção com o oligo *mimic* (tanto na concentração de 50 η M quanto na concentração de 5 η M). Por outro lado, um aumento na expressão do miRNA486-5p nas células controle não levou a um aumento significativo na proliferação celular, indicando que a regulação positiva da proliferação celular pelo miRNA486-5p depende da abundância de KRAS oncogênica na célula.

Figura 33: A indução do microRNA486-5p aumenta a proliferação de células H358 de forma dependente da KRAS. As células H358 foram induzidas a expressar os shRNAs1 ou 2 para KRAS ou shRNA controle com 2 μ g/mL de doxiciclina por 5 dias. Em seguida as células foram transfectadas com 5 η M ou 50 η M de oligo estimulatório do microRNA486-5p (Mimic) ou oligo controle sem homologia a microRNAs conhecidos (Mimic Ctle). A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de incorporação de timidina tritiada 96 h após a transfecção. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação Mimic x Mimic Ctle).

De forma oposta, quando as células H358 parentais são transfectadas com 50 η M do oligo inibitório *antimiR486-5p*, observa-se uma proliferação 42% menor em relação às células transfectadas com *antimiR Ctle* como demonstrado na figura 34.

Figura 34: A inibição do miRNA486-5p reduz a proliferação de células H358 portadoras da forma oncogênica da KRAS. As células H358 foram transfectadas com 50 nM oligo inibitório do microRNA486-5p (antimiR) ou oligo controle sem complementaridade a microRNAs conhecidos (AntimiR Ctle) e a proliferação celular foi avaliada 96 h após a transfecção pelo ensaio de incorporação de timidina tritiada. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculada pelo teste t de amostras não pareadas (comparação AntimiR x AntimiR Ctle).

Estes resultados indicam que o miRNA486-5p contribui para a proliferação celular induzida por KRAS.

4.4 Identificação de microRNAs diferencialmente expressos pelo ensaio de microarranjo de microRNAs

Para identificar microRNAs regulados pela forma oncogênica da KRAS, nós realizamos dois experimentos de microarranjo de DNA: (1) No primeiro experimento nós comparamos a expressão diferencial de microRNAs entre células humanas pulmonares primárias imortalizadas (SALEB) e seu par isogênico transformado pela KRAS (SAKRAS); (2) No segundo experimento nós comparamos a expressão diferencial de microRNAs entre células humanas pancreáticas primárias imortalizadas (HPDE) e seu par isogênico transformado pela KRAS (HPDE-KRAS).

4.4.1. Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pulmonares

Após o protocolo de microarranjo de microRNA e escaneamento das lâminas descrito nos materiais e métodos, pode-se observar que os processos de ligação de fluorófilo, hibridização e lavagens foram eficientes. Abaixo se tem o resultado ilustrativo e representativo de 2 arrays:

Figura 35: Figura ilustrativa do microarranjo de microRNA após o todo o procedimento, indicando que este foi bem sucedido.

Após a finalização do microarranjo foi realizado o processo de análise dos dados e pode ser observado que não foi detectado nenhum microRNA com expressão diferencial estatisticamente significativa após correção por FDR entre as células SALEB e SAKRAS (Tabela 12). Isso pode nos indicar 2 possibilidades: a expressão não difere entre as amostras analisadas ou ocorreu algum viés experimental.

Tabela 12: Resultado do microarranjo de microRNA para as células pulmonares

microRNA	Sinal médio SALEB	Sinal médio SAKRAS	P value corrigido FDR	P value não corrigido	Fold change
hsa-miRNA-320d	221,716	83,752	0,1872	0,0013	0,378
hsa-let-7b-5p	494,725	111,736	0,1872	0,0016	0,226
hsa-miRNA-1225-5p	185,275	400,251	0,2295	0,0033	2,160
hsa-let-7c	73,325	16,628	0,2295	0,0044	0,227
hsa-miRNA-150-3p	114,795	173,727	0,2295	0,0050	1,513
hsa-miRNA-720	718,483	332,560	0,2295	0,0072	0,463
hsa-miRNA-939	65,143	90,163	0,2295	0,0077	1,384
hsa-miRNA-141-3p	262,987	134,394	0,2295	0,0078	0,511
hsa-miRNA-130a-3p	103,964	12,515	0,3231	0,0144	0,120
hsa-miRNA-106b-5p	41,266	4,724	0,3231	0,0149	0,114
hsa-miRNA-1979_v15.0	99,964	33,756	0,3231	0,0151	0,338
hsa-miRNA-130b-3p	21,230	4,030	0,3380	0,0188	0,190
hsa-miRNA-324-3p	177,422	73,983	0,3380	0,0193	0,417
hsa-miRNA-1268a	36,683	83,134	0,3380	0,0212	2,266
hsa-miRNA-93-5p	65,741	8,606	0,3380	0,0270	0,131
hsa-miRNA-1202	128,733	221,782	0,3380	0,0296	1,723
hsa-miRNA-200c-3p	105,902	10,040	0,3380	0,0308	0,095
hsa-miRNA-188-5p	136,029	385,310	0,3380	0,0321	2,833
hsa-miRNA-139-3p	25,355	9,458	0,3380	0,0331	0,373
hsa-miRNA-181b-5p	53,317	22,775	0,3380	0,0343	0,427
hsa-miRNA-99b-5p	34,906	11,864	0,3380	0,0385	0,340
hsa-miRNA-135a-3p	27,563	92,066	0,3380	0,0385	3,340
hsa-miRNA-320c	113,792	76,354	0,3380	0,0389	0,671
hsa-miRNA-125a-3p	145,530	46,977	0,3380	0,0399	0,323
hsa-miRNA-25-3p	61,283	16,806	0,3380	0,0436	0,274
hsa-miRNA-320a	145,103	55,535	0,3380	0,0450	0,383
hsa-miRNA-324-5p	27,976	4,605	0,3380	0,0486	0,165
hsa-miRNA-103a-3p	126,648	13,834	0,3380	0,0488	0,109
hsa-miRNA-15b-5p	45,849	3,720	0,3380	0,0493	0,081
hsa-miRNA-320b	110,935	58,627	0,3380	0,0500	0,528
hsa-miR-19b-3p	28,533	9,5681	0,3379	0,0500	0,335328

Interessantemente, apesar de termos confirmado por qPCR que a expressão do microRNA486-5p está 5,7 vezes aumentada nas células SAKRAS em relação às células SALEB (ver figura 14), o miRNA486-5p não foi identificado como diferencialmente

expresso no experimento de microarranjo, sugerindo a possibilidade de viés experimental neste ensaio. Isto pode ser devido a limitações técnicas, pois já se é sabido que qRT-PCR é uma técnica mais sensível do que microarranjo, sendo esta segunda mais indicada para se traçar um padrão geral e determinar alvos para perseguir com outras metodologias.

Entretanto, quando avaliamos os dados das expressões individuais dos arrays destas células, observa-se que há uma tendência à expressão diferencial, podendo não ter sido observada diferença estatística após correção por FDR devido à variação experimental ou ao número amostral.

Tabela 13: Sinais individuais dos miR320d, let7b-5p e 320b no microarranjo pulmonar

	mir320d		Let7b-5p		mir320b	
Amostra	Sinal	Erro padrão	Sinal	Erro padrão	Sinal	Erro padrão
SAKRAS 1	62,02	13,44	67,7	13,72	39,1	12,56
SAKRAS 2	116,25	9,85	194,78	14,88	81,39	7,23
SAKRAS 3	110,43	8,93	115,25	8,96	93	7,78
SAKRAS 4	46,3	5,6	69,2	7,65	21,02	3,49
<i>SALEB 1</i>	<i>241,8</i>	<i>19,0</i>	<i>565,18</i>	<i>42,65</i>	<i>111,51</i>	<i>9,75</i>
<i>SALEB 2</i>	<i>181,85</i>	<i>14,75</i>	<i>393,05</i>	<i>29,94</i>	<i>104,82</i>	<i>9,18</i>
<i>SALEB 3</i>	<i>256,27</i>	<i>19,5</i>	<i>600,62</i>	<i>44,75</i>	<i>103,13</i>	<i>8,97</i>
<i>SALEB 4</i>	<i>206,94</i>	<i>17,36</i>	<i>420,05</i>	<i>31,96</i>	<i>124,28</i>	<i>11,54</i>

Levando em consideração esta possibilidade, nós usamos o valor p significativo ($<0,05$) sem correção para selecionar microRNAs para validação por PCR em tempo real. Como pode ser observado na figura 36, o microRNA 19b apresentou expressão significativamente maior nas linhagens pulmonares primárias com KRAS oncogênica (SAKRAS) em relação a sua linhagem isogênica sem KRAS oncogênica (SALEB),

resultado contrário ao observado no experimento de microarranjo. Já os microRNAs let7b e miRNA130 não apresentaram diferença de expressão. Por outro lado, os microRNAs 720 e 139-3p apresentaram uma expressão significativamente menor, corroborando os resultados obtidos no experimento de microarranjo.

Figura 36: Validação da expressão diferencial de microRNAs nas linhagens primárias Saleb e SakRas. A expressão dos microRNAs indicados acima foi avaliada nas células SALEB e SAKRAS por PCR quantitativo em tempo real. O RNA não codificador Snord47 foi usado como controle endógeno para normalização da expressão a amostra SAKRAS foi usada como calibradora. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) calculadas pelo teste t de amostras não pareadas.

Isso nos indica que os resultados do microarranjo são parcialmente confirmáveis e que parte dos microRNAs encontrados podem ser validados por qRT-PCR para investigação futura.

4.4.2 Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pancreáticas

No experimento de microarranjo de microRNA para as células pancreáticas HPDE e HPDE-KRAS foi possível observar microRNAs com expressão diferencial

estatisticamente significativa após a correção por FDR (tabela 14).

Tabela 14: Resultado do microarranjo de microRNA para as células pancreáticas

microRNA	Sinal médio HPDE	Sinal médio HPDE KRAS	p value corrigido FDR	p value não corrigido	Fold change
miRNA-100-5p	*	9,844	0,0128	0,0002	**
miRNA-29a-3p	168,681	432,808	0,0128	0,0003	2,566
miRNA-29b-3p	43,400	274,918	0,0128	0,0003	6,335
miRNA-363-3p	*	10,164	0,0128	0,0003	**
miRNA-720	3456,750	4833,638	0,0128	0,0002	1,398
miRNA-22-3p	38,516	161,134	0,0167	0,0005	4,184
miRNA-183-5p	0,879	7,692	0,0195	0,0007	8,750
miRNA-21-5p	236,236	482,507	0,0195	0,0007	2,042
miRNA-494	271,234	656,405	0,0195	0,0008	2,420
let-7b-5p	402,007	574,311	0,0215	0,0010	1,429
miRNA-132-3p	*	12,714	0,0234	0,0012	**
miRNA-130a-3p	12,312	42,799	0,0344	0,0022	3,476
miRNA-139-3p	103,460	18,922	0,0344	0,0024	0,183
miRNA-205-5p	474,366	1295,935	0,0344	0,0021	2,732
miRNA-29c-3p	22,585	76,553	0,0344	0,0024	3,390
miRNA-19b-3p	*	10,268	0,0377	0,0028	**
miRNA-130b-3p	1,532	11,325	0,0393	0,0031	7,392
miRNA-1288	413,531	152,791	0,0508	0,0045	0,369
miRNA-221-3p	10,974	36,722	0,0508	0,0047	3,346
miRNA-575	309,797	167,004	0,0508	0,0044	0,539

* Expressão considerada nula; ** Fold change nulo, pois uma das condições não apresenta expressão

Uma segunda análise realizada para selecionar possíveis candidatos para trabalhos futuros e verificar a concordância dos dados com células tumorais “reais” foi a metanálise. Trata-se de uma análise *in silico* na qual dados de microarranjos de microRNAs previamente publicados obtidos de banco de dados foram comparados entre si, a fim de identificar, em amostras de pacientes e linhagens celulares tumorais, microRNAs relacionados ao fenótipo maligno pancreático. Considerando-se que a taxa de mutação em KRAS no câncer de pâncreas é extremamente alta (acima dos 90%), existe uma grande possibilidade destes microRNAs identificados serem também regulados por KRAS. Os microRNAs identificados nesta análise estão listados na tabela abaixo, sendo todos observados com diferenças estatisticamente significativas:

Tabela 15: microRNAs observados na metanálise com maior expressão nas amostras pancreáticas tumorais em relação a normais.

Tumorais > Normais		
hsa-miRNA-125b-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miRNA-222
hsa-miRNA-221	hsa-miRNA-141-3p	hsa-miRNA-106b
hsa-miRNA-31	hsa-miRNA-1274a_v16.0	hsa-miRNA-221-3p
hsa-miRNA-548	hsa-miRNA-1826_v15.0	hsa-miRNA-23a-3p
hsa-miRNA-21	hsa-miRNA-93	hsa-miRNA-205-5p
hsa-miRNA-141	hsa-miRNA-130a-3p	hsa-miRNA-31-5p
hsa-miRNA-425-5p	hsa-miRNA-92a-3p	hsa-miRNA-29c-3p
hsa-miRNA-93-5p	hsa-miRNA-1979_v15.0	hsa-miRNA-22-3p
hsa-miRNA-92	hsa-miRNA-29b	hsa-miRNA-24-3p
hsa-let-7a-5p	hsa-miRNA-17-5p	hsa-miRNA-29b-3p
hsa-miRNA-801	hsa-miRNA-27a	hsa-miRNA-29a-3p
hsa-miRNA-106a	hsa-miRNA-1260a	hsa-miRNA-565
hsa-miRNA-720	hsa-miRNA-15b-5p	hsa-miRNA-21-5p
hsa-miRNA-19a	hsa-miRNA-103a-3p	hsa-miRNA-331
hsa-miRNA-25-3p	hsa-miRNA-27a-3p	hsa-let-7e-5p
hsa-miRNA-29a	hsa-miRNA-488	hsa-miRNA-923_v12.0
hsa-miRNA-422b	hsa-miRNA-210	hsa-miRNA-193a-3p
hsa-miRNA-103	hsa-miRNA-574	hsa-miRNA-548
hsa-miRNA-339	hsa-miRNA-338-3p	hsa-miRNA-151
hsa-miRNA-301	hsa-let-7g-5p	hsa-miRNA-1246
hsa-miRNA-23a	hsa-miRNA-24	hsa-miRNA-181d

Tabela 16: microRNAs observados na metanálise com maior expressão nas amostras pancreáticas normais em relação a tumorais

Tumorais < Normais		
hsa-miRNA-145	hsa-let-7e	hsa-miRNA-92a
hsa-miRNA-199a	hsa-let-7c	hsa-miRNA-26b
hsa-miRNA-125b	hsa-miRNA-1294	hsa-miRNA-192
hsa-miRNA-768-5p	hsa-miRNA-195	hsa-miRNA-127
hsa-let-7b	hsa-miRNA-1323	hsa-miRNA-199a-3p
hsa-miRNA-26a	hsa-miRNA-885-5p	hsa-miRNA-148a
hsa-miRNA-125a	hsa-miRNA-2276	hsa-miRNA-375
hsa-miRNA-500a-5p	hsa-miRNA-338	hsa-miRNA-199a
hsa-let-7a	hsa-miRNA-223	hsa-miRNA-768-3p
hsa-miRNA-768-3p	hsa-let-7f	hsa-miRNA-34a
hsa-miRNA-146b	hsa-let-7g	hsa-miRNA-199b
hsa-miRNA-29c	hsa-miRNA-217	hsa-miRNA-143
hsa-miRNA-216	hsa-miRNA-1295a	hsa-miRNA-1914-3p
hsa-miRNA-214	hsa-miRNA-1226-5p	hsa-miRNA-126
hsa-miRNA-99a	hsa-miRNA-202-3p	hsa-miRNA-451

Pode-se observar que alguns microRNAs com expressão aumentada nas amostras pancreáticas tumorais podem ser considerados “marcadores” por já terem sua expressão aumentada em outros tipos de câncer, como o microRNA 21 e a família let7 (Frampton *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2012; Roa *et al.*, 2010).

Quando realizada a sobreposição dos microRNAs identificados na metanálise com os identificados no experimento de microarranjo realizado nas células pancreáticas primárias HPDE e HPDE-KRAS foi possível obter 9 microRNAs coincidentes, com o mesmo padrão de expressão diferencial. Isso sugere que esses microRNAs possam ser regulados pela KRAS oncogênica tanto nestas linhagens isogênicas com modificações genéticas definidas (HPDE e HPDE-KR) quanto em células pancreáticas tumorais reais encontradas em pacientes.

Tabela 17: microRNAs com expressão diferencial observada tanto no microarranjo de microRNA das linhagens HPDE e HPDE-KRAS quanto na metanálise.

microRNAs	HPDE-KRAS/HPDE
hsa-microRNA-29a-3p	2,566
hsa-microRNA-29b-3p	6,335
hsa-microRNA-720	1,398
hsa-microRNA-22-3p	4,184
hsa-microRNA-21-5p	2,042
hsa-microRNA-130a-3p	3,476
hsa-microRNA-205-5p	2,732
hsa-microRNA-29c-3p	3,390
hsa-microRNA-221-3p	3,346

Estes microRNAs identificados tanto no experimento de microarranjo de linhagens primárias pancreáticas na presença ou ausência de KRAS oncogênica, bem como na metanálise representam futuros candidatos promissores para estudos em câncer de pâncreas, os quais podem ser regulados por KRAS oncogênica e podem agir como alvos importantes tanto para terapia quanto diagnóstico e prognóstico. Para identificar quais vias poderiam estar afetadas por estes microRNAs nós utilizamos uma abordagem de bioinformática denominada *mirPath* utilizando o banco de dados Tarbase (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath/index>) e análise por *significance cluster*. Resumidamente, o banco de dados Tarbase representa vias influenciadas por microRNAs baseadas em resultados experimentais validados. A análise por *significance cluster* é baseada em algoritmos que utilizam níveis de significância exatos calculados, fornecendo resultados baseados em *size effect*. Como pode ser visto no gráfico abaixo, quando estes 9 microRNAs foram analisados pelo banco de dados Tarbase

foi possível observar que a maioria apresenta funções em importantes vias para o câncer, como PI3/Akt e p53.

Figura 37: Gráfico das vias influenciadas pelo microRNAs diferencilmente expressos encontrados com o mesmo *trend* de expressão no microarranjo e na metanálise. Foi utilizado como banco de dados o Tarbase. O *heatmap* indica a intensidade de influência de determinado microRNA e respectiva via, sendo este correspondente ao *p-value* obtido de acordo com a legenda.

Em conclusão, nós não só identificamos diferentes microRNAs diferencialmente expressos em função da KRAS oncogênica em células pancreáticas e pulmonares, mas também validamos o miRNA486-5p como um potencial oncomiR regulado por KRAS no câncer de pulmão.

5. DISCUSSÃO

O entendimento e definição do câncer vêm sofrendo intensas mudanças em suas concepções. Antigamente tratado como uma doença estritamente genética, o câncer é atualmente visto de uma forma mais ampla, na qual mudanças não genéticas também podem influenciar sua etiologia. O surgimento de uma célula com potencial tumoral é comum, entretanto a evolução para um tumor maligno propriamente dito é um fenômeno raro. Um conjunto de condições citadas por Hanahan *et al.* (2011) descreve as propriedades necessárias a esse fenômeno: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de parada de crescimento, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese, capacidade de invasão e metástase e evasão do sistema imune.

A transformação celular induzida por KRAS vem sendo alvo de pesquisas com finalidade terapêutica e, apesar dos intensos esforços, não existem terapias efetivas para pacientes portadores de mutações oncogênicas em KRAS. Ensaio envolvendo inibição direta não foram bem sucedidos (Adjei, 2001; Friday *et al.*, 2005) e terapia indireta buscando alvos e efetores *downstream* são desafiadores, visto que KRAS é capaz de regular uma série de vias que convergem para a transformação maligna. Provavelmente, uma terapia efetiva para células tumorais transformadas por KRAS envolverá a inibição combinatória de mais de um alvo. Por isso, uma melhor compreensão das vias moleculares acionadas por KRAS é desejável, pois poderá proporcionar conhecimento de vias por ela induzidas, fornecendo, desta forma, conhecimento sobre novos alvos potenciais a serem explorados na terapia.

Uma potencial via promissora regulada por KRAS que permanece pouco explorada é a via dos miRNAs. Tendo em vista que estas moléculas podem

desempenhar um papel importante na oncogênese atuando tanto como oncogenes ou como supressores tumorais, nosso objetivo foi, portanto, identificar miRNAs regulados pela forma oncogênica da KRAS que contribuam para o fenótipo maligno. A identificação destes miRNAs é importante, não só porque eles podem constituir novos alvos terapêuticos, mas também porque eles podem servir de biomarcadores associados ao diagnóstico e prognóstico.

Para identificar miRNAs diferencialmente expressos em células transformadas por KRAS, foram realizadas duas abordagens: 1) avaliação do miRNA candidato 486-5p como alvo do oncogene KRAS em células de câncer de pulmão e pâncreas; e 2) ensaios de microarranjos de miRNAs em linhagens primárias de células pulmonares ou pancreáticas normais imortalizadas na ausência (SALEB, HPDE) ou presença de KRAS oncogênica (SAKRAS, HPDE-KRAS).

5.1 Avaliação do miRNA candidato 486-5p como alvo do oncogene KRAS em células de câncer de pulmão e pâncreas

Na nossa primeira abordagem nós avaliamos o miRNA486-5p como alvo de KRAS devido ao fato deste ter sido identificado no estudo de Ragusa *et al.* (2010), que demonstrou uma correlação positiva entre sua e a presença de mutações oncogênicas em KRAS em pacientes com câncer de cólon.

Os nossos resultados mostram que, em células pulmonares, a KRAS oncogênica regula positivamente a expressão do miRNA486-5p, sendo este já sabidamente induzido por SRF e MRTF-A em células musculares, aonde ele regula o crescimento, desenvolvimento e capacidade de resposta à sinais (Small *et al.*, 2010). Xu *et al.* (2012)

demonstraram que a superexpressão do miRNA486-5p em células primárias musculares reduziu a tradução de FoxO1, além de aumentar a sua fosforilação pela inibição conjunta de PTEN neste modelo. Essas duas moléculas, FoxO1 e PTEN, influenciam e têm papel direto no fenômeno de balanço muscular negativo, e de forma interessante, quando inibidas pelo miRNA486-5p reduzem a proteólise muscular, demonstrando que a superexpressão deste microRNA tem papel biológico neste modelo.

Interessantemente, apesar deste microRNA regular negativamente a expressão dos supressores tumorais FoxO1 e PTEN (Xu *et al.*, 2012; Small *et al.*, 2010; Myatt *et al.*, 2010) em células musculares e endometriais, sua função no câncer permanece controversa. Alguns estudos sugerem que ele desempenha um papel supressor tumoral, enquanto outros sugerem um papel oncogênico. Uma expressão reduzida foi observada em câncer gástrico e câncer de pulmão, aonde se sugere que este microRNA possa servir como biomarcador (Oh *et al.*, 2011; Konishi *et al.*, 2012). Novamente em câncer gástrico, ele foi identificado como subexpresso em câncer primário e em linhagens celulares, sendo que a restauração de seu nível de expressão suprime diversos proto-oncogenes (Oh *et al.*, 2011). O miRNA486 foi identificado como subexpresso em pacientes com adenocarcinoma pulmonar (Yu *et al.*, 2010; Solomides *et al.*, 2012) e em uma metanálise de 20 estudos de expressão de microRNAs em câncer de pulmão em relação a tecidos controles (Vosa *et al.*, 2013). Alguns estudos propõem que ele atua como um supressor de tumor no pulmão, inibindo a migração celular, proliferação e invasão *in vitro* e crescimento tumoral, além de metástase *in vivo* (Peng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). É importante ressaltar que os estudos mencionados acima não avaliaram o *status* mutacional de KRAS das amostras estudadas. Como a taxa de mutação de KRAS em tumores pulmonares é variável de acordo com a população e o estudo, e como demonstramos neste trabalho que células pulmonares tumorais com

KRAS mutada apresentam expressão elevada do miRNA486-5p, uma análise estratificada pelo status mutacional de KRAS pode apresentar resultados distintos.

Por outro lado, outros estudos sugerem um papel oncogênico para este microRNA. Em tumores renais a expressão do miR486 foi observada elevada em relação ao órgão normal, além de uma associação à mortalidade em pacientes com estágio III e IV não tratados com interferon-alfa (Goto *et al.*, 2013). Este miRNA também foi observado como oncogene em estudos envolvendo câncer de mama (Mcdermott *et al.*, 2014), neural (Masliah-Planchon *et al.*, 2013) e melanoma (Chan *et al.*, 2011). De forma interessante, em conjunto com 5 outros miRNAs, o miRNA486 foi determinado como preditivo de câncer de mama inflamatório e pulmonar, diferenciando-os de tecidos normais (Lerebours *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2011). Um aumento da expressão do miRNA486-5p e 486-3p foi observado em amostras de câncer de cólon portadoras de mutações em KRAS (Ragusa *et al.*, 2010; Mosakhani *et al.*, 2012). Além disso, o miRNA486-5p tem expressão aumentada em pacientes portadores da síndrome de Sézary, um tipo de linfoma de célula T e, de forma interessante, uma linhagem celular de linfócitos T que não apresenta sua expressão, quando transfectada para expressá-lo, apresenta aumento na viabilidade celular (Narducci *et al.*, 2011). Além disso, em um modelo de leucemia mielóide crônica (CML), a inibição do miRNA486-5p em células CD34+ portadoras da oncoproteína BCR-ABL (que sabidamente ativa a via de Ras), reduziu o crescimento celular e aumentou a sensibilidade ao imatinib (inibidor da BCR-Abl), sugerindo que a inibição deste microRNA possa servir como terapia adjuvante em CML (Wang *et al.*, 2011).

O nosso estudo corrobora um papel oncogênico para o miRNA486-5p em câncer de pulmão induzido por KRAS, tendo em vista que a super-expressão deste aumentou o crescimento de células pulmonares e a inibição da sua expressão reduziu o crescimento

e a proliferação celulares de forma dependente da KRAS oncogênica (ver figuras 25 a 31). Como observado em alguns estudos (Song *et al.*, 2014; Vosa *et al.*, 2013), é possível que a expressão deste miRNA em tecidos pulmonares normais seja maior que em tecidos pulmonares malignos, sendo necessária uma redução dos níveis deste microRNA para promover a transformação maligna. Por outro lado, também é possível que uma regulação positiva pela KRAS oncogênica possa levar a níveis intermediários deste microRNA nas células malignas, levando a um efeito pró-tumoral. Como a abundância de um determinado microRNA na célula pode afetar os alvos por ele regulados, é possível que níveis muito elevados deste microRNA (encontrados em tecido normal) levem à repressão de todos os alvos do microRNA 486-5p, entretanto níveis intermediários deste microRNA (encontrados em células portadoras de KRAS), poderia levar à inibição preferencial dos alvos deste microRNA envolvidos com a supressão tumoral (como PTEN e FoxO1), mas não afetar significativamente a regulação dos alvos potencialmente oncogênicos (como ARHGAP5).

Como mencionado acima, o miRNA486-5p foi demonstrado como regulador de dois importantes supressores de tumor: PTEN e o fator de transcrição FoxO1 (Small *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012). Estas proteínas supressoras tumorais participam como reguladores negativos da via PI3K/AKT. Essa regulação negativa pelo miRNA486-5p é capaz de permitir a fosforilação e ativação de AKT, além de seus efetores *downstream*, como mTOR, e também é capaz de promover a inibição de GSK3 β e outros reguladores negativos de síntese protéica, proporcionando o crescimento muscular (Small *et al.*, 2010). Neste trabalho mostramos, não só uma correlação negativa entre miRNA486-5p e FoxO1 em células tumorais de pulmão (figura 15), mas também demonstramos que a forma oncogênica da KRAS regula de forma negativa o fator de transcrição FoxO1 (figuras 18 e 20). Portanto propomos que a inibição de FoxO1 é regulada, pelo menos

em parte, por KRAS oncogênica através de sua capacidade de regulação positiva do miRNA486-5p. Também propomos que a inibição de FoxO1 pode ser um evento importante na oncogênese induzida por KRAS. De fato, FoxO1 pode, de forma direta ou com interação com outros fatores, regular a transcrição de genes relacionados ao controle da proliferação celular, sobrevivência, stress oxidativo e possui relação com o processo de transformação maligna (Ramaswamy *et al.*, 2002; Van Der Vos *et al.*, 2008). Finalmente, a superexpressão de FoxO1 é capaz de parar o ciclo celular na fase G1/S, o que é mediado tanto pelo aumento de inibidores de CDK quanto pela diminuição de ciclina D (Medema *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2002).

No caso de PTEN, apesar de este ter sido confirmado como alvo do miRNA486-5p em células musculares (Small *et al.*, 2010), não foi possível observar sua regulação por KRAS oncogênica no modelo pulmonar. Isso provavelmente reflete diferenças tecido-específicas na regulação por microRNAs. Mais do que isso, não só os microRNAs podem ser regulados de forma tecido-específica (Cascione *et al.*, 2013), mas a regulação de seu grupo de alvos pode variar de acordo com o contexto celular (Borbone *et al.*, 2013; Daschkey *et al.*, 2013). Tendo em vista que PTEN e FoxO1 são conhecidos como reguladores negativos da via PI3K-AKT (Small *et al.*, 2010) é possível que, em tecidos distintos, a expressão de apenas uma destas duas proteínas seja suficiente para regular negativamente esta via. Interessantemente, sabe-se que a KRAS é capaz de ativar a PI3K por interação direta com a subunidade catalítica p110 desta quinase (Yang *et al.*, 2012). O nosso estudo sugere a inibição de FoxO1 mediada pelo miRNA486-5p como um mecanismo adicional, através do qual a KRAS pode ativar a via PI3K-AKT. É possível que PTEN seja regulado por KRAS de forma similar em contextos diferentes.

Mais importante ainda, pela manipulação simultânea de KRAS e do miRNA486-

5p foi possível demonstrar que a expressão deste microRNA pode reverter o efeito biológico da inibição da KRAS (figuras 28, 29 e 33), e vice-versa, na qual a inibição do miRNA486-5p pode reverter o efeito biológico da indução da KRAS oncogênica (figura 26). Esses resultados são importantes, pois mostram que pelo menos algumas características tumorais induzidas por KRAS (aumento de viabilidade e proliferação) são mediadas em parte pelo miRNA486-5p. Este resultado, em conjunto com o fato de que a inibição do miRNA486-5p em células H1703 (que não expressam KRAS oncogênica) não apresentou efeito na viabilidade e proliferação celulares, sugere que sua inibição pode representar um mecanismo efetivo e específico para ser utilizado como terapia adjuvante para câncer pulmonar induzido por KRAS.

5.2 Ensaaios de microarranjos de microRNAs em linhagens primárias de células pulmonares ou pancreáticas normais imortalizadas na ausência (SALEB, HPDE) ou presença de KRAS oncogênica (SAKRAS, HPDE-KRAS)

Os resultados obtidos pelos experimentos de microarranjo tanto nas linhagens pulmonares quanto nas pancreáticas demonstram que a KRAS oncogênica altera a expressão de miRNAs, podendo estes agirem no processo de transformação maligna induzida por KRAS. Essa expressão mostrou-se tecido-específica, como já descrito (Cascione *et al.*, 2013), refletindo diferenças genéticas e epigenéticas entre as células. Além disso, estes resultados servirão para auxiliar na escolha de miRNAs candidatos para futuros estudos, visto que estas moléculas participam ativamente no processo tumoral.

Especificamente nós identificamos 20 miRNAs diferencialmente expressos em função de KRAS em células pancreáticas (ver tabela 12). Em células pulmonares, embora diferenças significativas não tenham sido observadas, possivelmente devido aos fatos apontados anteriormente, nós observamos uma tendência a expressão diferencial também de vários microRNAs (ver tabela 10) e validamos a expressão diferencial de dois destes microRNAs nas linhagens pulmonares (figura 36). Uma comparação entre estes resultados mostra que existem miRNAs regulados por KRAS de forma tecido-específica, como os microRNAs 29a, 29b e 29c nas linhagens pancreáticas, os microRNAs 320a e 320b nas pulmonares, além de alguns que só se mostraram expressos em linhagens tumorais, como os microRNAs 100-5p e 19b-3p na linhagem HPDE-KRAS. Dado o diferente estado epigenético de linhagens oriundas de tecidos diferentes, esta diferença não é surpreendente.

Como o experimento de microarranjo nas células primárias pancreáticas resultou em uma lista de microRNAs diferencialmente expressos em função de KRAS com diferenças estatisticamente significativas após a correção por FDR, nós realizamos uma análise adicional para identificar os microRNAs mais promissores para validação.

Nesta abordagem adicional, nós realizamos uma metanálise de cinco estudos que utilizaram experimentos de microarranjo de DNA para comparar o perfil de miRNAs expressos em amostras pancreáticas tumorais (de pacientes e linhagens celulares) e amostras não tumorais. Como a taxa de mutação em KRAS é maior que 90% em câncer de pâncreas, nós assumimos que alguns dos microRNAs identificados nesta metanálise seriam, não só relacionados ao fenótipo maligno, mas também regulados por KRAS. Interessantemente, ao comparar os microRNAs identificados nesta metanálise (tabelas 15 e 16) com os identificados no nosso experimento de microarranjo de DNA (tabela 14), foi possível identificar nove que estão significativamente mais expressos nas

amostras tumorais nestes cinco estudos, e que também estão significativamente mais expressos nas células primárias HPDE-KRAS do que nas células isogênicas HPDE (sem KRAS) (ver tabela 17).

Destes nove microRNAs, alguns já têm papel cohecido no câncer. O miRNA21 pode ser considerado o mais bem estudado e conhecido, com expressão elevada e agindo como oncogene em câncer de mama, glioblastoma, pâncreas e próstata (Si *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2005; Moriyama *et al.*, 2009; Ribas *et al.*, 2009). Já o miRNA29c foi identificado com expressão aumentada em câncer pancreático em relação a células normais (Volinia *et al.*, 2006), juntamente com câncer colorretal e renal (Arndt *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010). O miRNA221 foi identificado como um fator de pior sobrevida em pacientes com câncer (Wang, Liu *et al.*, 2014) e também observado com expressão elevada em carcinoma de colon metastático, tendo como alvo RECK (Qin *et al.*, 2014).

Já o conhecimento do envolvimento de outros desses microRNAs em câncer é menor, com participação provavelmente influenciada pelo contexto celular. O miRNA22, por exemplo, apresenta-se com expressão aumentada e reduzida em estudos envolvendo câncer de mama e próstata, respectivamente (Pandey *et al.*, 2009; Porkka *et al.*, 2007). Já o miRNA720 é um alvo recém-descoberto e pouco estudado, mas apresenta-se regulado por SnoN/SKIL e participa no controle da proliferação celular em células de câncer de esôfago (Shinozuka *et al.*, 2013).

Por outro lado, os miRNAs 29a, 29b, 130a e 205 estão com estudos em evolução e podem, portanto, constituir novos miRNAs regulados por KRAS, que podem desempenhar funções importantes para a manutenção do fenótipo maligno. Por exemplo o miRNA29a apresentou expressão diminuída em câncer de mama e seu aumento de

expressão resulta em menor taxa de crescimento de células deste tipo de câncer, além de mais células na fase G0/G1 (Wu, Z. *et al.*, 2013) e o miRNA29b foi sugerido como um supressor de tumor em leucemia mielóide crônica regulando a via BCR/ABL1 (Li *et al.*, 2013). Já o miRNA130a foi observado com expressão aumentada em câncer de cólon, contribuindo para transformação maligna por interferir na via TGF- β /Smad (Liu *et al.*, 2013), enquanto o miRNA205 pode agir como um supressor de tumor em câncer oral, suprimindo a via Axin-2 (Kim *et al.*, 2014).

Portanto, esta parte do nosso trabalho identificou vários miRNAs diferencialmente expressos em função de KRAS, tanto no câncer de pulmão quanto no câncer pancreático que serão explorados em trabalhos futuros por outros membros do laboratório. Esta identificação foi importante porque pode fornecer novos alvos terapêuticos para a terapia de neoplasias induzidas pela forma oncogênica da KRAS.

Neste sentido, terapias usando os próprios miRNAs vem sendo desenvolvidas. Por exemplo, quando miRNA29b tem sua expressão restaurada em células tumorais pulmonares via lipossomos catiônicos ocorre a diminuição na tradução de genes importantes na iniciação tumoral, como CDK6, DNMT3B e MCL1, juntamente com crescimento celular *in vitro*. Em modelos xenográficos murinos, os lipossomos foram eficientes em acumular-se nos sítios tumorais, restaurar a expressão do miRNA29b e inibir o crescimento em torno de 60% (Wu, Y. *et al.*, 2013). Ele também foi verificado com um alvo *downstream* crítico da via não-canônica de Wnt, tendo papel anti-proliferativo em NSCLC e tendo como alvo MDM2 (Avasarala *et al.*, 2013).

Os microRNAs identificados podem também vir a constituir importantes biomarcadores, contribuindo para o diagnóstico e guiando a escolha terapêutica. Por exemplo, a caracterização de miRNAs em soro de pacientes com câncer de cólon em

estágio IV demonstra que seu perfil pode ser utilizado para detecção precoce da presença deste tipo de câncer (Hofsli *et al.*, 2013). De forma semelhante, um perfil sorológico de miRNAs foi determinado para pacientes com leucemia mielóide aguda permitindo a diferenciação em relação a indivíduos normais, além de relacionar o miRNA181b-5p como marcador de sobrevida (Zhi *et al.*, 2013). De forma interessante, os tumores são capazes de apresentarem resistência terapêutica, na qual após um período de quimioterapia estes não apresentam responsividade. Nesses casos há alteração na expressão de miRNAs, como miRNA192 e 200b, e eles vem sendo estudados como uma alternativa para reestabelecer a sensibilidade tumoral à quimioterapia e prevenir a recorrência (Rui *et al.*, 2010; Garofalo *et al.*, 2013).

Finalmente, a identificação destes miRNAs pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias através da identificação dos seus alvos envolvidos em promover o fenótipo maligno. Wen *et al.*, 2014 demonstraram que o miRNA506 funciona como um supressor de tumor em câncer cervical tendo como alvo direto o fator de transcrição Gli3, envolvido na via Hedgehog. De forma semelhante, o miRNA141 age suprimindo a invasão e metástase em carcinoma hepatocelular por ter como alvo Tiam1 (Liu *et al.*, 2014). Já agindo como oncogene, o miRNA566 apresenta-se com expressão aumentada em linhagens celulares de glioma humano e sua inibição reduz a atividade da via de EGFR, também inibindo proliferação e invasão (Zhang *et al.*, 2014). Assim como o miRNA10 foi identificado como um oncogene em câncer de bexiga, com expressão elevada tanto em linhagens celulares quanto em tecidos metastáticos, tendo como alvos os fatores de transcrição KLF4 e HOXD10 (Xiao *et al.*, 2014).

Para tentar identificar vias reguladas por estes microRNAs nós fizemos uma análise de *pathways* dos miRNAs encontrados na metanálise e com mesmo *trend* de

expressão nas linhagens primárias pancreáticas e vimos que eles podem contribuir de forma significativa para o processo de transformação maligna (figura 37). Vias confirmadas pelo Tarbase relacionam esses miRNAs com interação ECM-receptor, via de sinalização PI3K e p53, apoptose, ciclo celular e vários tipos de câncer, como endometrial, pancreático, próstata.

Portanto, tanto em células pulmonares, quanto em células pancreáticas, nós identificamos miRNAs diferencialmente expressos em função do oncogene KRAS, que podem ser explorados direta ou indiretamente para o desenvolvimento de novas terapias para pacientes portadores destas neoplasias.

6. CONCLUSÕES

Neste projeto nós postulamos que a forma oncogênica da KRAS regula a expressão de miRNAs, que por sua vez irão contribuir para o fenótipo maligno. Para identificar miRNAs regulados pela KRAS nós utilizamos duas estratégias: (1) avaliação da expressão do microRNA candidato (miRNA486-5p) em diferentes modelos celulares em função da expressão de KRAS; e (2) experimentos de microarranjos de DNA em pares isogênicos de células primárias pulmonares e pancreáticas transformadas ou não pelo oncogene KRAS.

6.1 Análise do microRNA 486-5p como alvo do oncogene KRAS no pulmão

Considerando-se os resultados descritos nós demonstramos que a correlação observada por Ragusa *et al.* (2010) entre o miRNA486-5p e a presença de KRAS oncogênica em câncer de cólon também é observada em células tumorais pulmonares. Entretanto, esta não parece ser uma regulação universal, uma vez que esta correlação não foi observada em células pancreáticas. Além disso, nós não só demonstramos uma correlação entre o miRNA486-5p e KRAS nas células pulmonares, mas, através de experimentos de perda e ganho de função, demonstramos que existe causalidade entre a expressão de KRAS oncogênica e a expressão deste miRNA, de tal forma que uma alteração na expressão de KRAS leva a uma alteração correspondente na sua expressão.

Estes resultados estabeleceram o miRNA486-5p como alvo do oncogene KRAS em células tumorais pulmonares e serviram de base para a análise funcional deste miRNA. Para tanto, nós realizamos tanto a super-expressão, quanto a inibição da

expressão deste microRNA em células pulmonares. Estes estudos demonstraram que o miRNA486-5p possui ação oncogênica (oncomiR) promovendo a proliferação e a viabilidade celular.

Mais importante ainda, nós observamos que o miRNA486-5p é capaz de resgatar a perda de viabilidade causada pela inibição da expressão de KRAS (ver figuras 28 a 30). Por outro lado, sua inibição é capaz de reduzir o ganho de viabilidade observado pela indução da expressão de KRAS para os níveis observados na ausência de indução (ver figuras 25 e 26). Interessantemente, a inibição do miRNA486-5p em células que não expressam KRAS oncogênica não afeta a viabilidade celular. Estes resultados indicam especificidade, ou seja, que a inibição do miRNA486-5p produz efeitos biológicos somente na presença de KRAS oncogênica, justificando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na inibição deste microRNA em câncer de pulmão induzido por KRAS.

Para tentar entender o mecanismo de ação deste miRNA nós avaliamos a expressão de alguns de seus alvos conhecidos, que tem ação supressora tumoral: a fosfatase PTEN e o fator de transcrição FoxO1. Embora, no contexto estudado, não tenha sido observada nenhuma alteração em PTEN, nós observamos que FoxO1 tem sua expressão protéica diminuída com aumento de KRAS (e consequentemente de miRNA486-5p) e vice-versa, mostrando uma regulação de FoxO1 por KRAS, e sugerindo que esta regulação é, ao menos parcialmente, mediada pelo miRNA486-5p.

Este estudo identifica o miRNA486-5p como um alvo interessante da KRAS oncogênica no pulmão e sugere que a inibição de sua expressão pode trazer benefícios terapêuticos.

6.2 Experimentos de microarranjos de DNA em pares isogênicos de células primárias

Esta análise de microarranjos de DNA foi realizada com pares isogênicos portadores ou não de KRAS oncogênica tanto de células primárias pulmonares, quanto de células primárias pancreáticas. No caso das células pulmonares, embora diferenças significativas não tenham sido observadas, nós observamos uma tendência a expressão diferencial de vários miRNAs (ver tabela 12). No caso das células pancreáticas, nós identificamos 20 microRNAs diferencialmente expressos em função de KRAS (ver tabela 14). Uma comparação entre estes resultados mostra que existem miRNAs regulados por KRAS de forma tecido-específica, como os miRNAs 29a, 29b e 29c nas linhagens pancreáticas, o 320a e 320b nas pulmonares, além de alguns que só se mostraram expressos em linhagens tumorais, como os miRNAs 100-5p e 19b-3p na linhagem HPDE-KRAS.

Para identificar os miRNAs mais promissores para validação, nós realizamos uma metanálise de cinco estudos que utilizaram experimentos de microarranjo de DNA para comparar o perfil de miRNAs expressos em amostras pancreáticas tumorais e amostras não tumorais e identificamos 9 que estão significativamente mais expressos nas amostras tumorais nestes 5 estudos, e que também estão significativamente mais expressos nas células primárias HPDE-KRAS do que nas células isogênicas HPDE (sem KRAS) (ver tabela 17). Embora a análise funcional dos microRNAs validados não faça parte dos objetivos de estudo deste projeto, estes microRNAs serão investigados futuramente no laboratório como potenciais alvos terapêuticos regulados por KRAS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ALFA, G. K.; CHAPMAN, P. B.; FEILCHENFELDT, J.; BRENNAN, M. F.; CAPANU, M.; GANSUKH, B.; JACOBS, G.; LEVIN, A.; NEVILLE, D.; KELSEN, D. P.; O'REILLY, E. M. Targeting mutated K-ras in pancreatic adenocarcinoma using an adjuvant vaccine. **Am J Clin Oncol**, v. 34, n. 3, p. 321-5, Jun 2011.

ADJEI, A. A. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 14, p. 1062-74, Jul 18 2001.

ALMOGUERA, C.; SHIBATA, D.; FORRESTER, K.; MARTIN, J.; ARNHEIM, N.; PERUCHO, M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**, v. 53, n. 4, p. 549-54, May 20 1988.

AMBROS, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 673-6, Jun 13 2003.

ARAVIN, A. A.; LAGOS-QUINTANA, M.; YALCIN, A.; ZAVOLAN, M.; MARKS, D.; SNYDER, B.; GAASTERLAND, T.; MEYER, J.; TUSCHL, T. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. **Dev Cell**, v. 5, n. 2, p. 337-50, Aug 2003.

ARNDT, G. M.; DOSSEY, L.; CULLEN, L. M.; LAI, A.; DRUKER, R.; EISBACHER, M.; ZHANG, C.; TRAN, N.; FAN, H.; RETZLAFF, K.; BITTNER, A.; RAPONI, M. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. **BMC Cancer**, v. 9, p. 374, 2009.

ARVANITAKIS, M.; VAN LAETHEM, J. L.; PARMA, J.; DE MAERTELAER, V.; DELHAYE, M.; DEVIERE, J. Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation. **Endoscopy**, v. 36, n. 6, p. 535-42, Jun 2004.

AVASARALA, S.; VAN SCOYK, M.; WANG, J.; SECHLER, M.; VANDERVEST, K.; BRZEZINSKI, C.; WEEKES, C.; EDWARDS, M. G.; ARCAROLI, J.; DAVIS, R. E.; BIKKAVILLI, R. K.; WINN, R. A. hsa-miR29b, a critical downstream target of non-canonical Wnt signaling, plays an anti-proliferative role in non-small cell lung cancer cells via targeting MDM2 expression. **Biol Open**, v. 2, n. 7, p. 675-85, Jul 15 2013.

BABIARZ, J. E.; RUBY, J. G.; WANG, Y.; BARTEL, D. P.; BLELLOCH, R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. **Genes Dev**, v. 22, n. 20, p. 2773-85, Oct 15 2008.

BAE, H. J.; NOH, J. H.; KIM, J. K.; EUN, J. W.; JUNG, K. H.; KIM, M. G.; CHANG, Y. G.; SHEN, Q.; KIM, S. J.; PARK, W. S.; LEE, J. Y.; NAM, S. W. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, Jun 3 2013.

BAR-SAGI, D.; FERAMISCO, J. R. Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. **Cell**, v. 42, n. 3, p. 841-8, Oct 1985.

BARBACID, M. ras genes. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 779-827, 1987.

BARTEL, D. P.; CHEN, C. Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 5, p. 396-400, May 2004.

BEREZIKOV, E.; CHUNG, W. J.; WILLIS, J.; CUPPEN, E.; LAI, E. C. Mammalian mirtron genes. **Mol Cell**, v. 28, n. 2, p. 328-36, Oct 26 2007.

BORBONE, E.; DE ROSA, M.; SICILIANO, D.; ALTUCCI, L.; CROCE, C. M.; FUSCO, A. Up-regulation of miR-146b and down-regulation of miR-200b contribute to the cytotoxic effect of histone deacetylase inhibitors on ras-transformed thyroid cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 6, p. E1031-40, Jun 2013.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13, n. 12, p. 1097-101, Dec 2006.

BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 117-27, Jan 10 1991.

BRAMBILLA, R.; GNESUTTA, N.; MINICHELLO, L.; WHITE, G.; ROYLANCE, A. J.; HERRON, C. E.; RAMSEY, M.; WOLFER, D. P.; CESTARI, V.; ROSSI-ARNAUD, C.; GRANT, S. G.; CHAPMAN, P. F.; LIPP, H. P.; STURANI, E.; KLEIN, R. A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 281-6, Nov 20 1997.

BRAUN, B. S.; TUVESON, D. A.; KONG, N.; LE, D. T.; KOGAN, S. C.; ROZMUS, J.; LE BEAU, M. M.; JACKS, T. E.; SHANNON, K. M. Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 2, p. 597-602, Jan 13 2004.

CASCIONE, L.; GASPARINI, P.; LOVAT, F.; CARASI, S.; PULVIRENTI, A.; FERRO, A.; ALDER, H.; HE, G.; VECCHIONE, A.; CROCE, C. M.; SHAPIRO, C. L.; HUEBNER, K. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55910, 2013.

CHAN, E.; PATEL, R.; NALLUR, S.; RATNER, E.; BACCHIOCCHI, A.; HOYT, K.; SZPAKOWSKI, S.; GODSHALK, S.; ARIYAN, S.; SZNOL, M.; HALABAN, R.; KRAUTHAMMER, M.; TUCK, D.; SLACK, F. J.; WEIDHAAS, J. B. MicroRNA signatures differentiate melanoma subtypes. **Cell Cycle**, v. 10, n. 11, p. 1845-52, Jun 1 2011.

CHAN, J. A.; KRICHEVSKY, A. M.; KOSIK, K. S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6029-33, Jul 15 2005.

CHANG, E. H.; FURTH, M. E.; SCOLNICK, E. M.; LOWY, D. R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. **Nature**, v. 297, n. 5866, p. 479-83, Jun 10 1982.

CHANG, Y. S.; YEH, K. T.; HSU, N. C.; LIN, S. H.; CHANG, T. J.; CHANG, J. G. Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS primer multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific primer extension. **Clin Biochem**, v. 43, n. 3, p. 296-301, Feb 2010.

CHIANG, H. R.; SCHOENFELD, L. W.; RUBY, J. G.; AUYEUNG, V. C.; SPIES, N.; BAEK, D.; JOHNSTON, W. K.; RUSS, C.; LUO, S.; BABIARZ, J. E.; BLELLOCH, R.; SCHROTH, G. P.; NUSBAUM, C.; BARTEL, D. P. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. **Genes Dev**, v. 24, n. 10, p. 992-1009, May 15 2010.

CHIN, L. J.; RATNER, E.; LENG, S.; ZHAI, R.; NALLUR, S.; BABAR, I.; MULLER, R. U.; STRAKA, E.; SU, L.; BURKI, E. A.; CROWELL, R. E.; PATEL, R.; KULKARNI, T.; HOMER, R.; ZELTERMAN, D.; KIDD, K. K.; ZHU, Y.; CHRISTIANI, D. C.; BELINSKY, S. A.; SLACK, F. J.; WEIDHAAS, J. B. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. **Cancer Res**, v. 68, n. 20, p. 8535-40, Oct 15 2008.

CHOW, T. F.; YOUSSEF, Y. M.; LIANIDOU, E.; ROMASCHIN, A. D.; HONEY, R. J.; STEWART, R.; PACE, K. T.; YOUSEF, G. M. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. **Clin Biochem**, v. 43, n. 1-2, p. 150-8, Jan 2010.

CIMMINO, A.; CALIN, G. A.; FABBRI, M.; IORIO, M. V.; FERRACIN, M.; SHIMIZU, M.; WOJCIK, S. E.; AQEILAN, R. I.; ZUPO, S.; DONO, M.; RASSENTI, L.; ALDER, H.; VOLINIA, S.; LIU, C. G.; KIPPS, T. J.; NEGRINI, M.; CROCE, C. M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 39, p. 13944-9, Sep 27 2005.

CLARKE, S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. **Annu Rev Biochem**, v. 61, p. 355-86, 1992.

COWLEY, S.; PATERSON, H.; KEMP, P.; MARSHALL, C. J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. **Cell**, v. 77, n. 6, p. 841-52, Jun 17 1994.

DASCHKEY, S.; ROTTGERS, S.; GIRI, A.; BRADTKE, J.; TEIGLER-SCHLEGEL, A.; MEISTER, G.; BORKHARDT, A.; LANDGRAF, P. MicroRNAs distinguish cytogenetic subgroups in pediatric AML and contribute to complex regulatory networks in AML-relevant pathways. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56334, 2013.

DAVIS, M. E.; ZUCKERMAN, J. E.; CHOI, C. H.; SELIGSON, D.; TOLCHER, A.; ALABI, C. A.; YEN, Y.; HEIDEL, J. D.; RIBAS, A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1067-70, Apr 15 2010.

DER, C. J.; KRONTIRIS, T. G.; COOPER, G. M. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 11, p. 3637-40, Jun 1982.

DEVER, T. E.; GLYNIAS, M. J.; MERRICK, W. C. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 7, p. 1814-8, Apr 1987.

DIEBEL, K. W.; SMITH, A. L.; VAN DYK, L. F. Mature and functional viral miRNAs transcribed from novel RNA polymerase III promoters. **RNA**, v. 16, n. 1, p. 170-85, Jan 2010.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11-22, Jan 2003.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 8, p. 606-19, Aug 2006.

FABBRI, M.; PAONE, A.; CALORE, F.; GALLI, R.; GAUDIO, E.; SANTHANAM, R.; LOVAT, F.; FADDA, P.; MAO, C.; NUOVO, G. J.; ZANESI, N.; CRAWFORD, M.; OZER, G. H.; WERNICKE, D.; ALDER, H.; CALIGIURI, M. A.; NANA-SINKAM, P.; PERROTTI, D.; CROCE, C. M. MicroRNAs bind to Toll-like

receptors to induce prometastatic inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 31, p. E2110-6, Jul 31 2012.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 2, p. 102-14, Feb 2008.

FIORDALISI, J. J.; JOHNSON, R. L., 2ND; WEINBAUM, C. A.; SAKABE, K.; CHEN, Z.; CASEY, P. J.; COX, A. D. High affinity for farnesyltransferase and alternative prenylation contribute individually to K-Ras4B resistance to farnesyltransferase inhibitors. **J Biol Chem**, v. 278, n. 43, p. 41718-27, Oct 24 2003.

FISHER, G. H.; WELLEN, S. L.; KLIMSTRA, D.; LENCZOWSKI, J. M.; TICHELAAR, J. W.; LIZAK, M. J.; WHITSETT, J. A.; KORETSKY, A.; VARMUS, H. E. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. **Genes Dev**, v. 15, n. 24, p. 3249-62, Dec 15 2001.

FLEMING, J. B.; SHEN, G. L.; HOLLOWAY, S. E.; DAVIS, M.; BREKKEN, R. A. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. **Mol Cancer Res**, v. 3, n. 7, p. 413-23, Jul 2005.

FRAMPTON, A. E.; KRELL, J.; GALL, T. M.; CASTELLANO, L.; STEBBING, J.; JIAO, L. R. miR-15b and miR-17 Are Tumor-Derived Plasma MicroRNAs Dysregulated in Colorectal Neoplasia. **Ann Surg**, Mar 18 2014.

FREZZETTI, D.; DE MENNA, M.; ZOPPOLI, P.; GUERRA, C.; FERRARO, A.; BELLO, A. M.; DE LUCA, P.; CALABRESE, C.; FUSCO, A.; CECCARELLI, M.; ZOLLO, M.; BARBACID, M.; DI LAURO, R.; DE VITA, G. Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. **Oncogene**, v. 30, n. 3, p. 275-86, Jan 20 2011.

FRIDAY, B. B.; ADJEI, A. A. K-ras as a target for cancer therapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1756, n. 2, p. 127-44, Nov 25 2005.

FUJITA, A.; SATO, J. R.; RODRIGUES LDE, O.; FERREIRA, C. E.; SOGAYAR, M. C. Evaluating different methods of microarray data normalization. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 469, 2006.

FUKUYAMA, Y.; MITSUDOMI, T.; SUGIO, K.; ISHIDA, T.; AKAZAWA, K.; SUGIMACHI, K. K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v. 75, n. 8, p. 1125-30, 1997.

GANDELLINI, P.; PROFUMO, V.; FOLINI, M.; ZAFFARONI, N. MicroRNAs as new therapeutic targets and tools in cancer. **Expert Opin Ther Targets**, v. 15, n. 3, p. 265-79, Mar 2011.

GAROFALO, M.; CROCE, C. M. MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance. **Drug Resist Updat**, v. 16, n. 3-5, p. 47-59, Jul-Nov 2013.

GARZON, R.; HEAPHY, C. E.; HAVELANGE, V.; FABBRI, M.; VOLINIA, S.; TSAO, T.; ZANESI, N.; KORNBLAU, S. M.; MARCUCCI, G.; CALIN, G. A.; ANDREEFF, M.; CROCE, C. M. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 114, n. 26, p. 5331-41, Dec 17 2009.

GJERTSEN, M. K.; BAKKA, A.; BREIVIK, J.; SAETERDAL, I.; SOLHEIM, B. G.; SOREIDE, O.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell

responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation. **Lancet**, v. 346, n. 8987, p. 1399-400, Nov 25 1995.

GJERTSEN, M. K.; BUANES, T.; ROSSELAND, A. R.; BAKKA, A.; GLADHAUG, I.; SOREIDE, O.; ERIKSEN, J. A.; MOLLER, M.; BAKSAAS, I.; LOTHE, R. A.; SAETERDAL, I.; GAUDERNACK, G. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. **Int J Cancer**, v. 92, n. 3, p. 441-50, May 1 2001.

GOTO, K.; OUE, N.; SHINMEI, S.; SENTANI, K.; SAKAMOTO, N.; NAITO, Y.; HAYASHI, T.; TEISHIMA, J.; MATSUBARA, A.; YASUI, W. Expression of is a potential prognostic factor after nephrectomy in advanced renal cell carcinoma. **Mol Clin Oncol**, v. 1, n. 2, p. 235-240, Mar 2013.

GRAZIANO, S. L.; GAMBLE, G. P.; NEWMAN, N. B.; ABBOTT, L. Z.; ROONEY, M.; MOOKHERJEE, S.; LAMB, M. L.; KOHMAN, L. J.; POIESZ, B. J. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 2, p. 668-75, Feb 1999.

GREGORY, R. I.; YAN, K. P.; AMUTHAN, G.; CHENDRIMADA, T.; DORATOTAJ, B.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235-40, Nov 11 2004.

GRUNEWALD, K.; LYONS, J.; FROHLICH, A.; FEICHTINGER, H.; WEGER, R. A.; SCHWAB, G.; JANSSEN, J. W.; BARTRAM, C. R. High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. **Int J Cancer**, v. 43, n. 6, p. 1037-41, Jun 15 1989.

HAMAD, N. M.; ELCONIN, J. H.; KARNOUB, A. E.; BAI, W.; RICH, J. N.; ABRAHAM, R. T.; DER, C. J.; COUNTER, C. M. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. **Genes Dev**, v. 16, n. 16, p. 2045-57, Aug 15 2002.

HAN, M.; STERNBERG, P. W. let-60, a gene that specifies cell fates during C. elegans vulval induction, encodes a ras protein. **Cell**, v. 63, n. 5, p. 921-31, Nov 30 1990.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARVEY, J. J. AN UNIDENTIFIED VIRUS WHICH CAUSES THE RAPID PRODUCTION OF TUMOURS IN MICE. **Nature**, v. 204, p. 1104-5, Dec 12 1964.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 7, p. 522-31, Jul 2004.

HILGER, R. A.; SCHEULEN, M. E.; STRUMBERG, D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. **Onkologie**, v. 25, n. 6, p. 511-8, Dec 2002.

HOBEL, S.; AIGNER, A. Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 5, n. 5, p. 484-501, Sep-Oct 2013.

HOFSLI, E.; SJURSEN, W.; PRESTVIK, W. S.; JOHANSEN, J.; RYE, M.; TRANO, G.; WASMUTH, H. H.; HATLEVOLL, I.; THOMMESEN, L. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer. **Br J Cancer**, v. 108, n. 8, p. 1712-9, Apr 30 2013.

HRUBAN, R. H.; VAN MANSFELD, A. D.; OFFERHAUS, G. J.; VAN WEERING, D. H.; ALLISON, D. C.; GOODMAN, S. N.; KENSLER, T. W.; BOSE, K. K.; CAMERON, J. L.; BOS, J. L. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. **Am J Pathol**, v. 143, n. 2, p. 545-54, Aug 1993.

HUANG, C. L.; TAKI, T.; ADACHI, M.; KONISHI, T.; HIGASHIYAMA, M.; KINOSHITA, M.; HADAMA, T.; MIYAKE, M. Mutations of p53 and K-ras genes as prognostic factors for non-small cell lung cancer. **Int J Oncol**, v. 12, n. 3, p. 553-63, Mar 1998.

JACKSON, E. L.; WILLIS, N.; MERCER, K.; BRONSON, R. T.; CROWLEY, D.; MONTOYA, R.; JACKS, T.; TUVESON, D. A. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. **Genes Dev**, v. 15, n. 24, p. 3243-8, Dec 15 2001.

JIANG, J.; LEE, E. J.; GUSEV, Y.; SCHMITTGEN, T. D. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 17, p. 5394-403, 2005.

JIAO, L. R.; FRAMPTON, A. E.; JACOB, J.; PELLEGRINO, L.; KRELL, J.; GIAMAS, G.; TSIM, N.; VLAVIANOS, P.; COHEN, P.; AHMAD, R.; KELLER, A.; HABIB, N. A.; STEBBING, J.; CASTELLANO, L. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32068, 2012.

JOHNSON, S. M.; GROSSHANS, H.; SHINGARA, J.; BYROM, M.; JARVIS, R.; CHENG, A.; LABOURIER, E.; REINERT, K. L.; BROWN, D.; SLACK, F. J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 635-47, Mar 11 2005.

KANASTY, R.; DORKIN, J. R.; VEGAS, A.; ANDERSON, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. **Nat Mater**, v. 12, n. 11, p. 967-77, Nov 2013.

KATO, K.; COX, A. D.; HISAKA, M. M.; GRAHAM, S. M.; BUSS, J. E.; DER, C. J. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 14, p. 6403-7, Jul 15 1992.

KEOHAVONG, P.; DEMICHELE, M. A.; MELACRINOS, A. C.; LANDRENEAU, R. J.; WEYANT, R. J.; SIEGFRIED, J. M. Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 2, n. 2, p. 411-8, Feb 1996.

KIM, J. S.; PARK, S. Y.; LEE, S. A.; PARK, M. G.; YU, S. K.; LEE, M. H.; PARK, M. R.; KIM, S. G.; OH, J. S.; LEE, S. Y.; KIM, C. S.; KIM, H. J.; CHUN, H. S.; MOON, S. M.; KIM DO, K. MicroRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell. **Mol Cell Biochem**, v. 387, n. 1-2, p. 71-9, Feb 2014.

KONISHI, H.; ICHIKAWA, D.; KOMATSU, S.; SHIOZAKI, A.; TSUJIURA, M.; TAKESHITA, H.; MORIMURA, R.; NAGATA, H.; ARITA, T.; KAWAGUCHI, T.; HIRASHIMA, S.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, K.; OTSUJI, E. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. **Br J Cancer**, v. 106, n. 4, p. 740-7, Feb 14 2012.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D152-7, Jan 2011.

KUMAR, M. S.; ERKELAND, S. J.; PESTER, R. E.; CHEN, C. Y.; EBERT, M. S.; SHARP, P. A.; JACKS, T. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 10, p. 3903-8, Mar 11 2008.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-8, Oct 26 2001.

LANDGRAF, P.; RUSU, M.; SHERIDAN, R.; SEWER, A.; IOVINO, N.; ARAVIN, A.; PFEFFER, S.; RICE, A.; KAMPHORST, A. O.; LANDTHALER, M.; LIN, C.; SOCCI, N. D.; HERMIDA, L.; FULCI, V.; CHIARETTI, S.; FOA, R.; SCHLIWKA, J.; FUCHS, U.; NOVOSSEL, A.; MULLER, R. U.; SCHERMER, B.; BISSELS, U.; INMAN, J.; PHAN, Q.; CHIEN, M.; WEIR, D. B.; CHOKSI, R.; DE VITA, G.; FREZZETTI, D.; TROMPETER, H. I.; HORNUNG, V.; TENG, G.; HARTMANN, G.; PALKOVITS, M.; DI LAURO, R.; WERNET, P.; MACINO, G.; ROGLER, C. E.; NAGLE, J. W.; JU, J.; PAPAVALASIOU, F. N.; BENZING, T.; LICHTER, P.; TAM, W.; BROWNSTEIN, M. J.; BOSIO, A.; BORKHARDT, A.; RUSSO, J. J.; SANDER, C.; ZAVOLAN, M.; TUSCHL, T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1401-14, Jun 29 2007.

LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858-62, Oct 26 2001.

LEE, S. T.; CHU, K.; OH, H. J.; IM, W. S.; LIM, J. Y.; KIM, S. K.; PARK, C. K.; JUNG, K. H.; LEE, S. K.; KIM, M.; ROH, J. K. Let-7 microRNA inhibits the proliferation of human glioblastoma cells. **J Neurooncol**, v. 102, n. 1, p. 19-24, Mar 2011.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-9, Sep 25 2003.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v. 23, n. 20, p. 4051-60, Oct 13 2004.

LEREBOURS, F.; CIZERON-CLAIRAC, G.; SUSINI, A.; VACHER, S.; MOURET-FOURME, E.; BELICHARD, C.; BRAIN, E.; ALBERINI, J. L.; SPYRATOS, F.; LIDEREAU, R.; BIECHE, I. miRNA expression profiling of inflammatory breast cancer identifies a 5-miRNA signature predictive of breast tumor aggressiveness. **Int J Cancer**, v. 133, n. 7, p. 1614-23, Oct 1 2013.

LI, Y.; WANG, H.; TAO, K.; XIAO, Q.; HUANG, Z.; ZHONG, L.; CAO, W.; WEN, J.; FENG, W. miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 8, p. 1094-101, May 1 2013.

LIU, L.; NIE, J.; CHEN, L.; DONG, G.; DU, X.; WU, X.; TANG, Y.; HAN, W. The oncogenic role of microRNA-130a/301a/454 in human colorectal cancer via targeting Smad4 expression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55532, 2013.

LIU, Y.; DING, Y.; HUANG, J.; WANG, S.; NI, W.; GUAN, J.; LI, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, B.; CHEN, L. MiR-141 Suppresses the Migration and Invasion of HCC Cells by Targeting Tiam1. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88393, 2014.

LOBELL, R. B.; LIU, D.; BUSER, C. A.; DAVIDE, J. P.; DEPUY, E.; HAMILTON, K.; KOBLAN, K. S.; LEE, Y.; MOSSER, S.; MOTZEL, S. L.; ABBRUZZESE, J. L.; FUCHS, C. S.; ROWINSKY, E. K.; RUBIN, E. H.; SHARMA, S.; DEUTSCH, P. J.; MAZINA, K. E.; MORRISON, B. W.; WILDONGER, L.; YAO, S. L.

KOHL, N. E. Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778,123, a dual inhibitor of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase type-I. **Mol Cancer Ther**, v. 1, n. 9, p. 747-58, Jul 2002.

LOBELL, R. B.; OMER, C. A.; ABRAMS, M. T.; BHIMNATHWALA, H. G.; BRUCKER, M. J.; BUSER, C. A.; DAVIDE, J. P.; DESOLMS, S. J.; DINSMORE, C. J.; ELLIS-HUTCHINGS, M. S.; KRAL, A. M.; LIU, D.; LUMMA, W. C.; MACHOTKA, S. V.; RANDS, E.; WILLIAMS, T. M.; GRAHAM, S. L.; HARTMAN, G. D.; OLIFF, A. I.; HEIMBROOK, D. C.; KOHL, N. E. Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. **Cancer Res**, v. 61, n. 24, p. 8758-68, Dec 15 2001.

LOHR, M.; KLOPPEL, G.; MAISONNEUVE, P.; LOWENFELS, A. B.; LUTTGES, J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. **Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 17-23, Jan 2005.

LOWY, D. R.; WILLUMSEN, B. M. Function and regulation of ras. **Annu Rev Biochem**, v. 62, p. 851-91, 1993.

LUNDBERG, A. S.; RANDELL, S. H.; STEWART, S. A.; ELENBAAS, B.; HARTWELL, K. A.; BROOKS, M. W.; FLEMING, M. D.; OLSEN, J. C.; MILLER, S. W.; WEINBERG, R. A.; HAHN, W. C. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. **Oncogene**, v. 21, n. 29, p. 4577-86, Jul 4 2002.

MAJID, S.; SAINI, S.; DAR, A. A.; HIRATA, H.; SHAHRYARI, V.; TANAKA, Y.; YAMAMURA, S.; UENO, K.; ZAMAN, M. S.; SINGH, K.; CHANG, I.; DENG, G.; DAHIYA, R. MicroRNA-205 inhibits Src-mediated oncogenic pathways in renal cancer. **Cancer Res**, v. 71, n. 7, p. 2611-21, Apr 1 2011.

MANSOUR, S. J.; MATTEN, W. T.; HERMANN, A. S.; CANDIA, J. M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE WOUDE, G. F.; AHN, N. G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science**, v. 265, n. 5174, p. 966-70, Aug 12 1994.

MASCAUX, C.; IANNINO, N.; MARTIN, B.; PAESMANS, M.; BERGHMANS, T.; DUSART, M.; HALLER, A.; LOTHAIRE, P.; MEERT, A. P.; NOEL, S.; LAFITTE, J. J.; SCULIER, J. P. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 92, n. 1, p. 131-9, Jan 17 2005.

MASLIAH-PLANCHON, J.; PASMANT, E.; LUSCAN, A.; LAURENDEAU, I.; ORTONNE, N.; HIVELIN, M.; VARIN, J.; VALEYRIE-ALLANORE, L.; DUMAINE, V.; LANTIERI, L.; LEROY, K.; PARFAIT, B.; WOLKENSTEIN, P.; VIDAUD, M.; VIDAUD, D.; BIECHE, I. MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. **BMC Genomics**, v. 14, p. 473, 2013.

MCDERMOTT, A. M.; MILLER, N.; WALL, D.; MARTYN, L. M.; BALL, G.; SWEENEY, K. J.; KERIN, M. J. Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87032, 2014.

MEDEMA, R. H.; KOPS, G. J.; BOS, J. L.; BURGERING, B. M. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 782-7, Apr 13 2000.

MIYAKE, M.; ADACHI, M.; HUANG, C.; HIGASHIYAMA, M.; KODAMA, K.; TAKI, T. A novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 14, p. 2397-404, Apr 8 1999.

MONTEYS, A. M.; SPENGLER, R. M.; WAN, J.; TECEDOR, L.; LENNOX, K. A.; XING, Y.; DAVIDSON, B. L. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. **RNA**, v. 16, n. 3, p. 495-505, Mar 2010.

MORGENZSTERN, D.; MCLEOD, H. L. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. **Anticancer Drugs**, v. 16, n. 8, p. 797-803, Sep 2005.

MORIYAMA, T.; OHUCHIDA, K.; MIZUMOTO, K.; YU, J.; SATO, N.; NABAE, T.; TAKAHATA, S.; TOMA, H.; NAGAI, E.; TANAKA, M. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 5, p. 1067-74, May 2009.

MOSAKHANI, N.; SARHADI, V. K.; BORZE, I.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L.; SUNDSTROM, J.; RISTAMAKI, R.; OSTERLUND, P.; KNUUTILA, S. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 51, n. 1, p. 1-9, Jan 2012.

MOTT, J. L.; KOBAYASHI, S.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. **Oncogene**, v. 26, n. 42, p. 6133-40, Sep 13 2007.

MOURELATOS, Z.; DOSTIE, J.; PAUSHKIN, S.; SHARMA, A.; CHARROUX, B.; ABEL, L.; RAPPSILBER, J.; MANN, M.; DREYFUSS, G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. **Genes Dev**, v. 16, n. 6, p. 720-8, Mar 15 2002.

MYATT, S. S.; WANG, J.; MONTEIRO, L. J.; CHRISTIAN, M.; HO, K. K.; FUSI, L.; DINA, R. E.; BROSENS, J. J.; GHAEM-MAGHAM, S.; LAM, E. W. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. **Cancer Res**, v. 70, n. 1, p. 367-77, Jan 1 2010.

NARDUCCI, M. G.; ARCELLI, D.; PICCHIO, M. C.; LAZZERI, C.; PAGANI, E.; SAMPOGNA, F.; SCALA, E.; FADDA, P.; CRISTOFOLETTI, C.; FACCHIANO, A.; FRONTANI, M.; MONOPOLI, A.; FERRACIN, M.; NEGRINI, M.; LOMBARDO, G. A.; CAPRINI, E.; RUSSO, G. MicroRNA profiling reveals that miR-21, miR486 and miR-214 are upregulated and involved in cell survival in Sezary syndrome. **Cell Death Dis**, v. 2, p. e151, 2011.

O'MAHONY, A. M.; GODINHO, B. M.; CRYAN, J. F.; O'DRISCOLL, C. M. Non-viral nanosystems for gene and small interfering RNA delivery to the central nervous system: formulating the solution. **J Pharm Sci**, v. 102, n. 10, p. 3469-84, Oct 2013.

OH, H. K.; TAN, A. L.; DAS, K.; OOI, C. H.; DENG, N. T.; TAN, I. B.; BEILLARD, E.; LEE, J.; RAMNARAYANAN, K.; RHA, S. Y.; PALANISAMY, N.; VOORHOEVE, P. M.; TAN, P. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 9, p. 2657-67, May 1 2011.

OKAMURA, K.; HAGEN, J. W.; DUAN, H.; TYLER, D. M.; LAI, E. C. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 89-100, Jul 13 2007.

OKUDELA, K.; WOO, T.; KITAMURA, H. KRAS gene mutations in lung cancer: particulars established and issues unresolved. **Pathol Int**, v. 60, n. 10, p. 651-60, Oct 2010.

OTA, T.; DOI, K.; FUJIMOTO, T.; TANAKA, Y.; OGAWA, M.; MATSUZAKI, H.; KUROKI, M.; MIYAMOTO, S.; SHIRASAWA, S.; TSUNODA, T. KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 6, p. 2271-5, Jun 2012.

OUYANG, H.; MOU, L.; LUK, C.; LIU, N.; KARASKOVA, J.; SQUIRE, J.; TSAO, M. S. Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. **Am J Pathol**, v. 157, n. 5, p. 1623-31, Nov 2000.

OZSOLAK, F.; POLING, L. L.; WANG, Z.; LIU, H.; LIU, X. S.; ROEDER, R. G.; ZHANG, X.; SONG, J. S.; FISHER, D. E. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. **Genes Dev**, v. 22, n. 22, p. 3172-83, Nov 15 2008.

PANDEY, D. P.; PICARD, D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 13, p. 3783-90, Jul 2009.

PENG, Y.; DAI, Y.; HITCHCOCK, C.; YANG, X.; KASSIS, E. S.; LIU, L.; LUO, Z.; SUN, H. L.; CUI, R.; WEI, H.; KIM, T.; LEE, T. J.; JEON, Y. J.; NUOVO, G. J.; VOLINIA, S.; HE, Q.; YU, J.; NANA-SINKAM, P.; CROCE, C. M. Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 37, p. 15043-8, Sep 10 2013.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

PFEFFER, S.; SEWER, A.; LAGOS-QUINTANA, M.; SHERIDAN, R.; SANDER, C.; GRASSER, F. A.; VAN DYK, L. F.; HO, C. K.; SHUMAN, S.; CHIEN, M.; RUSSO, J. J.; JU, J.; RANDALL, G.; LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M.; SIMON, V.; HO, D. D.; ZAVOLAN, M.; TUSCHL, T. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. **Nat Methods**, v. 2, n. 4, p. 269-76, Apr 2005.

PICHLER, M.; WINTER, E.; STOTZ, M.; EBERHARD, K.; SAMONIGG, H.; LAX, S.; HOEFLE, G. Down-regulation of KRAS-interacting miRNA-143 predicts poor prognosis but not response to EGFR-targeted agents in colorectal cancer. **Br J Cancer**, v. 106, n. 11, p. 1826-32, May 22 2012.

PORKKA, K. P.; PFEIFFER, M. J.; WALTERING, K. K.; VESSELLA, R. L.; TAMMELA, T. L.; VISAKORPI, T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. **Cancer Res**, v. 67, n. 13, p. 6130-5, Jul 1 2007.

PRATT, A. J.; MACRAE, I. J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. **J Biol Chem**, v. 284, n. 27, p. 17897-901, Jul 3 2009.

PUIG, P.; URGELL, E.; CAPELLA, G.; SANCHEZ, F. J.; PUJOL, J.; BOADAS, J.; FARRE, A.; LLUIS, F.; GONZALEZ-SASTRE, F.; MORA, J. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. **Int J Cancer**, v. 85, n. 1, p. 73-7, Jan 1 2000.

QIN, J.; LUO, M. MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK. **FEBS Lett**, v. 588, n. 1, p. 99-104, Jan 3 2014.

RAGUSA, M.; MAJORANA, A.; STATELLO, L.; MAUGERI, M.; SALITO, L.; BARBAGALLO, D.; GUGLIELMINO, M. R.; DURO, L. R.; ANGELICA, R.; CALTABIANO, R.; BIONDI, A.; DI VITA, M.; PRIVITERA, G.; SCALIA, M.; CAPPELLANI, A.; VASQUEZ, E.; LANZAFAME, S.; BASILE, F.; DI

PIETRO, C.; PURRELLO, M. Specific alterations of microRNA transcriptome and global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment. **Mol Cancer Ther**, v. 9, n. 12, p. 3396-409, Dec 2010.

RAMASWAMY, S.; NAKAMURA, N.; SANSAL, I.; BERGERON, L.; SELLERS, W. R. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. **Cancer Cell**, v. 2, n. 1, p. 81-91, Jul 2002.

RAPONI, M.; ZHANG, Y.; YU, J.; CHEN, G.; LEE, G.; TAYLOR, J. M.; MACDONALD, J.; THOMAS, D.; MOSKALUK, C.; WANG, Y.; BEER, D. G. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. **Cancer Res**, v. 66, n. 15, p. 7466-72, Aug 1 2006.

RATNER, E.; LU, L.; BOEKE, M.; BARNETT, R.; NALLUR, S.; CHIN, L. J.; PELLETIER, C.; BLITZBLAU, R.; TASSI, R.; PARANJAPPE, T.; HUI, P.; GODWIN, A. K.; YU, H.; RISCH, H.; RUTHERFORD, T.; SCHWARTZ, P.; SANTIN, A.; MATLOFF, E.; ZELTERMAN, D.; SLACK, F. J.; WEIDHAAS, J. B. A KRAS-variant in ovarian cancer acts as a genetic marker of cancer risk. **Cancer Res**, v. 70, n. 16, p. 6509-15, Aug 15 2010.

RATNER, E. S.; KEANE, F. K.; LINDNER, R.; TASSI, R. A.; PARANJAPPE, T.; GLASGOW, M.; NALLUR, S.; DENG, Y.; LU, L.; STEELE, L.; SAND, S.; MULLER, R. U.; BIGNOTTI, E.; BELLONE, S.; BOEKE, M.; YAO, X.; PECORELLI, S.; RAVAGGI, A.; KATSAROS, D.; ZELTERMAN, D.; CRISTEA, M. C.; YU, H.; RUTHERFORD, T. J.; WEITZEL, J. N.; NEUHAUSEN, S. L.; SCHWARTZ, P. E.; SLACK, F. J.; SANTIN, A. D.; WEIDHAAS, J. B. A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 42, p. 4559-66, Oct 18 2012.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-6, Feb 24 2000.

RIBAS, J.; NI, X.; HAFFNER, M.; WENTZEL, E. A.; SALMASI, A. H.; CHOWDHURY, W. H.; KUDROLLI, T. A.; YEGNASUBRAMANIAN, S.; LUO, J.; RODRIGUEZ, R.; MENDELL, J. T.; LUPOLD, S. E. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. **Cancer Res**, v. 69, n. 18, p. 7165-9, Sep 15 2009.

RIELY, G. J.; KRIS, M. G.; ROSENBAUM, D.; MARKS, J.; LI, A.; CHITALE, D. A.; NAFA, K.; RIEDEL, E. R.; HSU, M.; PAO, W.; MILLER, V. A.; LADANYI, M. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 18, p. 5731-4, Sep 15 2008.

RIELY, G. J.; MARKS, J.; PAO, W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. **Proc Am Thorac Soc**, v. 6, n. 2, p. 201-5, Apr 15 2009.

ROA, W.; BRUNET, B.; GUO, L.; AMANIE, J.; FAIRCHILD, A.; GABOS, Z.; NIJJAR, T.; SCRIMGER, R.; YEE, D.; XING, J. Identification of a new microRNA expression profile as a potential cancer screening tool. **Clin Invest Med**, v. 33, n. 2, p. E124, 2010.

ROBERTS, P. J.; STINCHCOMBE, T. E.; DER, C. J.; SOCINSKI, M. A. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? **J Clin Oncol**, v. 28, n. 31, p. 4769-77, Nov 1 2010.

ROTH, C.; RACK, B.; MULLER, V.; JANNI, W.; PANTEL, K.; SCHWARZENBACH, H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 6, p. R90, 2010.

ROTH, P.; WISCHHUSEN, J.; HAPPOLD, C.; CHANDRAN, P. A.; HOFER, S.; EISELE, G.; WELLER, M.; KELLER, A. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. **J Neurochem**, v. 118, n. 3, p. 449-57, Aug 2011.

RUBY, J. G.; JAN, C. H.; BARTEL, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature**, v. 448, n. 7149, p. 83-6, Jul 5 2007.

RUI, W.; BING, F.; HAI-ZHU, S.; WEI, D.; LONG-BANG, C. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1). **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 1-2, p. 206-14, Jan 2010.

SAMPSON, V. B.; RONG, N. H.; HAN, J.; YANG, Q.; ARIS, V.; SOTEROPOULOS, P.; PETRELLI, N. J.; DUNN, S. P.; KRUEGER, L. J. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. **Cancer Res**, v. 67, n. 20, p. 9762-70, Oct 15 2007.

SCHMIDT, M.; FERNANDEZ DE MATTOS, S.; VAN DER HORST, A.; KLOMPMAKER, R.; KOPS, G. J.; LAM, E. W.; BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 22, p. 7842-52, Nov 2002.

SEIKE, M.; GOTO, A.; OKANO, T.; BOWMAN, E. D.; SCHETTER, A. J.; HORIKAWA, I.; MATHE, E. A.; JEN, J.; YANG, P.; SUGIMURA, H.; GEMMA, A.; KUDOH, S.; CROCE, C. M.; HARRIS, C. C. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 29, p. 12085-90, Jul 21 2009.

SEITZ, H.; ROYO, H.; BORTOLIN, M. L.; LIN, S. P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; CAVAILLE, J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. **Genome Res**, v. 14, n. 9, p. 1741-8, Sep 2004.

SHIN, K. H.; BAE, S. D.; HONG, H. S.; KIM, R. H.; KANG, M. K.; PARK, N. H. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 404, n. 4, p. 896-902, Jan 28 2011.

SHINOZUKA, E.; MIYASHITA, M.; MIZUGUCHI, Y.; AKAGI, I.; KIKUCHI, K.; MAKINO, H.; MATSUTANI, T.; HAGIWARA, N.; NOMURA, T.; UCHIDA, E.; TAKIZAWA, T. SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 1, p. 101-6, Jan 4 2013.

SI, M. L.; ZHU, S.; WU, H.; LU, Z.; WU, F.; MO, Y. Y. miR-21-mediated tumor growth. **Oncogene**, v. 26, n. 19, p. 2799-803, Apr 26 2007.

SIMON, M. A.; BOWTELL, D. D.; DODSON, G. S.; LAVERTY, T. R.; RUBIN, G. M. Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. **Cell**, v. 67, n. 4, p. 701-16, Nov 15 1991.

SINGH, A.; GRENINGER, P.; RHODES, D.; KOOPMAN, L.; VIOLETTE, S.; BARDEESY, N.; SETTLEMAN, J. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. **Cancer Cell**, v. 15, n. 6, p. 489-500, Jun 2 2009.

SLEBOS, R. J.; KIBBELAAR, R. E.; DALESIO, O.; KOOISTRA, A.; STAM, J.; MEIJER, C. J.; WAGENAAR, S. S.; VANDERSCHUEREN, R. G.; VAN ZANDWIJK, N.; MOOI, W. J.; ET AL. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. **N Engl J Med**, v. 323, n. 9, p. 561-5, Aug 30 1990.

SMALL, E. M.; O'ROURKE, J. R.; MORESI, V.; SUTHERLAND, L. B.; MCANALLY, J.; GERARD, R. D.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 9, p. 4218-23, Mar 2 2010.

SOLOMIDES, C. C.; EVANS, B. J.; NAVENOT, J. M.; VADIGEPALLI, R.; PEIPER, S. C.; WANG, Z. X. MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis. **Acta Cytol**, v. 56, n. 6, p. 645-54, 2012.

SONG, Q.; XU, Y.; YANG, C.; CHEN, Z.; JIA, C.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; LAI, P.; FAN, X.; ZHOU, X.; LIN, J.; LI, M.; MA, W.; LUO, S.; BAI, X. miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. **Cancer Res**, Apr 7 2014.

TAN, X.; QIN, W.; ZHANG, L.; HANG, J.; LI, B.; ZHANG, C.; WAN, J.; ZHOU, F.; SHAO, K.; SUN, Y.; WU, J.; ZHANG, X.; QIU, B.; LI, N.; SHI, S.; FENG, X.; ZHAO, S.; WANG, Z.; ZHAO, X.; CHEN, Z.; MITCHELSON, K.; CHENG, J.; GUO, Y.; HE, J. A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 21, p. 6802-11, Nov 1 2011.

THU, K. L.; VUCIC, E. A.; CHARI, R.; ZHANG, W.; LOCKWOOD, W. W.; ENGLISH, J. C.; FU, R.; WANG, P.; FENG, Z.; MACAULAY, C. E.; GAZDAR, A. F.; LAM, S.; LAM, W. L. Lung adenocarcinoma of never smokers and smokers harbor differential regions of genetic alteration and exhibit different levels of genomic instability. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33003, 2012.

TSANG, W. P.; KWOK, T. T. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 6, p. 953-9, Jun 2009.

UENO, K.; HIRATA, H.; SHAHRYARI, V.; DENG, G.; TANAKA, Y.; TABATABAI, Z. L.; HINODA, Y.; DAHIYA, R. microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. **Br J Cancer**, v. 108, n. 8, p. 1659-67, Apr 30 2013.

VAN DEN BERG, A.; MOLS, J.; HAN, J. RISC-target interaction: cleavage and translational suppression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1779, n. 11, p. 668-77, Nov 2008.

VAN DER VOS, K. E.; COFFER, P. J. FOXO-binding partners: it takes two to tango. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2289-99, Apr 7 2008.

VAN KOUWENHOVE, M.; KEDDE, M.; AGAMI, R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 9, p. 644-56, Sep 2011.

VOLINIA, S.; CALIN, G. A.; LIU, C. G.; AMBS, S.; CIMMINO, A.; PETROCCA, F.; VISIONE, R.; IORIO, M.; ROLDO, C.; FERRACIN, M.; PRUEITT, R. L.; YANAIHARA, N.; LANZA, G.; SCARPA, A.; VECCHIONE, A.; NEGRINI, M.; HARRIS, C. C.; CROCE, C. M. A microRNA expression signature of

human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2257-61, Feb 14 2006.

VOLINIA, S.; GALASSO, M.; SANA, M. E.; WISE, T. F.; PALATINI, J.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 8, p. 3024-9, Feb 21 2012.

VOSA, U.; VOODER, T.; KOLDE, R.; VILO, J.; METSPALU, A.; ANNILO, T. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. **Int J Cancer**, v. 132, n. 12, p. 2884-93, Jun 15 2013.

WALDMAN, S. A.; TERZIC, A. A study of microRNAs in silico and in vivo: diagnostic and therapeutic applications in cancer. **FEBS J**, v. 276, n. 8, p. 2157-64, Apr 2009.

WALTER, B. A.; GOMEZ-MACIAS, G.; VALERA, V. A.; SOBEL, M.; MERINO, M. J. miR-21 Expression in Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Possible Marker of Poor Prognosis. **J Cancer**, v. 2, p. 67-75, 2011.

WANG, J.; LIU, S.; SUN, G. P.; WANG, F.; ZOU, Y. F.; JIAO, Y.; NING, J.; XU, J. Prognostic significance of microRNA-221/222 expression in cancers: evidence from 1,204 subjects. **Int J Biol Markers**, p. 0, Jan 20 2014.

WANG, J.; TIAN, X.; HAN, R.; ZHANG, X.; WANG, X.; SHEN, H.; XUE, L.; LIU, Y.; YAN, X.; SHEN, J.; MANNOOR, K.; DEEPAK, J.; DONAHUE, J. M.; STASS, S. A.; XING, L.; JIANG, F. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 9, p. 1181-9, Feb 27 2014.

WEISS, G. J.; BEMIS, L. T.; NAKAJIMA, E.; SUGITA, M.; BIRKS, D. K.; ROBINSON, W. A.; VARELLA-GARCIA, M.; BUNN, P. A., JR.; HANEY, J.; HELFRICH, B. A.; KATO, H.; HIRSCH, F. R.; FRANKLIN, W. A. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. **Ann Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1053-9, Jun 2008.

WEN, S. Y.; LIN, Y.; YU, Y. Q.; CAO, S. J.; ZHANG, R.; YANG, X. M.; LI, J.; ZHANG, Y. L.; WANG, Y. H.; MA, M. Z.; SUN, W. W.; LOU, X. L.; WANG, J. H.; TENG, Y. C.; ZHANG, Z. G. miR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer. **Oncogene**, Mar 10 2014.

WU, Y.; CRAWFORD, M.; MAO, Y.; LEE, R. J.; DAVIS, I. C.; ELTON, T. S.; LEE, L. J.; NANA-SINKAM, S. P. Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer. **Mol Ther Nucleic Acids**, v. 2, p. e84, 2013.

WU, Z.; HUANG, X.; ZOU, Q.; GUO, Y. The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 32, n. 1, p. 98, 2013.

XIAO, H.; LI, H.; YU, G.; XIAO, W.; HU, J.; TANG, K.; ZENG, J.; HE, W.; ZENG, G.; YE, Z.; XU, H. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 and HOXD10 in human bladder cancer. **Oncol Rep**, v. 31, n. 4, p. 1832-8, Apr 2014.

XU, J.; LI, R.; WORKENEH, B.; DONG, Y.; WANG, X.; HU, Z. Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486. **Kidney Int**, v. 82, n. 4, p. 401-11, Aug 2012.

YANAIHARA, N.; CAPLEN, N.; BOWMAN, E.; SEIKE, M.; KUMAMOTO, K.; YI, M.; STEPHENS, R. M.; OKAMOTO, A.; YOKOTA, J.; TANAKA, T.; CALIN, G. A.; LIU, C. G.; CROCE, C. M.; HARRIS, C. C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 189-98, Mar 2006.

YANG, J.; LAN, H.; HUANG, X.; LIU, B.; TONG, Y. MicroRNA-126 inhibits tumor cell growth and its expression level correlates with poor survival in non-small cell lung cancer patients. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42978, 2012.

YU, J.; LI, A.; HONG, S. M.; HRUBAN, R. H.; GOGGINS, M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 4, p. 981-92, Feb 15 2012.

YU, L.; TODD, N. W.; XING, L.; XIE, Y.; ZHANG, H.; LIU, Z.; FANG, H.; ZHANG, J.; KATZ, R. L.; JIANG, F. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2870-8, Dec 15 2010.

ZHANG, K. L.; ZHOU, X.; HAN, L.; CHEN, L. Y.; CHEN, L. C.; SHI, Z. D.; YANG, M.; REN, Y.; YANG, J. X.; FRANK, T. S.; ZHANG, C. B.; ZHANG, J. X.; PU, P. Y.; ZHANG, J. N.; JIANG, T.; WAGNER, E. J.; LI, M.; KANG, C. S. MicroRNA-566 activates EGFR signaling and its inhibition sensitizes glioblastoma cells to nimotuzumab. **Mol Cancer**, v. 13, n. 1, p. 63, 2014.

ZHANG, X.; LI, M.; ZUO, K.; LI, D.; YE, M.; DING, L.; CAI, H.; FU, D.; FAN, Y.; LV, Z. Upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/beta-catenin signaling. **J Clin Endocrinol Metab**, Jun 24 2013.

ZHI, F.; CAO, X.; XIE, X.; WANG, B.; DONG, W.; GU, W.; LING, Y.; WANG, R.; YANG, Y.; LIU, Y. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56718, 2013.

SÚMULA CURRICULAR

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorando em Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
com período sanduíche em Alexander Fleming Institute (Orientador: Artemis Hatzigeorgiou)
Orientador: Daniela Sanchez Bassères
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008 - 2009** Mestrado em Patologia Experimental.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2007** Graduação em Biomedicina.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
Orientador: Profª. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Formação complementar

- 2013** Virologia Clássica versus molecular. VIRORED-CYTED, Argentina
- 2012** Monitoria em Bioquímica – IQ USP.
- 2011** Monitor do curso de Biologia Molecular Transformação Maligna – IQ USP.
- 2011** Monitoria em Biologia Molecular – IQ USP
- 2009** Temas avançados de Bioquímica e Biologia Molecular – IQ USP
- 2009** Biologia Molecular da transformação maligna – IQ USP
- 2009** IV temas avançados Bioquímica e Biologia Molecular – IQ USP
- 2008** Estágio em Biologia Celular e Molecular.
Prof. Dr. Christof R. Hauck; University of Konstanz, Alemanha
Bolsista do(a): The German Academic Exchange Service
- 2007** XII Curso de Verão em Genética - USP
- 2007** Monitoria em Bioquímica Dinâmica - UEL
- 2006** III Curso de verão em biologia celular e molecular - USP
- 2006** Monitoria em Bioquímica de Macromoléculas - UEL
- 2006** Curso de curta duração em Curso de Bioinformática - USP
- 2005** Tópicos avançados em análises moleculares - UEL

Atuação profissional

1. **Fiocruz - Instituto Carlos Chagas: 2013 - Atual** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Tecnologista em saúde pública
2. **IQ – USP: 2013 - Atual** Enquadramento funcional: Doutorando (sem bolsa)
3. **IQ – USP: 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorando
4. **IQ – USP: 2009 - 2011** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisador associado - Bolsista DTI
5. **Universidade Estadual de Londrina – UEL: 2005 - 2009** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estudante

Artigos completos publicados em periódicos

1. Magnani M., Castro-Gomez RH, **Aoki MN**, Gregório EP, Libos FM, Helena K., Reiche EM, Watanabe, MAE. Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). Natural Product Research (Print). , v.1, p.1 - 7, 2011.
2. Lima KW, Guembarovski RL, Oda JMM, Ramos G, Oliveira BV, Cavalli IJ, Souza RF, Enilze M, Gonçalves MSB, **Aoki MN**, Nunes SOV, Watanabe MAE. Association between the STin2 VNTR polymorphism and smoking behavior in oral cancer patients and healthy individuals. Clinical and Experimental Medicine (Testo stampato). , p.1 - 2, 2011.
3. **AOKI, M. N.**, AMARANTE, M. K., ODA, J. M. M., WATANABE, M. A. E. Caveolin Involvement and Modulation in Breast Cancer. Mini-Reviews in Medical Chemistry. , v.11, p.1143 - 1152, 2011.
4. Ehara Watanabe, Maria, **AOKI, M. N.** Human endogenous RNAs: Implications for the immunomodulation of Toll-like receptor 3. Experimental and Therapeutic Medicine. , p.1 - 5, 2011.
5. TATAKIHARA, R. I., AMARANTE, M. K., **AOKI, M. N.**, ODA, J. M. M., FUJITA, T. C., WATANABE, M. A. E. Determination of lactate dehydrogenase (LDH) and Bcr-Abl transcript in the follow-up of patients with chronic myeloid leukemia. Acta Scientiarum. Health Sciences (Impresso). , v.32, p.113 - 118, 2010.
6. MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R. H., **AOKI, M. N.**, GREGORIO, E. P., LIBOS JUNIOR, F., WATANABE, M. A. E. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. Experimental and Therapeutic Medicine. , p.859 - 862, 2010.
7. **AOKI, M. N.**, HERERRA, A. C. A., AMARANTE, M. K., LAINO, J. V. C., FUNGARO, M. H., WATANABE, M. A. E. CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: Implications in breast cancer development. International Journal of Molecular Medicine. , v.23, p.429 - 435, 2009.
8. LAINO, J. V. C., NIXDORF, S., MANTOVANI, M. S., HERERRA, A. C. A., **AOKI, M. N.**, AMARANTE, M. K., FABRIS, B., FUNGARO, M. H., WATANABE, M. A. E. Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. Journal of Cancer Research Clinical Oncology. , v.1, p.1 - , 2009.

9. MUXEL, S., BORELLI, S. D., AMARANTE, M. K., VOLTARELLI, J. C., **AOKI, M. N.**, OLIVEIRA, C. E. C., WATANABE, M. A. E. ASSOCIATION STUDY OF CCR5 DELTA 32 POLYMORPHISM IN HLA-DRB1 CAUCASIAN POPULATION IN NORTH OF PARANÁ, BRAZIL. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* , v.23, p.001 - , 2008.

10. OLIVEIRA, J. C., NASSER, T. F., ODA, J. M. M., **AOKI, M. N.**, LAINO, J. V. C., BARBOSA, D. S., REICHE, E. M. V., WATANABE, M. A. E. Detection of TTV in peripheral blood cells from patients with altered ALT and AST levels. *The New Microbiologica.* , v.31, p.195 - 201, 2008.

11. SUZUKI, P. S., OLIVEIRA, K. B., **AOKI, M. N.**, TATAKIHARA, V. L. H., BORELLI, S. D., WATANABE, M. A. E. Investigating the association of chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism with cervical cancer in human papillomavirus (HPV) positive patients. *Acta Scientiarum. Health Sciences.* , v.30, p.95 - , 2008.

12. WATANABE, M. A. E., A.K.M.B, MIQUELÃO, OLIVEIRA, C. E. C., OLIVEIRA, K. B., NASSER, T. F., **AOKI, M. N.**, SUZUKI, P. S., AMARANTE, M. K., AZEVEDO, E. Detection of GBV-C/HGV RNA in cervico-vaginal smears from healthy individuals. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* , v.2, p.1 - , 2007.

Idiomas:

Inglês (fluyente), espanhol (básico), alemão (básico)

MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

**Oncogenic K-Ras promotes lung cell
proliferation by up- regulating
microRNA486-5p**

**Mateus Nóbrega Aoki, Tatiana Correa Carneiro Lobo, Ana Cláudia O.
Carreira, Amanda Padilha Salviatto, Mari Cleide Sogayar and Daniela
S. Basseres^{#π}**

¹Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São
Paulo, SP, Brazil;

Running Title: microRNA486-5p is a K-Ras target in lung cancer

Keywords: Lung cancer, KRAS, microRNA486, FoxO1

#Financial support: This work was supported by a Young Investigator Grant (2010/52685-9) from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and a Universal Grant (MCT 479371/2011-3) from the National Research Council (CNPq) to D.S.B., by a FAPESP technical training fellowship to A.P.S. and by a FAPESP Ph.D. fellowship to M.N.A.

πSend correspondence to: Daniela S. Bassères, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes 748, Bloco 9 inferior, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. Phone: +1-55-11-3091-9805. FAX: +1-55-11-3091-2186. E-mail: basseres@iq.usp.br

ABSTRACT

Activating mutations in *KRAS* are prevalent in cancer, but therapies targeted to oncogenic RAS have been ineffective to date. These results argue that targeting downstream effectors of RAS will be an alternative route for blocking RAS-driven oncogenic pathways. Our goal was to identify microRNAs regulated by oncogenic K-Ras in lung cells that could contribute to the oncogenic phenotype. Due to a reported positive correlation between microRNA486-5p expression and the presence of K-Ras mutations in colon cancer specimens, we decided to investigate whether this microRNA could be a therapeutically relevant K-Ras target in lung cancer. Using both gain and loss of function approaches to manipulate expression of oncogenic K-Ras in lung cells, we determined that oncogenic K-Ras upregulates miRNA486-5p expression while it concomitantly downregulates expression of miR486-5p targets, including the tumor suppressor FoxO1. Next, we determined that when microRNA 486-5p is overexpressed in K-Ras wild type lung H1703 cells, it increases cell viability and growth, whereas inhibition of microRNA486-5p expression by RNA interference in K-Ras mutated lung cells A549 and H358 results in decreased growth, viability and proliferation. More importantly, using a K-Ras-inducible lung cell line, we determined that mir486-5p inhibition was able to prevent K-Ras-induced cell growth and proliferation, indicating that this microRNA makes an important contribution to the oncogenic phenotype driven by oncogenic K-ras. These results support the concept of targeting microRNA486-5p as a therapeutic approach for oncogenic Ras-driven tumors.

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide (Jemal et al, 2010) and even though novel targeted therapies have been developed that show efficacy for a subset of patients (Engelman et al, 2008; Gerber et al, 2010), for the great majority of lung cancer patients effective targeted therapies are still lacking. This is the case for the 20-50% of lung cancer patients that harbor activating point mutations in the *KRAS* GTPase gene (Westra et al, 1993; Gao et al, 1997; Vahakangas et al, 2001;). Therefore, identification of druggable targets in the *KRAS* signaling pathway could lead to novel therapeutic alternatives for lung cancer, as well as other RAS-driven cancers.

Constitutive, signal-independent activation of *KRAS* via mutation is not only associated with poor prognosis and therapy resistance in a variety of cancers, but is sufficient to trigger malignant transformation and drive the oncogenic phenotype (Adjei et al, 2008; Linardou et al, 2008). Therefore, *KRAS* is a rational target for cancer therapy. Unfortunately, due to the difficulty in effectively inhibiting the biological activity of RAS proteins, different approaches to directly target these proteins for therapy have been so far unsuccessful (Friday et al, 2005). In this regard, intense efforts are being made to target known downstream effectors of RAS (Engelman et al, 2008; Lim et al, 2006; Bodemann et al, 2008). So far this approach has yielded limited therapeutic success, thus reflecting the need to better understand the molecular pathways triggered by oncogenic RAS.

MicroRNAs (miRNAs) are 21-23 nts RNA molecules known to suppress translation of specific partially complementary mRNA targets through interactions

with Argonaute and RISC complex (Biasiolo et al, 2011; Kwak et al, 2010). MicroRNAs, not only play a crucial role in regulating human gene expression (Ambros et al, 2003; Bartel et al 2004), but also have, in recent years, emerged as key players in oncogenesis (He and Hannon; 2004). They have been shown to regulate important cellular functions, such as growth, differentiation and apoptosis (Xu et al, 2013; Nguyen et al, 2013; Chitnis et al, 2012). They are also involved in malignant transformation acting like tumor suppressors or oncogenes, and their expression is altered in cancer patients, suggesting that administering or targeting microRNAs might represent promising approaches for cancer therapy (Huang et al, 2012; You & Jones, 2012; Volinia et al; 2012).

Even though K-Ras regulation by miRNAs is well known, especially by the let7 family and by miRNA 143 (Christensen et al, 2009; Hu et al, 2012), miRNAs that are regulated by K-Ras are still largely unexplored. So far, there have been only three studies in colon cancer showing a correlation between the presence of K-Ras mutations and the expression of a handful of microRNAs (Ragusa et al; 2010; Mosakhani et al; 2011; Ota et al; 2012). Nonetheless, a causal relationship between the presence of oncogenic K-ras and altered expression of these microRNAs has not been established, and the role these microRNAs play in K-Ras induced oncogenesis has not been studied. Given lung cancer's lethality and given the lack of successful therapies for K-Ras-induced malignancies, identification of K-Ras regulated microRNAs in lung cells is important, as it may provide novel approaches for K-Ras-induced lung cancer therapy design.

The aim of this study was to identify microRNAs regulated by oncogenic K-Ras in lung cells that could contribute to the oncogenic phenotype. Given the reported correlation between K-Ras mutations and increased expression of microRNA486-5p in colon cancer specimens (Ragusa et al, 2010), and given that microRNA486-5p regulates the expression of important tumor suppressors, such as PTEN and FoxO1 (Small et al, 2010), we decided to investigate whether this microRNA could be a therapeutically relevant K-Ras target in lung cancer. First, using primary isogenic lung cell lines that differ only by expressing or not the oncogenic K-Ras12V isoform, we confirmed that microRNA 486-5p is positively correlated with oncogenic K-Ras. Next, by manipulating K-Ras expression in lung cells, we were able to show that oncogenic K-Ras up-regulates microRNA 486-5p expression and down-regulates expression of FoxO1, a microRNA486-5p target that is a well-known tumor suppressor. In addition, we determined that microRNA486-5p promotes oncogenesis, as it increased growth and viability of K-Ras wild type H1703 cells. Inhibition of microRNA486-5p expression by RNA interference resulted in reduced growth and viability of K-Ras mutant cell lines. Interestingly, this reduction in viability was not associated with increased apoptosis, but with reduced proliferation. More importantly, using a K-ras- inducible cell line, we were able to show that microRNA486-5p inhibition is able to reverse the oncogenic properties triggered by oncogenic K-Ras induction, without affecting uninduced cells. Our data indicate that K-Ras-induced miR-486-5p expression is an important oncogenic pathway, leading to inhibition FoxO1 expression and promoting oncogenic cell properties. It suggests that targeting microRNA486-5p might prove beneficial for K-Ras-induced lung cancer therapy.

METHODS

Cell culture. Cell passages were kept to a minimum and no cells were passaged continuously for more than six months. Low passage SALEB and SAKRAS cells were cultured in serum-free bronchial epithelium growth medium (BEGM, Clonetics-Lonza). These cells were originally selected in medium containing a triple antibiotic cocktail and subsequently characterized by real-time PCR for expression of the genes used for immortalization and transformation (28). Short Tandem Repeat-DNA profile authenticated NCI-H358, A549, NCI-H1703 cells were obtained from ATCC and maintained in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich).

Generation of a K-Ras inducible H1703 cell line. We used K-Ras wild-type H1703 cells to generate doxycycline inducible K-Ras-expressing cells (H1703/12V) and control (H1703/TrexB) according to the tREx System protocol (Invitrogen). Briefly, H1703 cells were transfected with pcDNA6-TR and stable tet repressor (TR) expressing cells were selected. Inducibility of stable clones was assessed by transient transfection with pcDNATM4/TO/*lacZ* followed by doxycycline induction of β -galactosidase expression. The highest inducible clone was either transfected with pcDNATM4/TO/*Kras*^{G12V} to generate the inducible H1703/12V line, or with pcDNATM4/TO empty vector to generate the control H1703/TrexB line.

Generation of doxycycline-inducible KRas knockdown A549 and H358 cell lines.

Lentiviruses were produced from lentiviral vectors containing two different shRNA

sequences for targeting K-Ras, as well as a control vector containing a non-targeting shRNA sequence, were obtained (pTripz V3THS-314004; V3THS-314009, RHS-4743; Open Biosystems®) and used to infect H358 and A549 cells. Stable cells were selected and tested for inducible expression of the shRNAs by expression of turbo-red fluorescent protein (also induced by doxycycline) tested for KRas inhibition by real-time PCR and by western blotting (see below).

RNA isolation and Real-time PCR analysis. RNA was either extracted using Absolutely RNA miRNA Kit (Agilent Technologies®) or TRIzol (Invitrogen®), following the manufacturer's instructions in each case. 1µg and 50ng of RNA, for mRNA and microRNA respectively, was reverse transcribed into cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®) according to the manufacturer's protocol, using random primers for mRNA and a specific loop primer for miR486-5p as described (Chen et al, 2005). Real-time PCR analysis was performed using 1x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas®) in ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers for mRNA analysis were designed to span different exons while, for microRNA analysis, a specific forward primer was used in conjunction with an universal reverse primer (Chen et al, 2005). Relative quantitation was determined by the $\Delta\Delta C_t$ method using actin, tubulin or GAPDH as the endogenous control for mRNA analysis or small nucleolar RNAs (snRNA 44, 47 and 48) for miRNA analysis, respectively. Whenever more than one endogenous control was used to normalize the data, a normalization factor was calculated using Genorm.

Western Blotting. 50ug of protein were submitted to SDS-PAGE on 12% polyacrilamide gels, followed by electrotransfer to nitrocellulose membranes. After blocking, membranes were incubated with primary antibody overnight, washed and incubated with anti-rabbit or anti-mouse fluorescent secondary antibodies (Licor®) for 1 h. The membranes were scanned using the Odyssey fluorescence scanner (Licor®). The antibodies used and respective catalog numbers were as follows: anti-pan-RAS (OP-40, Calbiochem), anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology), anti-FoxO1 (cs-2880; Cell Signaling), anti-PTEN (cs-9559; Cell Signaling), anti-caspase3 total (cs-9662; Cell Signaling); anti- cleaved caspase3 (cs-9664; Cell Signaling); anti-actin (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology).

Transfections. siRNA transfections were performed as previously described (Wilson et al, 2008) with 100nM of either a non-targeting siRNA control or siRNA smart pools targeting KRAS (Dharmacon). We also used 5 or 50nM of modified RNA oligos mirVana® Mimic and Inhibitors, as well as respective controls (Invitrogen®) to manipulate microRNA486-5p expression. All transfections were performed using Dharmafect 1 transfection reagent (Dharmacon®).

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-

tetrazolium salt (MTT) assay. 10^4 cells were seeded in 96 wells plates. After 24 h the complete media was replaced with serum-free media and 10uL of MTT (10mg/mL) was added to each well. After 2 hours 100μL of DMSO was added to each well and cells were incubated at room temperature for 1 hour. The reduction of MTS to

formazan was measured colorimetrically at 600nm on a Eon Microplate Reader (OptiTek).

Colony formation assay. 500 cells were seeded in 20cm² plates and cultured for 12 days, with medium being changed every 3 days. Formed colonies were then fixed with formaldehyde 3,7%, stained with violet crystal and the colony number was counted.

Growth curve. 4×10^4 were seeded in 6 wells plates and cultured for up to 12 days. Every 2 days the cells fixed with formaldehyde 3,7% and the number of cells was determined with Beckman Z2 Coulter.

H3 thymidine incorporation assay. 10^4 cells were seeded in 96 wells plate and after 24 h the complete media was replaced with serum-free media for 24 h. After that the complete medium was replaced and after 6 hours 0,25µCi/mL H3 thymidine was added and kept for 24 h. H3 thymidine incorporation level were determined by automatic scintillator (Tri-Carb 2910TR, Perkin-Elmer®)

Statistics. All values are presented either as mean $\pm$ 1SD or as representative images of at least three independent experiments. All comparisons were made using the unpaired Student *t* test for samples with unequal variance. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$ (indicated by asterisk).

RESULTS

In order to investigate if miR-486-5p is regulated by oncogenic K-Ras in lung cells, we first compared miR-486-5p expression between primary immortalized epithelial lung cells (SALEB) and its K-Ras transformed counterpart (SAKRAS). As can be seen in figure 1A, miR-486-5p expression is significantly higher in SAKRAS cells. Consistently, we observed decreased expression of different miR-486-5p targets in SAKRAS cells, including tumor suppressors PTEN and FoxO1 (Fig. 1B). Because microRNAs are processed into a double-stranded intermediate before the mature strand is selected, and because both strands can be functional, we decided to investigate if, in lung cells, miRNA486-3p would also be correlated with K-Ras expression. As can be seen in fig. 1C, miR486-3p expression is also higher in SAKRAS cells, when compared to SALEB cells. These results confirm a previously observed correlations between miR486-5p and miR486-3p expression and presence of oncogenic K-Ras in colon cancer (Ragusa et al, 2010, Mosakhani et al, 2012). However, these correlative observations do not establish causality. In order to demonstrate that K-Ras regulates miR486-5p expression, we first performed a gain-of-function experiment using KRas-inducible H1703 cells (H1703/12V), which do not normally express oncogenic KRas. When oncogenic K-Ras expression is induced with doxycycline (Fig.1D), miR486-5p expression is also increased (Fig.1E). This increase in miR486-5p expression was not caused by doxycycline, as no increase in miR486-5p expression was observed in our vector control cell line (H1703/TrexB) treated with doxycycline. Next, we performed loss-of-function experiments using K-Ras mutant H358 and A549 cell lines with doxycycline-inducible expression of shRNAs targeting K-Ras. Consistent with our previous results, inhibition of K-Ras expression (Fig. 1F)

was accompanied by a decrease in miR486-5p expression with two different shRNAs in both cell lines (Fig. 1G). Again, miR486-5p expression was unchanged in H358 and A549 cells induced to express a non-targeting shRNA. Taken together, these results confirm that, in lung cells, miR486-5p is a KRas target.

Because miR486-5p has been reported to inhibit the expression of tumor suppressors PTEN and FoxO1 (Small et al, 2010), and because we have seen a correlation between KRas and reduced expression of these tumor suppressors (Fig. 1B), we decided to investigate if alterations in KRas expression would lead to opposite alterations in expression of these miR486-5p targets. As can be seen in Fig. 2A, induction of KRas expression in H1703 cells leads to a decrease in FoxO1 protein expression, however PTEN expression remains unaltered. In our control cell line (H1703/TrexB) no change in FoxO1 expression was observed upon doxycycline treatment. Similarly, when K-Ras expression is inhibited in H358 and A549 cells by two independent shRNAs, an increase in FoxO1 expression is observed (Fig. 2B). No changes in FoxO1 expression were observed when a non-targeting shRNA was induced in these cells. Again no changes in PTEN protein levels were observed. These results show that KRas negatively regulates FoxO1 protein expression and suggest that this regulation might, at least in part, be mediated by miR486-5p.

Given the above results, we hypothesized that miR486-5p contributed to the oncogenic phenotype induced by KRas. In order to test this hypothesis, we first assessed if miR486-5p could promote oncogenesis in KRas wildtype H1703 cells. As can be seen in Fig. 3A, H1703 cells transfected with either 5nM or 50nM of a

miR486-5p mimic RNA oligo were able to form more colonies than H1703 cells transfected with control RNA oligo. These cells also displayed increased viability by MTT assay (Fig.3B). Conversely, inhibition of miR486-5p expression in K-Ras mutant A549 and H358 cells leads to reduced cell viability by MTT (Fig.3C) and limits their ability to form colonies (Fig.3D). In order to investigate the mechanism leading to loss of viability, we evaluated apoptosis and proliferation. As can be seen in Figs.3E, inhibition of miR486-5p expression in H358 cells does not trigger apoptosis, as it does not increase caspase 3 cleavage. On the other hand, a reduction in miR486-5p levels was accompanied by lower levels of incorporation of radioactive thymidine (Fig.3F), indicating reduced proliferation. These results indicate that miR486-5p promotes lung cell proliferation.

As expected, H358 cells induced to express shRNAs targeting K-Ras formed less colonies than H358 cells induced to express a control shRNA. Nonetheless, when the cells expressing KRas shRNAs were transfected with miR486-5p mimic oligo, their ability to form colonies were restored to the same level observed in control cells expressing a non-targeting shRNA (fig.4A). Similar results were obtained for tritiated thymidine incorporation (Fig.4B), indicating that miR486-5p is an important mediator of KRas-induced proliferation. Finally, H1703/12V induced to express oncogenic KRas with doxycycline form more colonies than doxycycline induced H1703/TrexB control cells. However, oncogenic KRas- expressing H1703/12V cells transfected with a miR486-5p inhibitor oligo (AntagomiR) displayed similar colony forming ability as H1703/TrexB cells (fig 4C). It is noteworthy that the colony forming ability of H1703/TrexB cells, which do not express oncogenic KRas even when treated with doxycycline, was not affected by transfection with the miR486-5p inhibitor

oligo (AntagomiR). Taken together, these results show not only that miR486-5p potentiates KRas-induced proliferation, but also that miR486-5p inhibition specifically targets K-Ras-expressing cells.

DISCUSSION

KRAS-induced cancers are very common, yet despite intense efforts, effective therapies for these malignancies are so far unavailable. Approaches to target KRAS directly have so far been unsuccessful (Adjei et al, 2008) and indirect targeting of KRAS through its downstream effectors has proven to be challenging, as KRAS regulates many pathways that impinge on the oncogenic phenotype. Effective KRAS targeting will likely involve combined inhibition of these pathways. Therefore, a better understanding of the oncogenic pathways triggered by KRAS is warranted, as it will identify additional targets that will increase the possibilities for combined therapy design.

To more fully understand the oncogenic pathways triggered by KRAS, we focused our efforts on an as yet poorly explored pathway that is likely to be important for Ras-induced oncogenesis: the KRas- induced microRNA pathway.

MicroRNAs are post-transcriptional regulators of gene expression that act primarily to suppress translation of mRNA targets by pairing with the 3' UTR, a process that is mediated by the RNA Induced Silencing Complex (RISC). As miRNAs have the ability to simultaneously control groups of mRNAs, which can themselves be regulated by different miRNAs, this method of gene regulation is not only

complex, but also widespread. It is estimated that miRNAs control more than 30% of all human genes (Ambros et al, 2003; Bartel et al 2004).

Therefore, it is not surprising that alterations in microRNA-mediated gene regulation have been shown to play an important role in different types of cancers. For instance, miR29 is frequently downregulated in lung cancer and restoring its expression using cationic liposomes, inhibits cancer lung cell growth *in vitro* and xenograft tumor growth *in vivo* (Wu et al, 2013).

Moreover, miRNAs can act either as tumor suppressors or as oncogenes, depending on the group of genes they regulate. In the first case, reduced expression of a microRNA with tumor suppressive function leads to up-regulation of genes with oncogenic properties, like Bcl2 (targeted by mir15 e mir16-1; Cimmino et al, 2005), Ras (targeted by let7, Johnson et al, 2005), myeloid cell leukemia sequence 1 (MCL1; targeted by mir29, Garzon et al, 2009; Mott et al, 2007) and MYC (also targeted by let-7; Sampson et al, 2007). In the second case, increased expression of microRNAs with oncogenic function leads to enhanced suppression of genes with tumor suppressive properties, like p53, SOCS1 and PDCD4 (Kim et al, 2013; Qin et al, 2013; Wang et al, 2013).

Our findings show that oncogenic K-Ras positively regulates microRNA 486-5p expression in lung cells. miRNA 486 is known to be induced by transcription factors SRF and MRTF-A in muscle cells, where it regulates muscle growth, development, and signal responsiveness (Small et al, 2010). Interestingly, even though miR486 is known to negatively regulate the expression of FoxO1 and PTEN

in muscle cells (Small et al, 2010; Xu et al, 2012), its role in cancer remains poorly understood.

Some studies suggest that miR486 might have a tumor suppressive role, whereas other studies suggest an oncogenic role. A decreased expression of miRNA486 was observed in gastric cancer and lung cancer, where it is proposed that miR486 expression might serve as a biomarker (Oh et al, 2011; Konish et al, 2012; Yu et al, 2011). It is noteworthy that the abovementioned lung cancer study did not evaluate KRas mutational status of the samples used. On the other hand, increased miR486-5p and miR486-3p expression was observed in KRas mutant colon cancer specimens (Ragusa et al, 2010; Mosakhani et al, 2012). Moreover, miR486-5p is overexpressed in patients affected by Sézary syndrome, a type of T cell lymphoma (Narducci et al, 2011). Finally, in a model of chronic myeloid leukemia (CML), miR486-5p inhibition in Bcr-Abl CD34+ cells reduced cell growth and increased imatinib sensitivity, suggesting that inhibition of this miRNA may serve as an adjuvant therapy in CML (Wang et al, 2011). Our study supports an oncogenic role for miR486-5p in lung cancer, as overexpression of this miRNA increased lung cell growth, and inhibition of its expression reduced lung cell growth and proliferation (Fig. 3).

Interestingly, miR486-5p has been shown to regulate two important tumor suppressors: the PTEN phosphatase and the transcription factor FoxO1 (Small et al, 2010, Xu et al, 2012). Here, we demonstrate for the first time in a cancer study a negative correlation between miR486-5p and FoxO expression in lung cancer cells (Figs. 1 and 2). We also demonstrate for the first time that

oncogenic KRas negatively regulates FoxO1 (Fig. 2). We propose that FoxO1 inhibition is likely mediated by KRas-induced miR486-5p up-regulation. We also propose that inhibition of FoxO1 might be an important event in KRas-induced oncogenesis. In fact, FoxO1 is capable of regulating gene transcription to inhibit cell proliferation and survival, contributing to suppress oncogenic transformation (Ramaswamy et al, 2002; van der Vos et al, 2008). It is able to prevent cell cycle entry of quiescent cells, increasing expression of cyclin G2 and p130 family members (Martinez-Gac et al, 2004; Kops et al, 2002). Finally, FoxO1 overexpression drives cell cycle G1/S phase arrest, which is partly mediated both by upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors and by downregulation of cyclin D (Medema et al, 2000; Schmidt et al, 2002).

On the other hand, even though PTEN has been confirmed as a miR486-5p target in muscle cells (Small et al, 2010), we were not able to observe regulation of PTEN by KRas. This likely reflects tissue-specific differences in target regulation by miRNAs. Not only can miRNAs be regulated in a tissue-specific fashion (Cascione et al, 2013), but the groups of targets they regulate can also vary depending on cell context (Borbone et al, 2013; Daschkey et al, 2013). In lung cancer, miRNA486-5p seems not to target PTEN. Since both tumor suppressors are known negative regulators of the PI3K-Akt pathway (Small et al, 2010), it is likely that in different tissues either one or the other is sufficient to negatively regulate this pathway. Interestingly, KRas is known to activate this pathway through direct interaction with the PI3K 110 catalytic subunit (Yang et al, 2012). Our study suggests miR486-5p-mediated inhibition of FoxO1 as an additional mechanism by which KRas can

activate the PI3K pathway. It is likely that PTEN might be regulated by KRas in a similar fashion in a different context.

A positive correlation between oncogenic KRas and miR486-5p expression had been described before in colon cancer (Ragusa et al, 2010). Here, we not only confirmed this observation in lung cells, but extended it to show that there is causality. In that sense, we have shown that an alteration in oncogenic KRas expression led to a corresponding alteration in expression of miR486-5p (Fig.1). This was an important finding, as it demonstrates for the first time, that oncogenic KRas can induce alterations in the microRNA regulatory pathway.

More importantly, by simultaneously manipulating KRas and miR486-5p expression (Fig.4), we demonstrated that expression of miR486-5p could reverse the biological effect of inhibiting KRas expression, and vice-versa, that inhibition of miR486-5p expression could reverse the biological effect of oncogenic KRas induction. These results are important because they show that at least some of the tumor promoting effects of KRas (namely increased viability and proliferation) are mediated by miR486-5p. This result, coupled with the fact that miR486-5p inhibition in H1703/TrexB cells that do not express oncogenic KRas had no effect on cell viability and proliferation, suggest that miR486-5p inhibition might constitute an effective and specific approach to be used as adjuvant therapy for Kras- induced lung cancer.

In conclusion, we have identified miR486-5p as a KRas-regulated miRNA in lung cancer cells, that not only contribute to the oncogenic phenotype triggered by KRas, likely through regulation of the tumor suppressor FoxO1, but also we have

identified a novel unconventional KRas target, whose inhibition seems promising and deserves further exploration as a therapeutic approach for K-ras-induced lung cancer.

REFERENCES

- Adjei AA. K-ras as a target for lung cancer therapy. *J Thorac Oncol* 2008;3:S160-3.
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003 May 13;13(10):807-18.
- Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*, 5(5):396-400, 2004. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 28;404(4):896-902.
- Biasiolo M, Sales G, Lionetti M, Agnelli L, Todoerti K, Bisognin A, Coppe A, Romualdi C, Neri A, Bortoluzzi S. Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PLoS One*. 2011;6(8):e23854.
- Bodemann BO, White MA. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat Rev Cancer* 2008;8:133-40.
- Borbone E, De Rosa M, Siciliano D, Altucci L, Croce CM, Fusco A. Up-regulation of miR-146b and down-regulation of miR-200b contribute to the cytotoxic effect of Histone deacetylase inhibitors on ras- transformed thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Mar 29.
- Cascione L, Gasparini P, Lovat F, Carasi S, Pulvirenti A, Ferro A, Alder H, He G, Vecchione A, Croce CM, Shapiro CL, Huebner K. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(2):e55910.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005 Nov 27;33(20):e179.
- Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA. miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Mol Cell*. 2012 Nov 9;48(3):353-64.
- Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis*. 2009 Jun;30(6):1003-7.

- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.
- Daschkey S, Röttgers S, Giri A, Bradtke J, Teigler-Schlegel A, Meister G, Borkhardt A, Landgraf P, Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008;14:1351-6
- Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756:127-44. Gao HG, Chen JK, Stewart J, Song B, Rayappa C, Whong WZ, Ong T. Distribution of p53 and K-ras mutations in human lung cancer tissues. *Carcinogenesis* 1997;18:473-8.
- Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, Zanesi N, Kornblau SM, Marcucci G, Calin GA, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5331-41.
- Gerber DE, Minna JD. ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 2010;18:548-51.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 5(7):522-31, 2004.
- Hu Y, Ou Y, Wu K, Chen Y, Sun W. miR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway. *Tumour Biol*. 2012 Dec;33(6):1863-70.
- Huang YH, Lin KH, Chen HC, Chang ML, Hsu CW, Lai MW, Chen TC, Lee WC, Tseng YH, Yeh CT. Identification of Postoperative Prognostic MicroRNA Predictors in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*;7(5):e37188. 2012.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47.
- Kim NH, Cha YH, Kang SE, Lee Y, Lee I, Cha SY, Ryu JK, Na JM, Park C, Yoon HG, Park GJ, Yook JI, Kim HS. p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle*. 2013 May 15;12(10):1578-87.

- Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Tsujiura M, Takeshita H, Morimura R, Nagata H, Arita T, Kawaguchi T, Hirashima S, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. *Br J Cancer*. 2012 Feb 14;106(4):740-7.
- Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffey PJ; Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* 2002; 22:2025-36. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*. 2010 Nov;101(11):2309-15.
- Lim KH, O'Hayer K, Adam SJ, Kendall SD, Campbell PM, Der CJ, Counter CM. Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* 2006;16:2385-94.
- Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2008;9:962-72.
- Lundberg AS, Randell SH, Stewart SA, Elenbaas B, Hartwell KA, Brooks MW, et al. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* 2002;21:4577-86.
- Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero MR, Carrera AC. Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide-3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 2004; 24:2181-9.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFXlike Forkhead transcription factors mediate cell cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000; 404:782-7.
- Mosakhani N, S. V., Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundström J, Ristamäki R, Osterlund P, Knuutila S. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes Chromosomes Cancer*. 51(1): 9. 2012
- Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007 Sep 13;26(42):6133-40.
- Narducci MG, Arcelli D, Picchio MC, Lazzeri C, Pagani E, Sampogna F, Scala E, Fadda P, Cristoforetti C, Facchiano A, Frontani M, Monopoli A, Ferracin M, Negrini M, Lombardo GA, Caprini E, Russo G. MicroRNA profiling reveals that microRNA-

- 21, microRNA 486 and microRNA-214 are upregulated and involved in cell survival in Sézary syndrome. *Cell Death Dis.* 2011 April; 2(4): e151
- Nguyen T, Rich A, Dahl R. MiR-24 promotes the survival of hematopoietic cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e55406.
- Oh HK, Tan AL, Das K, Ooi CH, Deng NT, Tan IB, Beillard E, Lee J, Ramnarayanan K, Rha SY, Palanisamy N, Voorhoeve PM, Tan P. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2657-67.
- Ota T, Doi K, Fujimoto T, Tanaka Y, Ogawa M, Matsuzaki H, Kuroki M, Miyamoto S, Shirasawa S, Tsunoda T. KRAS up-regulates the expression of microRNA-181a, microRNA-200c and microRNA-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 2012 Jun;32(6):2271-5.
- Qin S, Ai F, Ji WF, Rao W, Zhang HC, Yao WJ. miR-19a Promotes Cell Growth and Tumorigenesis through Targeting SOCS1 in Gastric Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(2):835-40.
- Ragusa M, Majorana A, Statello L, Maugeri M, Salito L, Barbagallo D, Guglielmino MR, Duro LR, Angelica R, Caltabiano R, Biondi A, Di Vita M, Privitera G, Scalia M, Cappellani A, Vasquez E, Lanzafame S, Basile F, Di Pietro C, Purrello M. Specific alterations of microRNA transcriptome and global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment. *Mol Cancer Ther.* 2010 Dec;9(12):3396-409.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell.* 2002 Jul;2(1):81-91.
- Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 2;107(9):4218-23.
- Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9762-70.
- Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:7842-52.
- Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. Vahakangas KH, Bennett WP, Castren K, Welsh JA, Khan MA,

- Blomeke B, et al. p53 and K-ras Mutations in Lung Cancers from Former and Never-Smoking Women. *Cancer Res* 2001;61:4350-6.
- van der Vos KE, Coffey PJ. FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene* 2008; 27:2289-99.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
- Wang LS, Li L, Shiang KD, Li M, Chu S, Bhatia R. Role of MicroRNA-486-5p Overexpression In CML CD34+ Cells In Modulating BCR-ABL Mediated Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Transformation and Imatinib Sensitivity. 53rd ASH annual meeting, 2011.
- Wang YQ, Guo RD, Guo RM, Sheng W, Yin LR. MicroRNA-182 promotes cell growth, invasion, and chemoresistance by targeting programmed cell death 4 (PDCD4) in human ovarian carcinomas. *J Cell Biochem*. 2013 Jul;114(7):1464-73.
- Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, et al. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1993;72:432-8.
- Wilson W, Baldwin AS. Maintenance of constitutive I κ B kinase activity by glycogen synthase kinase-3 α /3 β in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2008;68:8156-63.
- Wu Y, Crawford M, Mao Y, Lee RJ, Davis IC, Elton TS, Lee LJ, Nana-Sinkam SP. Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Apr 16;2:e84.
- Xu J, L. R., Workeneh B, Dong Y, Wang X, Hu Z. Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486. *Kidney Int*. 2012.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: KRAS up-regulates miR486 and its targets in lung cells. 1A. microRNA 486-5p expression in lung primary cells in presence (SAKRAS) or absence (Saleb) of oncogenic KRas; 1B. microRNA 486-5p mRNA target expression level in primary lung cells in presence (SAKRAS) or absence (Saleb) of oncogenic KRas; 1C. microRNA 486-3p expression in lung primary cells in presence (SAKRAS) or absence (Saleb) of oncogenic KRas; 1D. Western blotting for PanRas and actin of H1703 G12V and TrexB cells in presence or absence of doxycycline; 1E. microRNA 486-5p expression in H1703 G12V and TrexB cells in presence or absence of doxycycline; 1F: KRas expression in A549 and H358 lung cancer cells after transduction with shRNAs, where the first column represent in presence of doxycycline while the second in absence; 1G: microRNA 486-5p expression in A549 cells transduced with shRNAs according to presence or absence of doxycycline; 1H: microRNA 486-5p expression in H358 cells transduced with shRNAs according to presence or absence of doxycycline

Figure 2: In lung cells miRNA486-5p target FoxO1 is negatively regulated by KRAS. 2A: Western blotting for FoxO1, PTEN and actin of H1703 G12V and TrexB cells in presence or absence of doxycycline; 2B and 2C: Western blotting for PanRas, FoxO1, PTEN and actin of A549 and H358, respectively, in presence or absence of doxycycline;

Figure 3: miRNA486-5p acts as an OncomiR in KRAS positive lung cancer cells by promoting cell viability and proliferation. 3A and 3B: Colony formation and MTT assays, respectively, in H1703 cells after transfection with miR486-5p mimic and mimic control; 3C and 3D: MTT and colony formation assays in H358 cell after transfection with miR486-5p antimiR and antimiR control; 3E: western blotting for caspase3 total and cleaved caspase3 in H358 cells after transfection with miR486-5p mimic, antimiR and controls; 3F: proliferation assay in H358 cells after transfection with miR486-5p antimiR and antimiR control.

Figure 4: K-Ras-induced cell growth and viability is reversed by inhibition of miRNA 486-5p. 4A: Colony formation in H358 cells after transfection with miR486-5p mimic and mimic control; 4B: proliferation assay in H358 cells after transfection with miR486-5p mimic and mimic control; 4C: colony formation assay in H1703 cell after transfection with miR486-5p antimiR and antimiR control.

Figure 1:

Figure 2:

Figure 3:

Figure 4: