Caio Martins Moura

**O perfil de expressão dos MiRNAs reguladores de CD44 e das
sintases do ácido hialurônico no câncer de próstata**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências
Programa de Urologia
Orientadora: Prof. Dra Katia Ramos Moreira
Leite

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Caio Martins

O perfil de expressão dos MiRNAs reguladores do CD44 e das sintases do ácido hialurônico no câncer de próstata / Caio Martins Moura -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Ácido hialurônico 2. Moléculas de adesão 3.MicroRNAs
4.Expressão gênica 5.Neoplasias da próstata 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-319/17

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Roberto Caldeira e Ana Carolina e minha noiva Marielle.”

Agradecimentos

A **Deus** por me guiar nesta longa caminhada longe da minha família.

A **Prof. Dra Katia Ramos Leite**, pela orientação e oportunidade em estudar no LIM55, e por todo conhecimento e aprendizado.

Ao **Dr. José Pontes Junior**, por dividir sua e pela disponibilidade desde o mestrado tornando este projeto possível.

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, pela oportunidade de trabalhar neste maravilhoso grupo, e todo o apoio que foi dado para o desenvolvimento de várias pesquisas no LIM55.

À amiga **Dra. Sabrina Reis**, por não existirem palavras para descrever o coração desta pessoa. Agradeço por todo aprendizado e incentivo durante essa jornada.

Ao amigo **Iran Amorim**, por todo conhecimento compartilhado no laboratório.

Aos meus queridos amigos **Denis Reis e Nayara Viana**, pela ajuda e companheirismo por toda esta jornada desde o início.

Aos amigos do LIM 55, **Nelson Dip, Alexandre, Vanessa Ribeiro, Isis, Ruan** por toda ajuda no laboratório.

Ao **Prof. Dr. Homero Bruschini** por permitir minha pós graduação.

Aos colegas do departamento urológico **Elisa, Iones e Inisabete** por me ajudar nesta pós-graduação.

Aos meus queridos irmãos **Vinícius e Bianca** por todo apoio nestes anos.

Aos meus pais, **Roberto e Ana Carolina**, por acreditar e me incentivar por toda esta vida, vocês são meu espelho. A cada dia vocês me ensinam como vencer, sempre serei grato a vocês!

À minha noiva **Marielle** por estar comigo nesta longa caminhada desde o início. Agradeço pelos conselhos, ajuda e companheirismo nos momentos felizes e difíceis.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

	Lista de abreviaturas	
	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Summary	
1	Introdução_____	1
1.1	Câncer de próstata_____	2
1.2	Diagnósticos_____	3
1.3	Fatores prognósticos_____	5
1.3.1	PSA_____	6
1.3.2	Estadiamento_____	7
1.3.3	Gleason_____	7
1.4	Moléculas de adesão_____	9
1.5	CD44_____	10
1.6	Os micro RNAS_____	15
1.7	Relação das moléculas de adesão e os micro RNAs_____	16
2	Objetivos_____	17
2.1	Objetivo primário_____	18
2.2	Objetivo secundário_____	18
3	Métodos_____	19
3.1	Pacientes e amostras_____	20
3.2	Ética_____	21
3.3	Extração do RNA total e miRNA_____	22
3.4	Síntese do DNA complementar cDNA_____	25

3.4.1	Para análise de expressão dos genes_____	25
3.4.2	Para análise de expressão dos miRNAs_____	25
3.5	Análise da expressão dos miRNAs e seus genes alvos_____	26
3.6	Análise estatística_____	28
4	Resultados_____	29
4.1	Perfil de expressão dos miRNAs e seus genes alvos_____	30
4.2	Comparação do perfil de expressão do gene has2 seus possíveis reguladores_____	31
4.3	Comparação do perfil de expressão do gene has3 seus possíveis reguladores_____	33
4.4	Comparação do perfil de expressão do CD44 seus possíveis reguladores_____	35
4.5	Comparação do perfil de expressão dos genes e seus possíveis miRNAs com os fatores prognósticos_____	37
4.6	Comparação do perfil de expressão dos genes e seus possíveis miRNAs com a graduação WHO/ISUP_____	40
4.7	Comparação do perfil de expressão dos genes e seus possíveis miRNAs com a recidiva_____	42
5	Discussão_____	44
5.1	Perspectivas_____	52
6	Conclusões_____	53
7	Referências_____	55
8	Anexos	
	Apêndices	

Lista de abreviaturas

CaP	Câncer de Próstata
PSA	Antígeno Prostático Específico
MAC	Moléculas de adesão celular
AH	Ácido Hialurônico
CD44s	CD44 padrão
CD44v	Variantes do CD44
Has2	Sintase do ácido hialurônico 2
Has3	Sintase do ácido hialurônico 3
miRNA	Micro RNA
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
TEM	Transição epitelial mesenquimal
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
B2M	β2-microbulina

Lista de Figuras

- Figura 1** – Sinalização intracelular através da interação do AH-CD44 ativa inúmeras vias celulares, promovendo alterações no citoesqueleto, degradação da matriz extracelular e favorecendo perda de adesão. Migração e proliferação celular_____ 11
- Figura 2** – A estrutura do CD44 é constituída de três partes: Domínio extracelular, no qual se liga ao AH. Dominínio transmembrana e um domínio citoplasmático, que envia sinais para o interior da célula._____ 12
- Figura 3** – Estrutura do gene do gene CD44 com 20 éxons, no qual os 10 éxons do meio sofrem *splicing* alternativo formando as variáveis (v1-v10); os éxons que não sofrem o *splicing* alternativo formam a CD44s (padrão) 13
- Figura 4** – miRNAs descritos nos sites targetsan.org; miRNA.org como possíveis controladores de CD44, has2 e has3_____ 23
- Figura 5** – Dispersão dos perfis de expressão dos genes e dos miRNAs comparada com a HPB_____ 30
- Figura 6** – Perfil de expressão do gene has2 e seus possíveis reguladores_____ 32
- Figura 7** – Perfil de expressão do gene has3 e seus possíveis reguladores_____ 34
- Figura 8** – Perfil de expressão do CD44s e seus possíveis reguladores___ 36
- Figura 9** – Esquema do perfil de expressão dos genes e miRNAs analisados no presente estudo, e a hipótese do comportamento do tumor_ 52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados demográficos clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP e do grupo controle_____	21
Tabela 2 – miRNA descritos ou previstos tendo como genes alvos CD44, has2 e has3_____	22
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados para quantificação dos genes e miRNAS	28
Tabela 4 – Expressão dos genes has2, has3 e CD44s de acordo com o estadiamento patológico, PSA pré-operatório e escore de Gleason____	38
Tabela 5 – Expressão dos miRNAs de acordo com o estadiamento patológico, PSA pré-operatório e escore de Gleason_____	39
Tabela 6 – Expressão dos genes e miRNAs de acordo a graduação WHO/ ISUP_____	41
Tabela 7 – Expressão dos genes e miRNAs de acordo com a recidiva	43

Resumo

Moura CM. *O perfil de expressão dos miRNAs reguladores de CD44 e das sintases do ácido hialurônico no câncer de próstata* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: O Câncer de próstata (CaP) é o tumor sólido mais comum e a segunda causa de óbito por câncer no homem em países ocidentais. Caracteristicamente tem comportamento heterogêneo e os fatores prognósticos falham na previsão de sua agressividade. Assim, existe a necessidade da busca de novos marcadores moleculares que melhorem a definição prognóstica. Em estudo prévio demonstramos que a perda de expressão da molécula de adesão CD44 padrão (CD44s) e superexpressão das variantes do CD44 (CD44v) são características do CaP localizado. O CD44 tem como principal ligante o ácido hialurônico (AH), principal componente da matriz extracelular, sintetizado pelos genes *has2* e *has3*. Talvez microRNAs (miRNA) regulem a expressão destes genes no CaP. **Objetivo:** Nosso objetivo foi analisar o perfil de expressão dos miRNAs que possam regular os genes *has2*, *has3* e CD44 e correlacioná-los com os principais fatores prognósticos do CaP e com a recidiva bioquímica pós-prostatectomia radical. **Materiais e métodos:** Analisamos retrospectivamente os espécimes cirúrgicos de 53 pacientes submetidos a prostatectomia radical (PR) entre outubro de 1998 e abril 2006. A expressão dos genes e de seus miRNAs reguladores foram analisadas através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). O grupo controle foi constituído pelos espécimes cirúrgicos de 6 pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB). Correlacionamos o perfil de expressão dos 3 genes e 9 MiRNAs com o escore de Gleason, graduação ISUP, estadiamento patológico, nível de PSA pré-operatório e recidiva bioquímica definida por níveis de PSA acima de 0,2ng/mL. **Resultados:** Encontramos superexpressão dos genes *has2* e *has3* e subexpressão do CD44s no CaP localizado em comparação a HPB. Observamos subexpressão da maioria dos miRNAs no CaP com exceção do miR-511 que se encontrou superexpresso. Os miR-10a e 708 apresentaram expressão heterogênea. Adicionalmente demonstramos que menor expressão dos miR-200c e 33a está correlacionada com PSA ≥ 10 ng/mL, $p=0,024$ e $p=0,002$ respectivamente. A menor expressão de miR 200c também apresentou correlação com o score de Gleason ≥ 7 ($p=0,026$) e com recidiva bioquímica ($p=0,041$). **Conclusão:** Os genes *has2*, *has3* estão superexpressos, e o CD44s subexpresso no CaP localizado. A maioria dos miRNAs, reguladores destes genes estão subexpressos. A menor expressão dos miR-200c e 33a que regulam os genes *has2* e *has3* estão correlacionados com características anátomo-patológicas de pior prognóstico e com maiores taxas de recidiva bioquímica.

Descritores: Ácido Hialurônico; Moléculas de adesão; MicroRNAs; Expressão gênica; Neoplasias da próstata; Prognóstico

Summary

Moura CM. *The expression profile of miRNAs regulatory of CD44 and hyaluronic acid synthases in prostate cancer* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Prostate cancer (PCa) is the most common solid tumor and the second cause of cancer death in men in Western countries. It characteristically has heterogeneous behavior and the prognostic factors fail in predicting its aggressiveness. Thus, there is a need to search for new molecular markers to improve prognostic definition. In a previous study we showed that the loss of the standard CD44 (CD44s) adhesion molecule expression and overexpression of CD44 variants (CD44v) are characteristic of PCa. CD44 is the main binder of hyaluronic acid (HA), which is a major component of the extracellular matrix that is synthesized by the genes *has2* and *has3*. We believe that micro RNAs (miRNA) regulate the expression of these genes in PCa. **Objective:** Our objective was to analyze the miRNA expression profile that probably regulate gene *has2*, *has3* and CD44 and correlate the results with the main prognostic factors for PCa and biochemical recurrence after radical prostatectomy (RP). **Materials and Methods:** We retrospectively analyzed the surgical specimens of 53 patients who underwent RP between October 1998 and April 2006. The expression of genes and their regulatory miRNAs were analyzed by quantitative, real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The control group was represented by surgical specimens of 6 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). We correlate the expression profile of 3 genes and 9 miRNAs with Gleason score, ISUP graduation, pathological staging, preoperative PSA and biochemical recurrence defined by PSA levels above 0,2ng /ml. **Results:** We found overexpression of genes *has2* and *has3* and under expression of CD44s in PCa compared to HPB. We observed an under expression of most miRNAs in PCa with the exception of miR-511 that was found overexpressed. The miR-10a and 708 showed heterogeneous expressionprofile. Additionally we demonstrated that lower expression of miR-200c and 33a was correlated with PSA $\geq$ 10 ng/mL, $p=0.024$ and $p = 0.002$ respectively. The lower expression of miR 200c was also correlated with Gleason score ≥ 7 ($p=0.026$) and biochemical recurrence ($p=0.041$). **Conclusion:** The *has2* and *has3* were overexpressed while the CD44s was underexpressed in localized PCa. Most of miRNAs that regulate these genes were underexpressed. The expression of miR-200c and 33a, regulators of *has2* and *has3* genes, were correlated with unfavorable characteristics of PCa and with biochemical recurrence.

Descriptores: Hyaluronic acid; Adhesion molecules; MicroRNAs; Gene expression; Neoplasms of the prostate; Prognosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é reconhecido como um dos problemas de saúde mais importante na população do sexo masculino pela alta incidência. Dados do Instituto do Câncer mostram que é a neoplasia não cutânea mais comum em homens no Brasil, sendo estimados 61.200 novos casos para 2016 (1). O CaP é também a segunda causa de óbito por câncer nos países ocidentais. Estudos epidemiológicos mostraram aumento da incidência do CaP nas últimas décadas; especula-se que a causa seja parcialmente devido ao envelhecimento populacional somado à identificação de casos subclínicos, facilitada pelo emprego disseminado do rastreamento com toque retal e dosagem do antígeno prostático específico (PSA) (1, 2).

Os fatores que determinam o risco de desenvolver CaP não são completamente conhecidos, embora alguns tenham sido identificados. A idade, etnia, dieta rica em gordura animal e hereditariedade são alguns dos fatores de risco importantes para o CaP.

A incidência do tumor aumenta depois dos 50 anos (3) e indivíduos com parentes de 1º grau com CaP tem o dobro de chance de desenvolver a neoplasia quando comparados com a população normal. Se dois ou mais parentes de primeiro grau forem afetados o risco aumenta de 5-11 vezes (4). No entanto, apenas 9% dos tumores de próstata diagnosticados são hereditários, os quais se caracterizam por diagnóstico em idade mais precoce quando comparados aos tumores esporádicos (5).

Estudos populacionais demonstraram que negros tem maior risco de desenvolver a neoplasia; um estudo britânico mostrou que a chance é 2 a 3 vezes maior quando comparada a caucasianos. Observaram ainda que a

mortalidade foi 30% maior, indicando pior prognóstico do CaP na raça negra (6).

Pesquisas relatam que a incidência do CaP diverge em diferentes partes do mundo, sendo mais alta nos Estados Unidos e na Europa, e menor na Ásia. Estes achados indicam que fatores externos como a alimentação podem influenciar no surgimento da doença. Como a maioria dos estudos relatados até o momento são do tipo caso-controle, ou seja, com menor nível de evidência, ainda existem muitas dúvidas sobre o papel destes fatores de risco na carcinogênese da próstata. Diversos estudos randomizados estão em andamento tentando esclarecer o papel de tais fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia (7).

1.2 Diagnóstico

O toque retal associado à dosagem sérica do PSA são os exames realizados para a detecção do CaP, sendo a biópsia de próstata indicada quando um ou ambos estão alterados. Sabe-se que 75% dos tumores localizam-se na zona periférica da próstata, que corresponde à região da glândula palpável ao toque. A presença de nódulo ou endurecimento é indício da doença. Este exame tem importância no rastreamento e no estadiamento, apesar de sua subjetividade, variabilidade interpessoal entre examinadores, e da existência de doenças prostáticas associadas que podem simular a neoplasia como hipertrofia benigna, prostatite, biópsias prévias, tornando o exame pouco específico (8).

O PSA é uma protease produzida no ácino prostático e secretada no fluido seminal, por isso sua concentração no plasma é normalmente pequena.

A função do PSA é liquefazer o esperma auxiliando assim no processo de fecundação. Desde sua descoberta em 1979 até os dias de hoje, tornou-se ferramenta valiosa para a detecção precoce e seguimento de pacientes tratados por CaP (9).

O nível de PSA é um parâmetro contínuo e quanto maior o valor, mais provável é a existência de CaP. A constatação de que muitos homens podem ter CaP apesar dos baixos níveis de PSA, foi reforçada por um estudo realizado nos Estados Unidos que demonstrou que pacientes com níveis de PSA entre 4 a 10ng/mL ou >10 ng/mL têm, respectivamente, 30% e 62% de probabilidade de terem CaP. Mesmo com níveis de PSA menores que 0,5 ng/mL a possibilidade de CaP é de 6,6%. Assim não há nível do PSA abaixo do qual o homem esteja 100% seguro de não ter CaP (10). O problema do PSA é que o exame não é câncer específico, pois eleva-se também nas prostatites e hiperplasia prostática benigna (HPB), sendo a baixa especificidade a sua principal deficiência. Em virtude disso, quando uma biópsia prostática é realizada em pacientes com níveis de PSA entre 3,0 e 10,0 ng/mL são observadas taxas de resultados negativos de aproximadamente 70 a 80%, indicando um número considerável de biópsias desnecessárias (11). Apesar do uso disseminado do PSA para rastreamento do CaP e do benefício do seu uso no diagnóstico precoce, está clara a necessidade de identificação de novos marcadores, com melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença.

Recentemente, foi introduzida a ressonância multiparamétrica (RNMm) para melhorar a acurácia da biópsia. O exame vem emergindo como método importante na localização de áreas suspeitas para CP, especialmente em

pacientes com biópsias prévias negativas, sendo os resultados superiores aos obtidos com o ultrassom. A RNMM é um bom exame particularmente para detectar tumores anteriores que são usualmente perdidos nas biópsias regulares e que, conseqüentemente, leva a repetidas biópsias (12, 13).

1.3 Prognóstico

O CaP é uma doença heterogênea e de comportamento biológico variável, existindo casos de alto potencial agressivo e que ameaçam a vida do paciente ao mesmo tempo que existe um número considerável de tumores indolentes, cujo diagnóstico e tratamento são desnecessários (14).

Para análise de custo e benefício dos programas de rastreamento foram realizados alguns estudos de grande relevância que equacionam a necessidade da busca e tratamento da doença, desde que um grande número de pacientes terá a doença sem que isso incorra em diminuição da qualidade de vida ou longevidade.

O estudo ERSPC randomizou por 13 anos 162.388 mil pacientes para rastreamento com PSA versus controle e mostrou redução significativa da mortalidade específica em 21% a favor do grupo que fez o rastreamento, porem segundo este mesmo estudo, foi preciso rastrear 781 homens por 13 anos e diagnosticar 27 casos de CaP para evitar um óbito (15). Esses dados indicam que qualquer estratégia que vise o diagnóstico e tratamento de todos os tumores de próstata resulta em altas taxas de tratamento desnecessário.

Por essa razão, em 2012 a entidade não governamental *United States Preventive Task Force* contra indicou o rastreamento de CaP com toque e PSA. Revista recentemente, concordou com as recomendações da American Urological Society, e recomenda o screening nos homens entre 55 e 70 anos, com concordância do paciente (16).

Toda essa discussão se fundamentou no fato de existirem tumores indolentes que diagnosticados poderiam ser tratados sem necessidade, desde que não seriam responsáveis pela diminuição do tempo ou qualidade de vida dos pacientes. E isso ocorre pela ausência de marcadores que distingam adequadamente o tumor agressivo do indolente (17).

Portanto, a idade do paciente, a existência de comorbidades, a expectativa de vida e as características da neoplasia devem também ser consideradas, com o intuito de reduzir o tratamento desnecessário. A estratificação de risco e definição prognóstica tornou-se ferramenta importante para o manejo dos pacientes com CaP (18). Os fatores clássicos de prognóstico são o PSA, escore de Gleason e estágio clínico e patológico

1.3.1 PSA

A dosagem do PSA total não pode ser usada isoladamente como fator preditivo da extensão tumoral ou da presença de metástases, embora metástases ganglionares ocorrem em cerca de 20% dos pacientes com PSA > 20ng/mL e em 75% dos pacientes com PSA > 50 ng/mL. Quanto mais alto o valor do PSA, maior a chance de doença localmente avançada ou disseminada. Esse fato tem grande impacto na decisão terapêutica e no prognóstico da doença (9). Porém, o emprego isolado do PSA pré-operatório

para definição do estágio da doença e consequentemente, para definição da estratégia terapêutica, ainda é controverso, visto que não é um marcador específico do CaP.

A concentração sérica de PSA é bastante útil para o monitoramento do tratamento e esse foi o primeiro uso aprovado para esse marcador pelo órgão regulador americano *Food and Drug Administration* (FDA). Os níveis de PSA devem estar indetectáveis após prostatectomia radical ou diminuir consideravelmente após radioterapia ou crioterapia.

Se ocorre um aumento dentro do primeiro ano após a realização de qualquer tratamento local ou se, ainda ocorre um aumento de duas vezes em um período menor que seis meses é provável que o paciente apresente persistência local de doença ou metástase à distância. O intervalo médio entre a recorrência do PSA e a morte por câncer situa-se entre 5 e 12 anos, dependendo do escore de Gleason (19).

1.3.2 Estadiamento

A evolução dos pacientes com adenocarcinoma da próstata está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia e, por isto, a União Internacional Contra o Câncer propôs a utilização do sistema TNM para o CaP, de modo a padronizar a classificação dos pacientes com a doença e permitir estudos comparativos mais precisos (20).

O estadiamento clínico se faz pelas alterações do toque retal somadas às alterações em exames de imagem, dos quais a ressonância multiparamétrica é a que mostra melhores resultados. A ressonância magnética proporciona melhor visualização e análise da glândula prostática, com distinção

mais definida da anatomia para estadiamento local e melhores possibilidades para prever a extensão extracapsular e a invasão das vesículas seminais (21). Entretanto, apesar da melhora da acurácia com a ressonância magnética multiparamétrica, esse ainda não é um exame perfeito e em muitos casos subestimam a extensão extracapsular do tumor.

1.3.3 Gleason

A classificação de Gleason considera a arquitetura glandular do tumor e a sua relação com o estroma prostático caracterizando cinco padrões distintos, que variam do bem diferenciado 1 ao indiferenciado 5. O escore de Gleason é dado pela soma dos dois padrões tumorais mais representativos da neoplasia. Os tumores com escore de Gleason entre 2 e 6 são considerados bem diferenciados e têm comportamento menos agressivo quando comparados aos tumores com escore de 7 a 10 que são considerados menos diferenciados (22). Ainda, os padrões 4 ou 5 de Gleason quando presentes em mais de 5% do volume do CaP é um indicador de prognóstico desfavorável para a recidiva bioquímica. Entretanto, o emprego isolado do escore de Gleason para a tomada de decisão é insuficiente devido à subjetividade da avaliação do Gleason pelo patologista (23,24).

Embora o escore possa variar de 2 a 10, após o consenso da Sociedade Internacional de Uropatologia (International Society of Urological Pathology – ISUP) os padrões 1 e 2 foram quase eliminados na prática clínica (25). Recentemente foi criado um novo sistema de graduação pela ISUP com o intuito de sanar as deficiências do grau de Gleason. A nova classificação propõe que a classificação varie de 1 a 5, sendo 1 a forma mais indolente

(Gleason score ≤ 6), ISUP 2 quando o score for 3+4, ISUP 3 quando 4+3, ISUP 4 quando o score de Gleason for 8 e ISUP 5 que representa a forma mais agressiva com score de Gleason 9 ou 10 (26,27).

Nenhum dos fatores prognósticos isolados tem valor preditivo independente ou superior ao da associação dos demais fatores envolvidos (9), e mesmo quando considerados em conjunto os fatores de prognóstico tiveram desempenho aquém do desejável, portanto novos biomarcadores de prognóstico são necessários no CaP. A pesquisa continua no sentido de estabelecer novos fatores prognósticos, e o enfoque principal tem sido dado ao estudo dos marcadores moleculares. Até o momento, apesar da vasta pesquisa realizada, e da criação e aprovação de assinaturas gênicas, como o Oncotype Dx Prostate e o Prolaris, nenhum marcador mostrou-se capaz de prever adequadamente, e de forma independente, o comportamento biológico do CaP (28).

1.4 Moléculas de adesão

A adesão entre células epiteliais é um fenômeno fundamental para a manutenção da homeostasia e do fenótipo epitelial benigno dos tecidos, atuando em vários eventos importantes da célula: proliferação, migração, diferenciação e morte. Desta forma, qualquer alteração na adesão gera consequências importantes no fenótipo e agressividade celular (29).

Com o intuito de avaliar o papel das Moléculas de Adesão (MAC) e das proteases como marcadores de prognóstico no CaP, o LIM55 iniciou uma linha

de pesquisa sobre a expressão destas moléculas em pacientes com CaP em vários estádios da neoplasia.

Nosso laboratório demonstrou que há perda de expressão das moléculas de adesão E-caderina e β -Catenina em metástases ósseas e linfonodais de CaP em cerca de 90% dos casos quando comparados ao tumor primário, denotando um papel da perda de expressão destas moléculas na progressão da neoplasia (29). Em estudo subsequente demonstramos que a maior expressão da MAC integrina $\alpha 3\beta 1$ estava independentemente associada a maior chance de recidiva bioquímica após prostatectomia radical (30).

O mecanismo específico que contribui para o padrão de disseminação do CaP ainda é pouco conhecido, mas acredita-se que as MAC e proteases tenham papel importante neste processo. Supõe-se que nas várias etapas da oncogênese exista alteração no balanço entre adesão e motilidade celular, determinado por perfil específico de expressão das MACs (31, 32).

1.5 CD44

A MAC CD44 é uma glicoproteína transmembrana que tem participação em diversas atividades celulares como interação célula-célula, célula-matriz extracelular, migração celular, apresentação de fatores de crescimento, citocinas, transmissão de sinal da superfície celular para o seu interior, apoptose, sobrevivência celular e proliferação; e vem sendo estudada em nosso laboratório, (Figura 1). Devido a densa trama de interações e papel relevante em diversos processos celulares é considerado como um potencial marcador de agressividade de várias neoplasias (33).

Figura 1. Sinalização intracelular através da interação do AH-CD44 ativa inúmeras vias celulares, promovendo alterações no citoesqueleto, degradação da matriz extracelular e favorecendo perda de adesão, migração e proliferação celular.

O gene CD44 foi mapeado no cromossomo 11p13 e é composto de 20 éxons. A forma padrão (CD44s) é a mais abundante nas células normais e consiste de um domínio extracelular, que possui uma sequência sinal N-terminal (éxon 1) e um sítio para a ligação ao Ácido Hialurônico (AH) (éxons 2 e 3), uma região proximal à membrana plasmática (éxons 4, 5, 16 e 17), um domínio transmembrana (éxon 18) e um domínio citoplasmático (éxon 20) (34) (figura 2).

A junção de diferentes éxons permite que um só gene expresse múltiplos RNAm, que codificam proteínas com diversas funções eventualmente antagonistas (37) (figura 3).

Figura 3– Estrutura do gene do gene CD44 com 20 éxons, no qual os 10 éxons do meio sofrem *splicing* alternativo formando as variáveis (v1-v10); os éxons que não sofrem o *splicing* alternativo formam a CD44s (padrão)

As CD44v tem como característica maior afinidade pelo o AH, quando comparadas ao CD44s. O AH é o principal componente na matriz extracelular dos tecidos de mamíferos que é produzido pelas proteínas de ligação da membrana, conhecida como sintases do ácido hialurônico (has1, has2 e has3), acumulando na divisão celular e no rápido remodelamento da matriz, que corre durante a morfogênese embrionária, inflamação e tumorigênese (35, 38). O gene has1 se encontra no cromossomo 19q13.3, entretanto, este gene está mais associado a resposta inflamatória (39). O gene has2 está localizado no cromossomo 8q24.12 e o gene has3 localizado no cromossomo 16q22.1 (38).

As proteínas do CD44 podem ser encontradas em três estágios de acordo com a ligação do AH: CD44 inativo, o qual não se liga ao AH; CD44 induzido não se liga ao AH, porém pode ser ativado por estímulos fisiológicos;

e o CD44 ativo que se liga ao AH (40). Essa interação CD44/AH contribui para o controle da adesão, invasão e crescimento celular através da ativação de múltiplas vias celulares.

O perfil de expressão do gene has2 e has3 associado com o CD44 já foi descrito em algumas neoplasias, como no câncer de cólon, células escamosas da boca, mama e ovário, favorecendo a tumorigênese através destes (41-44).

No CaP ainda existem poucos estudos relacionando a expressão do AH com o CD44 e suas variantes. O AH não se encontra presente de forma proeminente no tecido normal ou na HPB, mas mostrou-se abundante em tecidos tumorais de biopsias nos vários estágios da neoplasia (45).

Em estudo anterior, realizado em nosso laboratório, analisamos a expressão de CD44 padrão (CD44s) e suas variantes em 94 amostras de tecido tumoral proveniente de pacientes com CaP submetidos à prostatectomia radical, observamos perda de expressão de CD44s e aumento de todas as suas variantes, sendo as mais relevantes a superexpressão de CD44v5, CD44v8, CD44v9, CD44v10. Quando comparamos os perfis de expressão de CD44 e suas variantes com os principais fatores prognósticos não encontramos nenhuma relação entre ambos. No entanto, durante a progressão do tumor houve perda de expressão das variantes do CD44 e encontramos uma correlação da alta expressão CD44v2 com melhores taxas de sobrevida livre de recidiva (46).

Como extensão de nosso estudo anterior, nosso atual objetivo é pesquisar o papel dos micro RNAs (miRNA) no controle de expressão de CD44s, suas variantes e seu principal ligante, o AH.

1.6 Os micro RNAs

Os miRNAs são uma classe de RNA não codificante de proteína com aproximadamente 22 nucleotídeos que tem papel fundamental no controle da expressão de genes (47), promovem o silenciamento pós transcripcional pelo pareamento específico com o RNAm promovendo sua degradação (48).

Acredita-se que um terço dos genes sejam regulados pelos miRNA, que atuam como reguladores de processos diversos como o desenvolvimento (49), proliferação e morte celular (50), apoptose e metabolismo de lipídeos(51), diferenciação celular (52,53) e desenvolvimento cerebral (54). Atualmente anormalidades na expressão de miRNA têm sido relacionadas ao desenvolvimento de carcinomas, incluindo o câncer de próstata (55).

Os pré miRNA são transcritos pela RNA polimerase II, formando estruturas do tipo hairpin com cerca de 70 nucleotídeos (56) que é clivado pela enzima Drosha (endonucleaseRNase III). Uma vez clivado, o pré-miRNA é transportado ativamente do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5. Já no citoplasma a enzima Dicer (RNase III) reconhece a porção dupla fita do pré-miRNA com afinidade específica e leva à clivagem do loop na extremidade da molécula convertendo-a num duplex de sequências menores contendo de 19 a 21 nucleotídeos. Após a clivagem, o miRNA integra-se com o complexo silenciador induzido pelo RNA (RISC), levando à regulação negativa da expressão gênica por dois mecanismos; clivagem do RNAm ou repressão da tradução. O complexo RISC é direcionado ao seu RNAm alvo recém transcrito. Uma vez associado o complexo RISC cliva a fração complementar do RNAm deixando-o acessível para a degradação pela ação de RNAases o que leva à abolição da expressão da proteína (57).

1.7 Relação das moléculas de adesão e os microRNAs

miRNAs capazes de regular moléculas que são fundamentais na adesão celular foram descritos, provando que os miRNAs desempenham papel crucial na grande maioria das vias celulares que contribuem para a adesão.

Demonstramos recentemente que um dos principais fatores para progressão do CaP, a transição epitelial mesenquimal (TEM), tem como um dos mecanismos a perda de expressão dos fatores de transcrição de E-caderina por atuação de miRNAs (58).

Estudos demonstram que a expressão do miR-199a pode impedir a tumor gênese no câncer de ovário regulando a expressão de seu gene alvo, o CD44 (59). Outro estudo provou também que a interação do CD44-AH estimula a expressão do miR-21 através da via de sinalização c-Jun, diminuindo a apoptose e aumentando a quimioresistência em linhagens de câncer de mama (60).

Estudos com outras MAC também demonstraram a importância dos miRNAs na regulação das mesmas. Por exemplo, miR-31 e 92a se liga na região 3' do RNAm da integrina $\alpha 5$, inibindo sua expressão no câncer de mama (31).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário:

Analisar o perfil de expressão dos miRNAs que têm como alvo o CD44, e as sintases do ácido hialurônico has2 e has3, em espécimes de câncer de próstata localizado tratados com cirurgia.

2.2 Objetivo secundário:

Correlacionar o perfil de expressão dos miRNAs e respectivos genes com os principais fatores prognósticos no câncer de próstata: escore de Gleason, graduação proposta pela ISUP, níveis séricos PSA, estadiamento patológico e recidiva bioquímica.

3. MÉTODOS

3.1 Pacientes e amostras

Estudamos o perfil de expressão dos genes e miRNAs em espécimes cirúrgicos de 53 pacientes com CaP localizado tratados por prostatectomia radical entre dezembro de 1998 a agosto de 2006 no Hospital Sírio Libanês pela equipe do Prof. Dr. Miguel Srougi, seguidos por um tempo médio de 61,7 meses. 14 pacientes recidivaram (anexo A, B).

Como controle, estudamos 6 amostras de tecido prostático benigno, provenientes de glândulas hiperplásicas de pacientes operados por cirurgia aberta também do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes estão expostas na Tabela 1. Os pacientes foram informados sobre o uso do material em pesquisa científica e assinaram o termo de consentimento.

Tabela 1. Dados demográficos clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP e do grupo controle

	Casos de Cap N= 53	Controles HPB N= 6	p
Idade (anos)	44-84	55-75	0,712
Média	62,8	64,3	
Desvio padrão	8,71	8,09	
PSA (ng/mL)	0,87-58,40	0,9-13,05	0,480
Média	7,96	5,5	
Desvio padrão	8,52	4,98	
< 10	40		
≥ 10	13		
pT2	67,9%		
pT3	32,1%		
Escore de Gleason	4-10		
Média	7,09		
Desvio padrão	1,11		
≤6	12		
≥ 7	41		
Graduação ISUP			
1	12		
2	9		
3	12		
4	16		
5	4		

3.2 Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP nº 352.893 (Anexo C).

3.3 Escolha dos RNA total e miRNAs

Estudos publicados e programas de previsão de alvos de miRNA (targetscan.org; miRNA.org e mirdb.org) descrevem os miRNAs escolhidos para a nossa pesquisa e estão expostos na tabela 2 e figura 4 como possivelmente envolvidos no controle de CD44, has2 e has3.

Tabela 2. miRNA descritos ou previstos tendo como genes alvos CD44, has2 e has3

Gene	miRNA	Referência
CD44	708	(61)
	34a	(62)
	199a-3p	(59, 63, 64)
	150	Targetscan
	143	
HAS2	33a	microRNA.org
	200c	microRNA.org
	511	Mirdb.org
HAS3	33a	Mirdb.org
	10 ^a	Mirdb.org

Figura 4 – miRNAs descritos nos sites targetsan.org; miRNA.org como possíveis controladores de CD44, has2 e has3.

Para extração do RNA total e miRNA, utilizamos amostras de tecido prostático que foram enviados a fresco, até 15 minutos após sua remoção. Foi retirado um fragmento de 1cm² representativo do tumor ou do tecido benigno. As amostras foram submetidas imediatamente ao congelamento em nitrogênio líquido e estocado em freezer -80°C até o processamento.

Os espécimes congelados a -80°C foram cortados em criostato a -30°C, sendo retirados 10 cortes de 10 µm colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. Um fragmento foi colocado em lâmina de vidro e corado pela hematoxilina e eosina para garantia da presença de pelo menos 75% de tumor no fragmento. O RNA total do tecido foi extraído com o uso do Kit miRVana (Ambion, Austin, TX, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Ao tecido macerado pelo *TissueLyser LT* foram adicionados 10 vezes do seu volume de solução de lise, com igual volume de etanol 99%. Repassamos a solução para uma coluna GFX e centrifugamos a 10.000 rpm por 5 minuto,

separando o RNA total do miRNA. Para a lavagem do RNA total adicionamos 700µl de uma solução de lavagem própria do kit à coluna. Centrifugamos novamente nas mesmas condições e submetemos a solução a duas lavagens de 500 µl de outra solução de lavagem do kit. O filtrado foi descartado, e a solução foi centrifugada por mais 1 minuto a 10.000 rpm para secagem da coluna. Repassamos a coluna para um novo tubo e adicionamos 50µl de solução de eluição pré-aquecida no centro da coluna. Centrifugamos a coluna, e o RNA foi armazenado a -80°C até sua utilização.

A pureza e a concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotometro Nanodrop (*ND-1000, Wilmington, EUA*) (260/280 nM), e a integridade foi verificada em Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies, CA, EUA*).

Para isolamento do miRNA do tecido foi adicionado um terço do volume total de etanol 100%, e então a solução foi transferida para um a coluna GFX e centrifugada a 10.00 rpm por 15 segundos, sendo o filtrado descartado. Em seguida, realizamos lavagem com 700µl de *wash solution 1/3*, sendo a solução centrifugada por 30 segundos a 10.000 rpm, seguida por duas lavagens de 500 µl de *washsolution 2/3*, centrifudaga nos intervalos por 15 segundos a 10.000 rpm. Ao final, foram adicionados 50 µl de solução de eluição a 95 °C no filtro, e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 15 segundos. O filtrado contendo o miRNA foi então armazenado em freezer a -80 °C até ser utilizado.

A pureza e a concentração foram estimadas em espectrofotometro Nanodrop (*ND-1000, Wilmington, EUA*) (260/280 nM).

3.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

3.4.1 Para análise de expressão dos genes

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 5µg de RNA utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*TM (AppliedBiosystems, CA, EUA), o qual contém transcriptase reversa MultiScribeTM e *primers* randômicos.

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL. A este volume foram acrescentados 4 µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (25x), 4 µL do tampão da enzima (10X), e 8,4 µl de água RNA/DNA *nuclease free*. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C em um termo ciclador Veridi (*AppliedBiosystems*). Após o termino dos ciclos o cDNA foi então armazenado a –20°C até o uso.

3.4.2 Para análise de expressão dos miRNAs

O cDNA foi obtido usando-se o *kit Taqman miRNA Reverse Transcription* (*AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA*), resumidamente, 10ng de miRNA foram submetidos a transcrição reversa. O miRNA foi diluído em água livre de nucleases, sendo utilizados 2µl de oligonucleotídeos específicos para cada miRNA estudado. Após, foram adicionados 8µl de um mix contendo 0,15 de mix de dNTPs (100nM total), 1,0 µl da enzima transcriptase reversa (50U/MI), 1,5 µl do tampão da enzima (RT buffer 10x), 0,19µl de inibidor de RNase (20U/ml), 4,16 µl de água livre de nucleasse e 1µl de primers específicos para cada miRNA, totalizando 10µl. As misturas foram submetidas a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos para síntese

da fita de cDNA em aparelho termociclador Veriti (*AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA*).

3.5 Análise da expressão dos miRNAs e genes alvos

A expressão dos miRNAs e genes estudados foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) usando o sistema *ABI 7500 fast* no modo standard, com utilização de Master Mix PCR *Taqman Universal* (*AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA*) (Tabela 1). Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e por um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos do PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciado anelado. Essa quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida, que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após a quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR.

Os *primers* utilizados para amplificação dos miRNAs e genes alvo foram adquiridos da *AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA*, que desenha *primers* com as características necessárias para os experimentos de PCR em tempo real (qRT-PCR). Como controle endógeno dos genes e miRNAs utilizamos o gene β 2-microbulina (B2M) e o RNA nucleolar RNU43, respectivamente (Tabela 3).

Para amplificação dos fragmentos desejados, utilizamos as seguintes condições de reação: 5,0 µl do *Master Mix Taqman*, 0,5 µl de primers, 3,5 de µl de água destilada deionizada e 1,0 µl de cDNA, somando um total de 10µl para cada reação. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo de 50°C por dois minutos e um passo a 94°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 minutos.

Para análise do CD44s, utilizamos o sistema *Sybergreen* que utiliza o corante fluorescente *sybergreen* para detectar produtos da reação em cadeia de polimerase (PCR) através da sua incorporação ao DNA de dupla-fita formado durante a reação. Conforme a PCR progride, mais amplicons são criados resultando um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR.

As reações ocorreram nas seguintes concentrações: 0,75 µl do primer reverse e 0,75 de primer forward específico, 5 µl de master mix *sybergreen*® (Applied Biosystems, CA, EUA), 2,5 µl de água livre de nuclease RNA e 1µl de cDNA. Ao final, o produto da qRT-PCR era também submetido à eletroforese.

Os níveis de expressão dos genes foram obtidos através da quantificação relativa dos níveis de expressão, que utiliza a seguinte fórmula²⁷ $\Delta\Delta Ct$.

Tabela 3. *Primers* utilizados para quantificação dos genes e miRNAS

gene/miRNA	Ensaio
CD44s (SYBR)	5' TGT GTC TTG GTC TCT GGT AGC 3' 5' AAA GGA GCA GCA CTT CAG GA 3'
B2M (SYBR)	5' TCT CTG CTG GAT GAC GTG AG 3' 5' TCT CTC TTT CTG GCC TGG AG 3'
has2	Hs00193436
has3	Hs00193435
B2M	Hs99999907
hsa- miR-708	002341
hsa- miR-34a	000426
hsa- miR-199a	000498
hsa- miR-150	000473
hsa- miR-33a	002135
hsa- miR-200c	002300
hsa- miR-511	001111
hsa- miR-143	000466
hsa- miR-10a	000387
RNU43	001095

3.6 Análise estatística

Os métodos estatísticos foram empregados para comparar o perfil de expressão dos miRNAS e genes com os fatores prognósticos. Foi realizado o teste de Kolmogorov para análise de homogeneidade de variância. Para os grupos homogêneos, utilizamos o teste T para comparar dois grupos e ANOVA para três ou mais grupos. Para aqueles não homogêneos, usamos o teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis para três ou mais grupos.

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 19.0. Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Perfil de expressão dos miRNAs e seus genes alvos.

Quando analisamos o perfil de expressão dos genes e dos miRNAs comparada a HPB pelo método qRT-PCR, observamos uma superexpressão dos genes has2 e has3, e uma subexpressão do CD44s. A maioria dos miRNAs apresentou uma subexpressão, com exceção do miR-511. Na figura 5, podemos observar a dispersão da expressão de cada gene e miRNA analisado.

Figura 5. Dispersão dos perfis de expressão dos genes e dos miRNAs comparada com a HPB

4.2 Comparação do perfil de expressão do gene has2 e seus possíveis reguladores.

Quando comparamos a diferença de expressão do gene has2 com seus possíveis miRNA reguladores, observamos uma superexpressão de has2 em 98% dos casos e uma subexpressão dos miR-200c e 33a em 79,25% e 88,46% dos casos. O miR-511, por outro lado, mostrou um perfil de superexpressão em 67,3% dos casos (Figura 6).

Figura 6: Perfil de expressão do gene has2 e seus possíveis reguladores

4.3 Comparação do perfil de expressão do gene has3 e seus possíveis reguladores.

O gene has3 se mostrou superexpresso em 94% dos casos. Os possíveis miRNAs reguladores deste gene demonstraram uma expressão heterogênea do miR-10a, e uma superexpressão do miR-33a, que regula tanto o gene has2 e has3 (Figura 7).

Figura 7: Perfil de expressão do gene has3 e seus possíveis reguladores

4.4 Comparação do perfil de expressão do CD44 e seus possíveis miRNAs.

O CD44s apresentou-se subexpresso no CaP em 72,91% dos casos. A maioria dos miRNAs que possivelmente regulam este gene se apresentaram subexpressão, com exceção do miR-708, que apresentou uma expressão heterogênea em que 56,6% dos casos se encontram superexpressos (Figura 8).

Figura 8: Perfil de expressão do CD44s e seus possíveis reguladores

4.5 Comparação do perfil de expressão dos genes e seus possíveis miRNAs com os fatores prognósticos.

Quando analisamos as tabelas 4 e 5, observamos a correlação da expressão dos genes e miRNAs com os principais fatores prognósticos. Interessantemente observamos que a subexpressão do miR-200c correlacionou-se com escore de Gleason ≥ 7 ($p=0,026$) e com PSA ≥ 10 ng/mL ($P= 0,024$).

A menor expressão de miR-33a relacionou-se com PSA ≥ 10 ng/mL ($p=0,002$). Também observamos que a expressão do miR-143, que regula o CD44s, aumenta de forma relevante em pacientes com PSA ≥ 10 , porém esta correlação não apresentou significância estatística.

Não encontramos nenhuma correlação da expressão dos outros miRNAs e genes com os fatores prognósticos.

Tabela 4: Expressão dos genes has2, has3 e CD44s de acordo com o estadiamento patológico, PSA pré-operatório e escore de Gleason

	Estadiamento pTNM			PSA Ng/mL		Escore de Gleason			
	pT2	pT3	P	<10	≥10	p	< 7	≥7	P
has2									
Mediana	4,42	5,49	0,173*	5,02	3,99	1,000*	4,97	4,03	0,219*
Min – Max	0,42-83,40	2,68-23-31		1,05-83,40	1,09-23,31		0,42-59,47	1,05-83,4	
has3									
Mediana	4,33	3,56	0,568*	3,62	5,01	0,484*	5,01	3,56	0,407*
Min – Max	1,04-331,0	0,62-343,2		0,77-331,07	0,62-343,22		0,77-331,0	0,62-343,2	
CD44s									
Mediana	0,69	0,58	0,171*	0,63	0,61	0,988*	0,56	0,66	0,598*
Min – Max	0,25-3,47	0,09-6,78		0,16-6,78	0,09-3,47		0,17-6,78	0,09-3,18	

*Mann-Whitney Test, ** T-Test

Tabela 5: Expressão dos miRNAs de acordo com o estadiamento patológico, PSA pré-operatório e escore de Gleason

	Estadiamento pTNM			PSA Ng/mL		Escore de Gleason			
	pT2	pT3	p	<10	≥10	p	< 7	≥7	p
MiRNA 143									
Mediana	0,35	0,36	0,864*	0,30	1,20	0,120*	0,35	0,58	0,932*
Min – Max	0,00-14,17	0,00-2,98		0,00-14,17	0,04-2,98		0,00-14,17	0,00-2,75	
MiRNA 708									
Mediana	1,45	1,19	0,505*	1,41	2,36	0,620*	1,30	1,37	0,444*
Min – Max	0,01-14,95	0,03-7,43		0,01-14,95	0,03-6,80		0,01-14,95	0,16-7,43	
MiRNA 34^a									
Mediana	0,00	0,00	0,962*	0,00	0,00	0,638*	0,00	0,00	0,102*
Min – Max	0,00-0,82	0,00-11,36		0,00-0,82	0,00-11,36		0,00-11,36	0,00-0,11	
MiRNA 200c									
Mediana	0,46	0,43	0,856*	0,62	0,36	0,024*	0,64	0,38	0,026*
Min – Max	0,03-1,61	0,05-11,38		0,05-11,38	0,14-0,80		0,03-1,61	0,05-11,38	
MiRNA 33^a									
Mediana	0,04	0,01	0,184*	0,04	0,00	0,002*	0,03	0,02	0,213*
Min – Max	0,00-28,64	0,00-0,21		0,00-28,64	0,00-0,20		0,00-1,48	0,00-28,64	
MiRNA 511									
Mediana	1,63	2,16	0,338*	2,04	0,80	0,128*	1,84	1,62	0,790*
Min – Max	0,15-74,62	0,44-72,37		0,15-74,62	0,22-36,16		0,15-74,62	0,22-37,59	
MiRNA 10^a									
Mediana	0,91	0,96	0,315**	0,93	1,12	0,744**	0,97	0,93	0,087**
Min – Max	0,00-4,39	0,13-1,87		0,00-4,39	0,30-2,78		0,00-4,39	0,02-2,78	
MiRNA 199^a									
Mediana	0,17	0,21	0,587*	0,16	0,28	0,255*	0,15	0,24	1,000*
Min – Max	0,03-1,97	0,02-0,076		0,02-1,97	0,07-0,38		0,02-1,97	0,04-1,23	
MiRNA 150									
Mediana	0,25	0,17	0,529*	0,30	0,13	0,675*	0,20	0,24	0,419*
Min – Max	0,01-8,26	0,02-3,10		0,01-8,26	0,04-2,13		0,01-8,26	0,02-4,89	

4.6 Comparação do perfil de expressão dos genes e seus possíveis miRNAs com a graduação WHO/ISUP.

Quando correlacionamos a expressão dos genes e dos miRNAs com a graduação WHO/ISUP, observamos um comportamento interessante do miRNA 708, onde ocorre uma mudança de perfil de expressão a partir do ISUP 2, sendo mais expresso no ISUP3.

Apesar da significância marginal ($p=0,091$), houve também uma importante redução na expressão do miR-200c quando ISUP foi ≥ 2 .

Os genes has2 e has3 também apresentaram maior expressão no ISUP 1 e 2, porém não houve significância estatística (Tabela 6).

Tabela 6: Expressão dos genes e miRNAs de acordo com a graduação WHO/ISUP

ISUP						
	1	2	3	4	5	p
has2						
Mediana	6,16	6,71	4,29	4,03	4,35	0,674*
Min - Max	1,12-20,59	0,42-17,46	1,09-59-47	2,07-83,40	1,05-23,31	
has3						
Mediana	7,57	7,46	2,62	3,56	3,51	0,762*
Min - Max	1,56-100,43	1,47-164,28	0,77-331,07	0,62-40,34	2,58-343,22	
CD44s						
Mediana	0,57	0,41	0,69	0,69	0,45	0,234*
Min - Max	0,22-1,53	0,17-3,47	0,29-6,78	0,09-3,18	0,16-2,20	
MiRNA 143						
Mediana	0,49	0,20	0,36	0,92	0,21	0,748*
Min - Max	0,00-9,44	0,00-14,17	0,01-1,20	0,00-2,75	0,04-1,85	
MiRNA 708						
Mediana	0,98	0,56	2,49	1,88	1,11	0,512*
Min - Max	0,01-14,95	0,03-8,08	0,09-7,35	0,16-7,43	0,97-2,43	
MiRNA 34a						
Mediana	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,411*
Min - Max	0,00-0,82	0,00-11,36	0,00-0,02	0,00-0,11	0,00-0,01	
MiRNA 200c						
Mediana	0,87	0,36	0,43	0,43	0,34	0,091*
Min - Max	0,14-1,51	0,03-0,86	0,35-1,61	0,12-11,38	0,05-0,41	
MiRNA 33a						
Mediana	0,04	0,07	0,02	0,02	0,08	0,732*
Min - Max	0,01-0,51	0,00-0,71	0,00-1,48	0,00-28,64	0,00-0,20	
MiRNA 511						
Mediana	2,05	1,36	8,02	1,30	2,04	0,759*
Min - Max	0,15-24,01	0,48-11,41	0,62-74,62	0,22-37,59	1,27-26,14	
MiRNA 10a						
Mediana	1,36	0,42	0,73	0,87	0,97	0,445**
Min - Max	0,00-4,39	0,02-2,72	0,13-2,59	0,02-278	0,36-1,11	
MiRNA 199a						
Mediana	0,16	0,13	0,18	0,31	0,13	0,224*
Min - Max	0,02-1,97	0,03-0,37	0,02-0,38	0,04-1,23	0,07-0,21	
MiRNA 150						
Mediana	0,19	0,31	0,17	0,22	0,31	0,864*
Min - Max	0,02-8,26	0,01-2,97	0,03-5,05	0,02-4,89	0,10-2,13	

*Kruskal-Wallis, **Anova

4.7 Comparação do perfil de expressão dos genes e seus possíveis miRNAs com recidiva bioquímica.

Quando comparamos a expressão dos miRNAs com a recidiva, observamos que a menor expressão do miR-200c foi correlacionada com pacientes que recidivaram ($p=0,041$) (Tabela 7). Nos outros miRNAs e genes analisados não encontramos significância estatística.

Tabela 7: Expressão dos genes e miRNAs de acordo com a recidiva

	Recidiva		
	Sim	Não	P
has2			
Mediana	4,11	4,92	0,505*
Min – Max	1,21-17,46	1,05-83,4	
has3			
Mediana	2,99	5,78	0,547*
Min – Max	0,77-87,43	0,62-343,22	
CD44s			
Mediana	0,66	0,61	0,501*
Min – Max	0,25-3,47	0,09-6,78	
MiRNA 143			
Mediana	0,84	0,36	0,470*
Min – Max	0,00-0,52	0,00-14,17	
MiRNA 708			
Mediana	1,25	1,78	1,70*
Min – Max	0,02-4,09	0,01-14,95	
MiRNA 34^a			
Mediana	0,00	0,00	0,866*
Min – Max	0,00-11,36	0,00-0,22	
MiRNA 200c			
Mediana	0,37	0,64	0,041*
Min – Max	0,09-1,60	0,05-11,38	
MiRNA 33^a			
Mediana	0,00	0,04	0,359*
Min – Max	0,00-28,64	0,00-1,02	
MiRNA 511			
Mediana	1,31	1,35	0,756*
Min – Max	0,36-72-37	0,15-74,62	
MiRNA 10^a			
Mediana	0,93	1,11	0,114**
Min – Max	0,13-1,98	0,02-4,39	
MiRNA 199^a			
Mediana	0,32	0,17	0,413*
Min – Max	0,02-1,23	0,02-1,97	
MiRNA 150			
Mediana	0,15	0,32	0,211*
Min – Max	0,03-0,52	0,01-8,26	

*Mann-Whitney Test, ** T-Test

5. Discussão

Poucos estudos até hoje analisaram a regulação dos miRNAs sobre o, has2, has3 e o CD44 e sua importância no CaP. No presente estudo encontramos uma superexpressão dos genes has2 e has3 e uma subexpressão do CD44s no CaP localizado tratado com cirurgia. Em relação aos possíveis miRNAs que regulam estes genes, observamos uma subexpressão de todos os miRNAs na maioria dos casos com exceção do miR-511, que se encontrou superexpresso. Os miR-10a e 708 apresentaram expressão heterogênea.

Os genes has2 e has3, responsáveis pela síntese do AH, e confirmamos os dados da literatura demonstrando que ambos se apresentaram superexpressos em 98% e 93% dos casos respectivamente. O microambiente rico em AH contribui para a neovascularização tumoral, aumentando o recrutamento de células do estroma tais como fibroblastos, monócitos/macrófagos, células endoteliais, células estaminais e células mesenquimais, favorecendo o crescimento neoplásico (65). A quantidade de AH é controlada por um equilíbrio entre a síntese e a degradação, mas nos tumores malignos mostrou-se acumulado no estroma sendo seu efeito na tumorigênese dependente de sua concentração (45). No CaP foi demonstrado que a maior produção do AH através do gene has2, está relacionada com pior prognóstico, promovendo a angiogênese e o crescimento do tumor (45, 66). Do mesmo modo, a indução da expressão de has3 promoveu aceleração da angiogênese no CaP (67).

O principal receptor de AH é o CD44. A interação CD44/AH ativa várias vias e contribui para o controle da adesão celular, invasão e crescimento

através da ativação de múltiplas vias celulares: a Ankyrina, que está unida à cauda citoplasmática do CD44, promove a ativação do citoesqueleto essencial à adesão celular e à migração. A ativação de RhoA e Rac1, pequenas proteínas GTPase, resulta em fosforilação da cadeia leve de miosina, organização de microtúbulos e migração celular. RhoA também medeia a redução do pH extracelular, ativação de enzimas de degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, invasão das células tumorais. CD44/AH também ativa o receptor de tirosina quinases contribuindo para muitos aspectos do comportamento das células malignas (38).

O CD44s foi avaliado por nós em recente dissertação de mestrado, onde observamos diminuição de sua expressão e concomitante maior expressão de suas variantes CD44v no CaP. O CD44s já foi amplamente discutido na literatura em vários tumores, inclusive no CaP, onde atualmente é estudado como marcador de células troncos tumorais (68, 69). O *splicing alternativo* e polimorfismos, podem provocar mudanças nas regiões 3' UTR, aumentando o número de miRNAs alvos dos genes que sofrem estas alterações, (70) Acreditamos que a perda de função dos miRNAs que foram descritos que controlam a CD44s, podem estar promovendo a superexpressão das variantes que estão superexpressas no CaP.

Um mecanismo alternativo que poderia estar envolvido no desequilíbrio do AH e do CD44 são os miRNAs. Essas moléculas são importantes reguladores da expressão gênica e a perda de expressão de alguns miRNAs podem promover um aumento de expressão das sintases do ácido hialurônico has2 e has3. Ao estudar 53 casos de PCa, mostramos que, enquanto has2 e has3 estão superexpressos, os miR-200c, 33a, 199a, 150,

143, 34a estão subexpressos na maioria dos casos de PCa. Identificamos que os níveis mais baixos de miR-33a estão relacionados a níveis mais elevados de PSA e, além disso, os pacientes com níveis mais baixos de miR-200c têm níveis mais elevados de PSA, maior escore de Gleason e, além disso, estão relacionados a maior probabilidade de recidiva bioquímica.

As mudanças na expressão de miRNAs podem ser importantes no comportamento dos tumores e essa caracterização pode ser útil no encontro novos biomarcadores do comportamento tumoral. Também, podem sugerir novos alvos terapêuticos efetivos para o tratamento do câncer (71).

Em estudo anterior em nosso laboratório LIM55, FMUSP, estudamos miRNAs e genes relacionados à transição epitélio-mesenquimal (TEM) e mostramos que a menor expressão do miR-200c está relacionada ao maior escore de Gleason (58), confirmando nossas descobertas. Podemos especular que um dos mecanismos envolvidos com esse processo de transição epitélio-mesenquimal, fundamental para a disseminação tumoral, seja a perda de controle das AH sintases por esse miRNA que resultaria em aumento de sua expressão.

A família do miR-200 é conhecida por suprimir a transição epitélio-mesenquimal em várias neoplasias, incluindo o CaP (71, 73, 74). Nesse processo as células têm maior habilidade para sobreviver e são mais resistentes a apoptose. Sabe-se que a expressão de miR-200 favorece a apoptose. À medida que a neoplasia progride, há uma diminuição na expressão de miR-200 e aquisição de um fenótipo mesenquimal, que será responsável pela invasão tumoral e migração celular (75,76).

Estudos descrevem que a subexpressão do miR-33a promove tumorigênese em células de câncer de mama (77) e em células de câncer de pâncreas (78). A baixa expressão de miR-33a está associada a um aumento na expressão do gene Twist, também relacionado ao processo de disseminação tumoral, promovendo invasão e desenvolvimento de metástases de câncer de pulmão (79). No CaP, o miR-33a é pouco estudado e sua função na progressão do tumor e no desenvolvimento de metástases ainda é desconhecida. Os poucos estudos publicados mostram que o miR-33a está significativamente subexpresso no tecido tumoral (80) confirmando nossos achados. Um resultado diferente foi mostrado por Li e colaboradores que encontraram a superexpressão do miR-33a no tecido do CaP e em linhagem celulares (81).

O miR-199a se apresentou subexpresso em 96% dos casos, mas não foi encontrada correlação desta perda de expressão com os fatores prognósticos ou recidiva bioquímica. Nosso laboratório já analisou este miRNA no câncer de bexiga, onde ele apresentou baixa expressão tanto nos tumores não invasivos como nos invasivos, não apresentando significâncias estatísticas para os fatores prognósticos (82). Outros estudos descreveram o CD44 como alvo do miR-199a, como por exemplo no câncer de ovário (59). No carcinoma espinho celular cutâneo foi observado que além do miR-199a regular o CD44, a sua subexpressão associou-se com a atividade das MMP2 e MMP9, promovendo a migração celular. De acordo com pesquisas já publicadas, uma das funções da MMP9 é clivar o ectodomínio de CD44, fazendo com que ela seja liberada para a matriz celular promovendo a degradação da matriz e migração celular (83). No CaP, ainda não existem estudos que mostrem o CD44 e suas variantes

como alvo do miR-199a, porém já foi observado que este regula a Kinase A e HIF-1 α contribuindo para o fenótipo maligno do CaP (84).

O miR-150 foi subexpresso em 81% dos casos. Apesar de ser avaliado em várias outras neoplasias como oncomir ou supressor tumoral, poucos analisaram este miRNA no CaP. A literatura demonstra que no CaP o miR-150 está superexpresso em células que expressam o CD44, e esta expressão está relacionada com pior prognóstico da neoplasia (85) (86). Em nossos estudos encontramos resultados discordantes e supomos que ele tenha um papel supressor tumoral no CaP. A baixa expressão do miR-150 foi descrita como uma forma de alterar a expressão do gene ZEB1 no carcinoma de células escamosas do esôfago (87) e no câncer de ovário (88), um importante indutor da TEM. E como já sabemos o CD44 também tem um importante papel na TEM. No entanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de verificar o papel deste miRNA na regulação das variantes do CD44 no CaP.

O miR-143 apresentou subexpressão em 64% dos casos e não mostrou nenhuma correlação estatística com os fatores prognósticos e recidiva bioquímica. Poucos estudos avaliaram a expressão do miR-143 no CaP regulando o CD44, porém alguns trabalhos descreveram este miRNA como supressor tumoral como por exemplo, no câncer de cólon (89). No CaP observou-se que a expressão induzida do miR-143 em linhagem celular PC3 reprimiu a progressão metastática através da inibição das características das células troncos tumorais (90). Outro estudo, com a mesma estratégia mostrou que miR-143 diminuiu a migração e invasão tumoral (91). No câncer de pulmão, de forma interessante, o miR-143 demonstrou regular a CD44v3, promovendo a migração e invasão celular (92). Este estudo confirma a

expectativa de que as variantes do CD44, que se encontram superexpressas no CaP (46), possam ser reguladas pelos miRNAs analisados neste projeto.

O miR-34a se apresentou subexpresso em 96% dos casos. O CD44 já foi identificado como alvo deste miRNA em várias neoplasias, inclusive no CaP. Liu e colaboradores em 2011, observaram que o miR-34a se encontra subexpresso nas células em que o CD44 está superexpresso, e a indução deste miRNA diminuiu a expressão do CD44. A baixa expressão do miR-34a está relacionada com a mutação da p53 em vários tumores, inclusive no CaP (62). A proteína do gene p53 regula uma série de genes os quais induzem a parada do ciclo celular, apoptose, senescência e reparo do DNA. p53 regula de forma negativa o CD44s e suas variantes em células de câncer de mama, além disso, a superexpressão do CD44 promove a resistência a quimioterapia quando expresso em células com o p53 mutado (93).

Poucos estudos analisaram o perfil de expressão do miR-511 no CaP. Zhang e colaboradores em 2017, observou que a subexpressão do miR-511 em linhagem celulares e em tecido de CaP por qRT-PCR (94). Entretanto nosso estudo mostrou uma superexpressão em 66% dos casos (95). No câncer de pulmão, este miRNA também apresentou um perfil supressor tumoral, e a inibição do seu gene alvo, TRIB2, diminuiu a proliferação celular (96). Porém, na maioria dos tumores em que este miRNA já foi analisado, ele se encontrou subexpresso. No carcinoma hepatocelular, o miR-511 foi descrito como subexpresso, regulando o gene PIK3R3, e a indução deste miRNA diminuiu a proliferação, migração e invasão celular. Demonstraram, também, que este miRNA inibiu a fosforilação de AKT e mTOR (97).

O miR-10a de acordo com o site target scan tem como alvo has3 e ainda não existem estudos relacionando este gene com este miRNA. Em nosso estudo, o miR-10a apresentou perfil de expressão heterogênea, com 52,8% dos casos subexpressos, e não apresentou nenhuma relação com os fatores prognósticos e recidiva bioquímica. Entretanto, este miRNA já foi estudado em nosso laboratório em câncer de bexiga, atuando como um oncomir, onde foi observado que sua maior expressão foi relacionada com menor sobrevida livre de recidiva e sobrevida câncer-específica em tumores invasivos de alto grau (98). Este miRNA também já foi descrito como superexpresso em outras neoplasias, como câncer de pâncreas e mama (99, 100). No CaP, o miR-10a foi descrito como subexpresso em estudo onde foram pesquisados 1046 miRNAs em 499 casos (101). Entretanto, estudo de microarray, validado por qRT-PCR, mostrou que o miR-10 se encontra superexpresso no CaP (102).

O miR-708 demonstrou uma expressão heterogênea com 56% dos casos superexpressos. Porém, de acordo com a graduação WHO/ISUP, este miRNA se encontra subexpresso nos tumores de baixo grau. Apenas dois trabalhos na literatura avaliaram a expressão deste miRNA no CaP, e ambos apresentaram o miR-708 como subexpressos. Saini e colaboradores (2012) observaram que ele se encontra subexpresso em células nas quais o CD44s está superexpresso, e a menor expressão deste miRNA foi correlacionada com pior prognóstico no CaP (61, 103).

A seguinte figura sintetiza nossos achados e hipóteses em relação aos genes e miRNAs analisados e o comportamento do tumor.

Figura 9: Esquema do perfil de expressão dos genes e miRNAs analisados no presente estudo, e a hipótese do comportamento do tumor.

5.1 Perspectivas

Como planejamento futuro, entendemos que ensaios *in vitro* serão necessários para comprovar a ação destes miRNA sobre seus genes alvo. Nestes ensaios, a expressão gênica será inibida ou estimulada, e desta forma, através de análises funcionais, as hipóteses levantadas no presente estudo poderão ser confirmadas.

6. Conclusões

Os genes has2 e has3 responsáveis pela síntese de AH se encontram superexpressos no câncer localizado de próstata.

Os miRNAs, 33a, 34a, 143, 150, 199 e 200c, supostos reguladores desses genes apresentaram subexpressão com exceção do miR-511.

Os resultados nos fazem supor que existe uma via regulatória que envolve esses miRNAs e os genes has2 e has3 que tem influência no comportamento do câncer localizado de próstata.

Os miR-10a e 708 apresentaram expressão heterogênea.

A menor expressão do miR-200c associou-se com níveis séricos de $\text{PSA} \geq 10 \text{ ng/mL}$ e score de Gleason ≥ 7 .

A menor expressão de miR-200c associou-se a recidiva bioquímica.

A menor expressão de miR-33a também se correlacionou com níveis de $\text{PSA} \geq 10 \text{ ng/mL}$.

Os outros miRNAs analisados neste trabalho não apresentaram correlação com os fatores prognósticos dessa neoplasia.

7. Referências

1. INCA. (Instituto Nacional do Câncer) [online]. Ministério da saúde, Brasil; 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015 Jan-Feb;65(1):5-29.
3. SEER. (The Surveillance, Epidemiology, and End Results) [online]. Disponível em: <http://seer.cancer.gov>
4. Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelsson A, Adolfsson J, Stattin P, et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *European urology*. 2012 Oct;62(4):656-61.
5. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World journal of urology*. 2012 Apr;30(2):143-8.
6. Jones AL, Chinegwundoh F. Update on prostate cancer in black men within the UK. *Ecancermedicalscience*. 2014;8:455.
7. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clinical epidemiology*. 2012;4:1-11. PubMed PMID: 22291478.
8. Schroder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, et al. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998 Dec 2;90(23):1817-23.
9. Junior AN, Filho MZ, Reis RB. *Urologia Fundamental* 2010. São Paulo: Planmark Editora. 189 p.
10. Dong F, Kattan MW, Steyerberg EW, Jones JS, Stephenson AJ, Schroder FH, et al. Validation of pretreatment nomograms for predicting indolent prostate cancer: efficacy in contemporary urological practice. *J Urol*. 2008 Jul;180(1):150-4; discussion 4.
11. Djavan B, Zlotta A, Remzi M, Ghawidel K, Basharkhah A, Schulman CC, et al. Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men. *The Journal of urology*. 2000 Apr;163(4):1144-8; discussion 8-9.
12. Bratan F, Niaf E, Melodelima C, Chesnais AL, Souchon R, Mège-Lechevallier F, Colombel M, Rouvière O. Influence of imaging and histological factors on prostate cancer detection and localisation on multiparametric MRI: a prospective study. *Eur Radiol*. 2013 Jul;23(7):2019-29

13. Selnæs KM1, Heerschap A, Jensen LR, Tessem MB, Schweder GJ, Goa PE, Viset T, Angelsen A, Gribbestad IS. Peripheral zone prostate cancer localization by multiparametric magnetic resonance at 3 T: unbiased cancer identification by matching to histopathology. *Invest Radiol*. 2012 Nov;47(11):624-33
14. Narayan V, Jiang S, Warlick CA. Early Stage Cancer in Older Adults: Prostate-Avoiding Overtreatment and Undertreatment. *Cancer J*. 2017 Jul/Aug;23(4):238-241
15. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet*. 2014 Dec 6;384(9959):2027-35.
16. U.S. Preventive services task force. Disponível em: <<https://screeningforprostatecancer.org>>. Acesso em 25 de agosto de 2017.
17. Moyer VA, Force USPST. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine*. 2012 Jul 17;157(2):120-34.
18. Roobol MJ, Steyerberg EW, Kranse R, Wolters T, van den Bergh RC, Bangma CH, et al. A risk-based strategy improves prostate-specific antigen-driven detection of prostate cancer. *European urology*. 2010 Jan;57(1):79-85.
19. Corrêa LA BM, Souza AAO, Sabaneef J. Câncer de Próstata: Fatores Prognósticos. Sociedade Brasileira de Urologia; 2006.
20. Miguel Srougi LAR, Afonso Celso Piovesan, José Roberto Colombo, Adriano Nesrallah. Doenças da Próstata. In: Paulo) RMS, editor. 2008.
21. Toner L, Weerakoon M, Bolton DM, Ryan A, Katelaris N, Lawrentschuk N. Magnetic resonance imaging for prostate cancer: Comparative studies including radical prostatectomy specimens and template transperineal biopsy. *Prostate international*. 2015 Dec;3(4):107-14.
22. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology*. 1992 Mar;23(3):273-9.
23. Feneley MR, Partin AW. Indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. *The Urologic clinics of North America*. 2001 Aug;28(3):443-58.
24. Moreira Leite KR, Camara-Lopes LH, Dall'Oglio MF, Cury J, Antunes AA, Sanudo A, et al. Upgrading the Gleason score in extended prostate biopsy: implications for treatment choice. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009 Feb 1;73(2):353-6.

25. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL, Committee IG. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2005 Sep;29(9):1228-42.
26. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*. 2015 Oct 21.
27. Berman DM, Epstein JI. When is prostate cancer really cancer? *The Urologic clinics of North America*. 2014 May;41(2):339-46.
28. Bostrom PJ, Bjartell AS, Catto JW, Eggner SE, Lilja H, Loeb S, et al. Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer. *European urology*. 2015 Dec;68(6):1033-44.
29. Pontes J, Jr., Srougi M, Borra PM, Dall' Oglio MF, Ribeiro-Filho LA, Leite KR. E-cadherin and beta-catenin loss of expression related to bone metastasis in prostate cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2010 Mar;18(2):179-84.
30. Pontes-Junior J, Reis ST, de Oliveira LC, Sant'anna AC, Dall'oglio MF, Antunes AA, et al. Association between integrin expression and prognosis in localized prostate cancer. *The Prostate*. 2010 Aug;70(11):1189-95.
31. Valastyan S, Weinberg RA. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules. *J Cell Sci*. 2011 Apr 1;124(Pt 7):999-1006.
32. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010 Sep;11(9):633-43.
33. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature reviews Cancer*. 2011 Apr;11(4):254-67.
34. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *Journal of cell science*. 2004 Jan 26;117(Pt 3):373-80.
35. Louderbough JM, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular cancer research : MCR*. 2011 Dec;9(12):1573-86.
36. Maniatis T, Tasic B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):236-43.

37. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & development*. 2003 Feb 15;17(4):419-37.
38. Karbownik MS, Nowak JZ. Hyaluronan: towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacological reports* : PR. 2013;65(5):1056-74.
39. Siiskonen H, Oikari S, Pasonen-Seppanen S, Rilla K. Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions. *Frontiers in immunology*. 2015;6:43.
40. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *The FEBS journal*. 2011 May;278(9):1429-43.
41. Wang SJ, Earle C, Wong G, Bourguignon LY. Role of hyaluronan synthase 2 to promote CD44-dependent oral cavity squamous cell carcinoma progression. *Head & neck*. 2013 Apr;35(4):511-20.
42. Teng BP, Heffler MD, Lai EC, Zhao YL, LeVea CM, Golubovskaya VM, et al. Inhibition of hyaluronan synthase-3 decreases subcutaneous colon cancer growth by increasing apoptosis. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2011 Sep;11(7):620-8.
43. Itano N, Sawai T, Miyaishi O, Kimata K. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer research*. 1999 May 15;59(10):2499-504.
44. Wang L, Jia E. Ovarian cancer targeted hyaluronic acid-based nanoparticle system for paclitaxel delivery to overcome drug resistance. *Drug delivery*. 2015 Nov 4:1-8.
45. Simpson MA. Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. *The American journal of pathology*. 2006 Jul;169(1):247-57. PubMed PMID: 16816377.
46. Moura CM, Pontes J, Jr., Reis ST, Viana NI, Morais DR, Dip N, et al. Expression profile of standard and variants forms of CD44 related to prostate cancer behavior. *The International journal of biological markers*. 2015 Jan-Mar;30(1):e49-55.
47. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):673-6.
48. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*. 2005 Dec 16;310(5755):1817-21.

49. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
50. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*. 2003 Apr 4;113(1):25-36.
51. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current biology : CB*. 2003 Apr 29;13(9):790-5.
52. Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *Rna*. 2003 Feb;9(2):180-6.
53. Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*. 2004 Mar 26;303(5666):2022-5.
54. Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna*. 2003 Oct;9(10):1274-81.
55. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Camara-Lopes LH, et al. MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer--from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. *Urologic oncology*. 2013 Aug;31(6):796-801.
56. Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic acids research*. 2003 Nov 15;31(22):6593-7.
57. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *European journal of cancer*. 2007 Jul;43(10):1529-44.
58. Katz B, Reis ST, Viana NI, Morais DR, Moura CM, Dip N, et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PloS one*. 2014;9(11):e113700.
59. Cheng W, Liu T, Wan X, Gao Y, Wang H. MicroRNA-199a targets CD44 to suppress the tumorigenicity and multidrug resistance of ovarian cancer-initiating cells. *FEBS J*. 2012 Jun;279(11):2047-59.
60. Chen L, Bourguignon LY. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Molecular cancer*. 2014;13:52. PubMed PMID: 24606718. Pubmed Central PMCID: 3975292.

61. Saini S, Majid S, Shahryari V, Arora S, Yamamura S, Chang I, et al. miRNA-708 control of CD44(+) prostate cancer-initiating cells. *Cancer research*. 2012 Jul 15;72(14):3618-30.
62. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nature medicine*. 2011 Feb;17(2):211-5.
63. Henry JC, Park JK, Jiang J, Kim JH, Nagorney DM, Roberts LR, et al. miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 Dec 3;403(1):120-5.
64. Gao Y, Feng Y, Shen JK, Lin M, Choy E, Cote GM, et al. CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma. *Scientific reports*. 2015;5:11365.
65. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia*. 2007 Oct;21(10):2085-9.
66. Rizzardi AE, Vogel RI, Koopmeiners JS, Forster CL, Marston LO, Rosener NK, et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors. *Cancer*. 2014 Jun 15;120(12):1800-9.
67. Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer research*. 2001 Jul 1;61(13):5207-14.
68. Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Experimental cell research*. 2005 Oct 15;310(1):205-17.
69. Heldin P, Basu K, Kozlova I, Porsch H. HAS2 and CD44 in breast tumorigenesis. *Advances in cancer research*. 2014;123:211-29.
70. Psseti F, Ferreira CG, Costa FF. The impact of microRNAs and alternative splicing in pharmacogenomics. *The pharmacogenomics journal*. 2009 Feb; 9(1): 1-13.
71. Daniel R, Wu Q, Williams V, Clark G, Guruli G, Zehner Z. A Panel of MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers for the Identification of Prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 16;18(6)
72. Ma C, Ding YC, Yu W, Wang Q, Meng B, Huang T. MicroRNA-200c overexpression plays an inhibitory role in human pancreatic cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Minerva medica*. 2015 Aug;106(4):193-202.

73. Liu S, Tetzlaff MT, Wang T, Yang R, Xie L, Zhang G, et al. miR-200c/Bmi1 axis and epithelial-mesenchymal transition contribute to acquired resistance to BRAF inhibitor treatment. *Pigment cell & melanoma research*. 2015 Jul;28(4):431-41.
74. Banyard J, Chung I, Wilson AM, Vetter G, Le Bechec A, Bielenberg DR, et al. Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Scientific reports*. 2013;3:3151.
75. Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1131-43
76. Mejlvang J1, Kriaievska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2007 Nov;18(11):4615-24
77. Zhang C, Zhang Y, Ding W, Lin Y, Huang Z, Luo Q. MiR-33a suppresses breast cancer cell proliferation and metastasis by targeting ADAM9 and ROS1. *Protein Cell*. 2015;6(12):881–9
78. Liang C, Wang Z, Li YY, Yu BH, Zhang F, Li HY. miR-33a suppresses the nuclear translocation of beta-catenin to enhance gemcitabine sensitivity in human pancreatic cancer cells. *Tumour Biol: J Int Soc Oncodev Biol Med*. 2015;36(12):9395–403
79. Yang L, Yang J, Li J, Shen X, Le Y, Zhou C, et al. MircoRNA-33a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis and could be a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Scientific reports*. 2015;5:13677
80. Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6162–70
81. Q. Li, S. Lu, X. Li, G. Hou, L. Yan, W. Zhang, B. Qiao. Biological function and mechanism of miR-33a in prostate cancer survival and metastasis: via downregulating Engrailed-2. *Clin Transl Oncol*. 2017 May;19(5):562-570
82. Egeland NG, Lunde S, Jonsdottir K, Lende TH, Cronin-Fenton D, Gilje B, et al. The Role of MicroRNAs as Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):24243-75.
83. Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, et al. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. *Annals of surgical oncology*. 2012 Jul;19(7):2394-402.

84. Qu Y1, Huang X2, Li Z2, Liu J3, Wu J3, Chen D3, Zhao F3, Mu D4. miR-199a-3p inhibits aurora kinase A and attenuates prostate cancer growth: new avenue for prostate cancer treatment. *Am J Pathol*. 2014 May;184(5):1541-9
85. Liu DZ, Zhang HY, Long XL, S. LZ, Zhang XY, Han GY, et al. MIR-150 promotes prostate cancer stem cell development via suppressing p27Kip1. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2015 Nov;19(22):4344-52.
86. Dezhong L, Xiaoyi Z, Xianlian L, Hongyan Z, Guohua Z, Bo S, et al. miR-150 is a factor of survival in prostate cancer patients. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2015 Jan-Feb;20(1):173-9.
87. Yokobori T, Suzuki S, Tanaka N, Inose T, Sohda M, Sano A, et al. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1. *Cancer science*. 2013 Jan;104(1):48-54.
88. Jin M, Yang Z, Ye W, Xu H, Hua X. MicroRNA-150 predicts a favorable prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, and inhibits cell invasion and metastasis by suppressing transcriptional repressor ZEB1. *PloS one*. 2014;9(8):e103965.
89. Pagliuca A, Valvo C, Fabrizi E, di Martino S, Biffoni M, Runci D, et al. Analysis of the combined action of miR-143 and miR-145 on oncogenic pathways in colorectal cancer cells reveals a coordinate program of gene repression. *Oncogene*. 2013 Oct;32(40):4806-13.
90. Huang S, Guo W, Tang Y, Ren D, Zou X, Peng X. miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. *Oncology reports*. 2012 Nov;28(5):1831-7.
91. Kojima S, Enokida H, Yoshino H, Itesako T, Chiyomaru T, Kinoshita T, et al. The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer. *Journal of human genetics*. 2014 Feb;59(2):78-87.
92. Ma Q, Jiang Q, Pu Q, Zhang X, Yang W, Wang Y, et al. MicroRNA-143 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer and its relative mechanism. *International journal of biological sciences*. 2013;9(7):680-92.
93. Godar S, Ince TA, Bell GW, Feldser D, Donaher JL, Bergh J, et al. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell*. 2008 Jul 11;134(1):62-73.

94. Zhang F1, Wu Z2. Significantly altered expression of miR-511-3p and its target AKT3 has negative prognostic value in human prostate cancer. *Biochimie*. 2017 Jun 14. pii: S0300-9084(17)30151-7
95. Zhang F, Wu Z. Significantly altered expression of miR-511-3p and its target AKT3 has negative prognostic value in human prostate cancer. *Biochimie*. 2017 Jun 14; S0300-9084(17)30151-7
96. Cao G, Dong W, Meng X, Liu H, Liao H, Liu S. MiR-511 inhibits growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting PIK3R3. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015 Jun;36(6):4453-9.
97. Zhang C, Chi YL, Wang PY, Wang YQ, Zhang YX, Deng J, et al. miR-511 and miR-1297 inhibit human lung adenocarcinoma cell proliferation by targeting oncogene TRIB2. *PloS one*. 2012;7(10):e46090.
98. Dip N, Reis ST, Timoszczuk LS, Viana NI, Piantino CB, Morais DR, et al. Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile. *The Journal of urology*. 2012 Nov;188(5):1951-6.
99. Egeland NG, Lunde S, Jonsdottir K, Lende TH, Cronin-Fenton D, Gilje B, et al. The Role of MicroRNAs as Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):24243-75.
100. Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, et al. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. *Annals of surgical oncology*. 2012 Jul;19(7):2394-402.
101. Xiaoli Z, Yawei W, Lianna L, Haifeng L, Hui Z. Screening of Target Genes and Regulatory Function of miRNAs as Prognostic Indicators for Prostate Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:3748-59.
102. Liu DZ, Zhang HY, Long XL, S. LZ, Zhang XY, Han GY, et al. MIR-150 promotes prostate cancer stem cell development via suppressing p27Kip1. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2015 Nov;19(22):4344-52.
103. Geysen HM, Barteling SJ, Meloen RH. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985 Jan;82(1):178-82.

Anexo A – Valores de expressão dos miRNAs estudados para cada amostra.

	mir 199	mir 150	mir 143	mir 10a	mir 200c	mir 708	mir 34a	mir33a	mir 511	has2	has3	CD44s
89	0,43	0,15	4,79	1,91	1,04	0,01	0,09	0,01	0,15	4,20	2,68	0,40
123	0,49	0,18	1,36	1,13	0,42	1,62	0,82	0,01	2,25	6,89	2,17	0,53
270	0,60	0,10	1,50	1,58	0,47	14,95	0,22	0,03	0,45	4,62	6,96	0,53
281	0,16	0,12	0,82	0,72	1,30	1,78	0,20	0,01	0,36	2,78	2,78	0,61
361	0,11	0,02	0,65	0,34	1,01	2,79	0,61	0,04	1,84	1,12	1,56	0,44
499	0,15	0,20	0,32	1,45	0,14	0,66	0,30		24,01	7,41	1,64	0,35
1166	0,11	0,04	0,10	0,85	0,88	0,21	0,00	0,51	16,06	6,16	17,08	0,79
1287	0,27	2,60	0,02	0,00	1,00	0,20	0,00	0,24	4,50	6,04	8,99	1,46
1284	0,07	2,96	0,04	1,26	0,86	1,30	0,01	0,02	0,96	20,59	8,19	0,22
1276	0,11	2,90	0,02	4,39	0,67	0,41	0,00	0,04	1,42	9,23	100,43	0,70
1307	1,97	8,26	9,44	1,90	1,51	13,15	0,00	0,40	5,81		8,60	
1282	0,02	3,10	0,00	1,87	0,66	0,11	0,00	0,21	3,37	12,34	10,94	1,53
272	0,12	0,07	0,12	0,31	0,09	0,09	0,01	0,00	0,39	1,21	1,80	0,50
284	0,76	0,34	1,27	1,14	0,84	1,54	0,00	0,03	1,29	4,11	2,41	0,25
310	0,31	0,52	0,24	0,97	0,40	2,09	0,00	0,00		1,41	1,04	1,04
363	0,34	0,31	0,50	1,41	0,35	2,03	0,00	0,01	0,88	5,63	0,77	1,67
385	0,23	0,35	1,20	1,85	0,35	6,48	0,00	0,00	13,51	3,75	1,51	1,36
422	0,14	0,46	0,35	0,57	0,03	0,84	0,00	0,00	1,36	0,42	1,47	0,36
455	0,28	0,09	0,94	0,30	0,41	2,49	0,01	0,00	1,24	1,09	5,78	0,26
458	0,37	0,04	2,98	1,12	0,26	0,03	11,36	0,00	0,48	17,46	5,01	3,47
461	0,24	0,32	1,13	1,43	0,60	8,08	0,00	0,00		1,43	2,15	0,50
1194	0,13	0,03	0,05	0,32	0,74	0,09	0,00		36,24	4,93	2,16	0,65
1301	0,03	0,12	0,01	0,03	0,29	0,45	0,00	0,07	0,99	4,42	164,28	0,44
1297	0,16	2,97	0,02	0,27	0,86	0,27	0,00		7,20	10,43	46,37	0,38
1161	0,18	0,59	0,39	2,59	0,41	5,07	0,01	0,04	0,62	59,47	331,07	1,85
1257	0,38	5,05	0,36	2,01	1,05	6,40	0,02	0,05	2,53		31,38	6,78
1281	0,13	0,91	14,17	2,72	0,30	1,49	0,00	0,10	1,22	8,40	9,91	0,29
1159	0,05	0,30	0,00	0,02	0,64	0,23	0,00	0,27	1,88	9,34	1,58	0,94
1294	0,09	0,20	0,27	0,44	1,61	4,10	0,01	1,48	37,49		70,08	0,66
1295	0,02	0,04	0,01	0,13	0,43	0,48	0,00	0,08	72,37	4,29	87,43	0,69
1206	0,12	0,08	0,07	0,65	0,92	7,35	0,02	0,83	74,62	11,98	2,62	0,56
1270	0,10	0,01	0,05	0,11	0,42	0,67	0,00	0,71	11,41	5,02	11,76	0,17
456	0,15	0,14	0,88	0,73	0,75	0,93	0,00	0,00	0,88	3,61	1,54	0,34
84	1,23	0,32	2,11	1,98	0,12	3,33	0,00	0,11	1,92	2,68	2,00	1,45
155	0,33	0,13	1,20	0,49	0,36	0,38	0,00	0,00	0,63	3,89	5,09	0,62

	mir 199	mir 150	mir 143	mir 10a	mir 200c	mir 708	mir 34a	mir33a	mir 511	has2	has3	CD44s
169	0,21	0,10	1,85	0,89	0,41	0,97	0,00	0,00	2,16	2,96	3,67	0,45
171	0,22	0,09	2,06	1,28	0,80	3,92	0,00	0,02	0,80	3,03	2,27	0,09
261	0,25	0,13	0,34	0,96	0,42	2,36	0,11	0,01	0,80	9,90	0,62	0,46
264	0,22	0,37	1,32	0,82	0,50	2,18	0,25	0,25	15,98	8,60	38,55	1,03
277	0,21	0,34	1,32	0,80	0,49	2,16	0,24	0,26	16,32	8,66	39,22	1,03
384	0,21	0,32	1,32	0,79	0,49	2,14	0,23	0,26	16,67	8,71	39,89	1,04
405	0,21	0,29	1,32	0,77	0,48	2,11	0,23	0,27	17,01	8,77	40,56	1,05
453	0,20	0,26	1,32	0,76	0,47	2,09	0,22	0,27	17,36	8,83	41,23	1,05
459	0,20	0,23	1,31	0,74	0,47	2,07	0,22	0,28	17,70	8,88	41,90	1,06
463	0,20	0,21	1,31	0,73	0,46	2,05	0,21	0,28	18,05	8,94	42,57	1,06
469	0,19	0,18	1,31	0,71	0,45	2,02	0,20	0,29	18,39	9,00	43,24	1,07
476	0,19	0,15	1,31	0,70	0,45	2,00	0,20	0,29	18,74	9,05	43,92	1,07
1280	0,18	0,12	1,31	0,68	0,44	1,98	0,19	0,30	19,08	9,11	44,59	1,08
1302	0,18	0,10	1,30	0,67	0,43	1,96	0,19	0,30	19,43	9,16	45,26	1,09
1195	0,18	0,07	1,30	0,65	0,43	1,93	0,18	0,31	19,77	9,22	45,93	1,09
1264	0,17	0,04	1,30	0,64	0,42	1,91	0,17	0,31	20,12	9,28	46,60	1,10
1308	0,17	0,02	1,30	0,63	0,41	1,89	0,17	0,32	20,46	9,33	47,27	1,10
1179	0,17	-0,01	1,30	0,61	0,41	1,87	0,16	0,32	20,81	9,39	47,94	1,11

Anexo B – Dados clínicos de cada paciente estudado

	Escore de Gleason	Estadiamento pT	PSA Ng/mL	Recidiva
89	5	2	4,80	Não
123	4	2	7,60	Sim
270	5	2	3,90	Não
281	5	2	6,20	Não
361	6	2	4,40	
499	6	2	5,70	
1166	6	2	3,30	Não
1287	6	2	5,70	
1284	6	2	4,80	Não
1276	6	2	4,50	Não
1307	6	2	5,10	Não
1282	6	3	7,80	Não
272	7	2	6,57	Sim
284	7	3	4,80	Sim
310	7	2	5,60	Sim
363	7	3	9,50	Sim
385	7	2	10,00	Não
422	7	2		
455	7	2	16,80	Não
458	7	3	17,20	Sim
461	7	2	6,80	Não
1194	7	3	5,60	Não
1301	7	2		Não
1297	7	3	9,80	
1161	7	2	4,97	Não
1257	7	2	1,37	Não
1281	7	2	3,40	Não
1159	7	2	5,90	Não
1294	7	2	6,00	Sim
1295	7	3	6,00	Sim
1206	7	2	3,50	Não
1270	7	2	5,30	Não
456	7	2		
84	8	2	7,40	Sim
155	8	2	10,00	Sim
169	9	3	5,40	Sim
171	8	2	12,20	Não
261	8	3	13,60	Não
264	8	3	2,80	Não
277	8	2	18,10	Não
384	8	2	7,00	Sim
405	8	2		
453	8	3	5,90	Não
459	8	3	6,90	Não
463	8	3	15,50	Não
469	8	3	5,40	Sim
476	9	3	7,57	Não
1280	8	2	0,87	Não
1302	9	2	8,00	Não
1195	9	3	58,40	Não
1264	8	3	7,58	Não
1308	8	2	5,00	Sim
1179	8	2	3,70

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: O PAPEL DOS MIRNA NO CONTROLE DA EXPRESSÃO DAS VARIANTES DO CD44 E DO ÁCIDO HIALURÔNICO NO CÂNCER DE PRÓSTATA

Pesquisador Responsável: Katia Ramos Moreira Leite

Versão: 1

Pesquisador Executante: Caio Martins Moura

CAAE: 18939813.0.0000.0068

Co-autores: José Pontes Junior, Sabrina T Reis, Iran Silva, Nayara Viana, Denis Reis, Miguel Srougi

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CIRURGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11027

Número do Parecer: 352.893

Data da Relatoria: 07/08/2013

Apresentação do Projeto: Projeto prospectivo previsto para ser executado em 24 meses para a obtenção de título de doutorado. Não há previsão de financiamento e o projeto será desenvolvido na clínica de urologia, sem o envolvimento de entidades externas. Serão estudados por PCR em tempo real a expressão dos mirna 708, 34a, 199a-3p, 150, 145, 520, 143, 33a, 200c, 511, 10a e 520 e do RNA mensageiro (RNAm) e proteína dos genes CD44s e suas variantes 2, 5, 8, 9, 10, HAS2 e HAS3 em 50 fragmento de biópsias de pacientes submetidos à prostatectomia radical.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo do estudo é avaliar um novo marcador de prognóstico do câncer de próstata com o intuito de aquilatar a gravidade da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os autores colocam n TCLE o risco como baixo o que está correto. Não há benefício direto para o participante.

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O trabalho utilizará parte de tecido retirado durante cirurgia, portanto não acarretará prejuízo a pessoa. 4 para o senhor, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes, que poderá ser uma nova ferramenta para a descoberta ou para descartar a hipótese do câncer de próstata, ou ainda definir qual o grau de malignidade do seu tumor. Como não há procedimentos adicionais a serem feitos, não existem procedimentos alternativos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Devidamente instruídos.

Recomendações: Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP Interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 07 de Agosto de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Apêndices

Dear Dr. MOURA:

Thank you for submitting your abstract entitled “Expression of miRNAs 200c and 33a That Negatively Control HAS2 and HAS3 in Localized Prostate Cancer”, abstract confirmation #23609, to the United States & Canadian Academy of Pathology’s 105th Annual Meeting, March 12-18, 2016 in Seattle, WA. We are pleased to inform you that your abstract has been accepted for presentation.

Instructions for accessing your official acceptance letter, which includes the format of your presentation – whether it is a poster or platform – the date, time, presentation number, and instructions will be sent by email on approximately December 4, 2015.

Unless otherwise noted, all abstracts presented at the USCAP Annual Meeting are embargoed until the date and time of presentation. Abstracts presented at a news conference are embargoed until the date and time of the news conference. The USCAP reserves the right to lift the embargo on specific abstracts that are selected for promotion prior to or during the USCAP Annual Meeting.

Certificamos que

LEITE, KRM; MOURA, CM; REIS, ST; MORAIS, DR; VIANA, NI; DIP JUNIOR, NG; ISCAIFE, A; SILVA, IA; IVANOVIC, RF;
SROUGI, M; PONTES JUNIOR, J

participaram do 30º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA

na qualidade de **AUTORES** do trabalho

O ENVOLVIMENTO DO MICRO RNA 199A E SEUS GENES ALVO HAS2 E HAS3 NO CÂNCER DE PRÓSTATA

na sessão de Apresentação Oral / Tema Livre

Área: **Uropatologia**

Myriam Dumas Hahn
Myriam Dumas Hahn
Presidente da Comissão Científica

Sueli Aparecida Maeda Pereira
Sueli Aparecida Maeda Pereira
Presidente do Congresso

**Sociedade Brasileira
de Patologia**

www.sbp.org.br

Carlos Alberto Fernandes Ramos
Carlos Alberto Fernandes Ramos
Presidente da Sociedade
Brasileira de Patologia

www.congressodepatologia.org.br

TUBI-D-17-00287 - Submission Confirmation

Tumor Biology <em@editorialmanager.com>

Responder | v

ter 25/07, 13:07

Você

Dear Mr Moura,

Thank you for submitting your manuscript, "Prostate cancer progression related to the loss of miRNA200c and 33a responsible for downregulation of has2 and has3", to Tumor Biology

The submission id is: TUBI-D-17-00287

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://tubi.edmgr.com/>

Your username is: caiobiologia@hotmail.com

Your password is: available at this link http://tubi.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Caio&lastname=Moura&email_address=caiobiologia@hotmail.com

Sincerely,
Editorial Office
Tumor Biology

Tumor Biology

Prostate cancer progression related to the loss of miRNA200c and 33a responsible for downregulation of has2 and has3

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Prostate cancer progression related to the loss of miRNA200c and 33a responsible for downregulation of has2 and has3
Short Title:	miR-200c and 33a and progression of prostate cancer
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Caio Moura Universidade de Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Caio Moura
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Caio Moura
	Jose Pontes Jr
	Sabrina Reis
	Nayara Viana
	Denis Reis
	Nelson Dip
	Iran Amorin
	Miguel Srougi
	Katia Leite
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	

Abstract:	<p>Our objective was to analyze the miRNA expression profile of miR-200c, 33a, 511 and 10a that probably regulate gene has2, has3 and correlate the results with the main prognostic factors for PCa and biochemical recurrence after radical prostatectomy (RP). We retrospectively analyzed the surgical specimens of 53 patients who underwent RP. The expression of genes and their regulatory miRNAs were analyzed by qRT-PCR. The control group was represented by surgical specimens of 6 patients with BPH. We correlated the expression profile with Gleason score, pathological staging, preoperative PSA and biochemical recurrence. We found overexpression of genes has2 and has3 in PCa compared to HPB. We demonstrated that lower expression of miR-200c and 33a was correlated with PSA$\geq$10 ng/mL, p=0.024 and p = 0.002 respectively. The lower expression of miR 200c was also correlated with Gleason score $\geq$7 (p=0.026) and biochemical recurrence (p=0.041). The has2 and has3 were overexpressed while the CD44s was underexpressed in localized PCa. Most of miRNAs that regulate these genes were underexpressed. The expression of miR-200c and 33a, regulators of has2 and has3 genes, were correlated with unfavorable characteristics of PCa and with biochemical recurrence.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Anindya Dutta ad8q@virginia.edu</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	PhD in science
	<p>George Netto gnetto1@jhmi.edu Ph. D in science</p>
	<p>Pravin Kumar Singh singhbiotech@gmail.com PhD in science</p>
	<p>Mariusz Sikora mariusz.sikora@usz.edu.pe Molecular biology</p>
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Original Article

Prostate cancer progression related to the loss of miRNA200c and 33a responsible for downregulation of has2 and has3

Short running title: miR-200c and 33a and progression of prostate cancer

Caio M. Moura, Jose Pontes Jr, Sabrina T. Reis, Nayara I. Viana, Denis R. Morais, Nelson Dip, Iran Amorin, Miguel Srougi, Katia R. M. Leite

Division of Urology and Laboratory of Medical Investigation (LIM55), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Correspondent author

Caio Martins Moura
Av. Dr. Arnaldo 455, Room 2145
01246-903, Sao Paulo, Brazil Tel
55 11 30617183
caibiologia@hotmail.com

Conflict of interest: All authors declare no conflict of interest.

Abstract

Our objective was to analyze the miRNA expression profile of miR-200c, 33a, 511 and 10a that probably regulate gene has2, has3 and correlate the results with the main prognostic factors for PCa and biochemical recurrence after radical prostatectomy (RP). We retrospectively analyzed the surgical specimens of 53 patients who underwent RP. The expression of genes and their regulatory miRNAs were analyzed by qRT-PCR. The control group was represented by surgical specimens of 6 patients with BPH. We correlated the expression profile with Gleason score, pathological staging, preoperative PSA and biochemical recurrence. We found overexpression of genes has2 and has3 in PCa compared to HPB. We demonstrated that lower expression of miR-200c and 33a was correlated with $PSA \geq 10$ ng/mL, $p=0.024$ and $p = 0.002$ respectively. The lower expression of miR 200c was also correlated with Gleason score ≥ 7 ($p=0.026$) and biochemical recurrence ($p=0.041$). The has2 and has3 were overexpressed while the CD44s was underexpressed in localized PCa. Most of miRNAs that regulate these genes were underexpressed. The expression of miR-200c and 33a, regulators of has2 and has3 genes, were correlated with unfavorable characteristics of PCa and with biochemical recurrence.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the first cause of cancer and the second leading cause of cancer death in men in western countries(1). Nowadays the patient management goes from active surveillance to multimodal therapy depending on the prognosis, that is based mainly on histological grading, clinical stage and Prostate Specific Antigen (PSA) serum levels. Although histological grading and the new image methods are powerful in defining the prognosis of the disease, they are not enough sensitive or specific and the need of better markers is urgent (2,3,4,5).

MicroRNAs (miRNA) are small no-coding regulatory RNAs that control the expression of up to 30% of human genes, being involved in the development and progression of many cancers including PCa (6, 7). A large number of studies demonstrate that progression of PCa is facilitated by changes in the composition of extracellular matrix surrounding the cancerous tissue (8). One of the main matrix molecule implicated in the progression of prostate cancer is hyaluronan acid (HA), a large glycosaminoglycan polymer synthesized directly on the plasma membrane by enzymes termed hyaluronan synthases (HASs)(2), has2 and has3, that is not prominent in normal tissue or in benign prostatic hyperplasia (BPH) but is abundant in tissues of various stages of PCa (8). Some miRNAs, according to the base complementarities sites (Mirdb.org and microRNA.org) were reported to regulate the expression of has2 and has3. However, there are no clinical studies confirming the role of miRNAs controlling these genes. Our hypothesis is that miR-200c, 33a, 511 and 10a might have an important role in PCa behavior controlling the genes has2 and has3 and its signaling pathway.

Materials and Methods

The studied population consisted of 53 patients with PCa who underwent radical prostatectomy from December 1998 to August 2006. The mean age was 62.8 years-old (SD 8 years), the mean PSA serum level was 7.96 ng/mL (SD 8.56 ng/mL), 67.9% were staged pT2 and the mean Gleason score was 7.09 (SD 1.11). Six cases of BPH were used as controls. The mean age of the control patients was 64.1 years-old (SD 7.46 years), and the mean PSA was 5.2 ng/mL (SD 4.82 ng/mL). All patients underwent surgery by the same surgeon (MS) and the mean follow up was 61.7 months. All patients provided informed consent to participate of the study and to donate their biological samples for analysis. The study was approved by the Institutional Board of Ethics under the protocol n° 352.893.

RNA Extraction

Fresh surgical specimens were examined immediately after resection by the pathologist, and 1 cm² fragments were stored at -170 °C in liquid nitrogen. A mirror fragment was processed routinely and hematoxylin&eosin stained to guarantee the presence of at least 75% of tumor.

Total RNA and miRNA were isolated with an RNAaqueous Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260/280 nm using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA). cDNA was generated using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For RNA, the reactions were incubated at 25°C for 10 min., followed by 37°C for 120 min and

85° C for 5 min. For miRNAs the reactions were incubated at 16°C for 30 min., followed by 42°C for 30 min and 85° C for 5 min. The cDNA was stored at -20°C until use.

Quantitative Real-Time PCR and Gene Expression

For gene and miRNA amplification, a TaqMan Reagent Kit was used with the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The target sequences were amplified in a 10- μ l reaction with 5 μ l of TaqMan Universal PCR MasterMix, 0.5 μ l from the TaqMan miRNA expression assays, 1 μ l of complementary cDNA, and 3.5 μ l of DNase-free water. The reactions were performed in duplicate, and B2M (β -2-microglobulin) and RNU48 were used as endogenous controls for genes and miRNAs, respectively (table 1).

Statistical Analysis

The $\Delta\Delta CT$ method was used to calculate the relative expression of the target genes using the formula $\Delta\Delta CT = (CT \text{ target gene, PCa sample} - CT \text{ endogenous control, PCa sample}) - (CT \text{ target gene, BPH tissue sample} - CT \text{ endogenous control, BPH})$. The fold change in gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$.

The Kolmogorov test was realized to analyze the homogeneity of variance. To analyze expression with respect to pathological stage, grade, PSA value and recurrence, we used the T Student test for homogeneous variables or the Mann–Whitney test for heterogeneous variables. Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows, and the results were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Gene and miRNA expression

The genes *has2* was overexpressed in 98% with a median of 4.18 (min-max 0.41 - 83.4) and *has3* was overexpressed in 94% with a median of 3.56 (0.62 - 343.2), while *miR-200c* and *33a* were underexpressed in 79.25% with a median of 0.44 (0.02-11.37) and 93.88% with a median of 0.23 (0.00-28.6) of PCa cases compared to the BPH controls. *miR-511* was overexpressed in 66.67%, median 1.92 (0.14-74.61) of PCa cases. *miR-10a* expression was variable but was underexpressed in 52.8% of the cases median 0.96 (0.00-4.38). (Figure 1).

Genes and miRNAs associated with clinicopathological features

Table 2 illustrates the data regarding miRNA and gene expression in relation to clinicopathological features. Patients with lower levels of *miR-200c* were associated with PSA higher than 10 ng/mL serum levels ($p=0.024$) with a median of 0.36 (0.14-.0.80) and with Gleason score higher than 7 ($p=0.026$), median of 0.38 (0.05-11.38). Also, patients with lower levels of *miR-33a* were associated with PSA higher than 10ng/mL ($p=0.002$), median of 0.00 (0.000.20). Lower expression of *miR-200c* was correlated with biochemical recurrence ($p=0.047$), median of 0.37 (0.09-1.60). The expression level of other studied miRNAs did not correlate with clinicopathological features.

Discussion

Several studies show that HA accumulates at tumor cell attachment sites having an important role in tumor progression (9,10), however, few studies focus in the expression profile of miRNAs that possibly control hyaluronic acid synthases as has2 and has3, particularly in cancer.

We have shown that in PCa there is an overexpression of has2 and has3, the main genes that synthesize the HA. The microenvironment rich in HA contributes to tumor neovascularization, increasing the recruitment of stromal cells such as fibroblasts, monocytes/macrophages, endothelial cells, stem cells and mesenchymal cells, favoring neoplastic growth (11). The increased production of HA through the has2 and has3 genes is related to a worse prognosis of PCa, promoting angiogenesis and tumor growth (12)(13). The effect of HA on tumorigenesis is described to be concentration-dependent. Stable lines selected for different levels of HA production were proportionally more tumorigenic when synthesizing moderate amounts of HA (8).

The main receptor of HA is CD44. The CD44/HA interaction activates several pathways and contributes to the control of cell adhesion, invasion and growth through the activation of multiple cell pathways: Ankyrin, which is attached to cytoplasmic tail of CD44, promotes the cytoskeleton activation essential to cell adhesion and migration. The activation of RhoA and Rac1, small GTPase proteins, results in myosin light chain phosphorylation, microtubule organization and cell migration. RhoA also mediates the lowering of extracellular pH, activation of ECM-degrading enzymes and, in consequence, cancer invasion. HA-CD44 activates tyrosine kinases receptor contributing with many aspects of malignant cell behavior (14).

The observation of expression of miRNA in tumors may provide important information that can be used as a tumor biomarker and inspire effective therapeutic target for cancer treatment. Our laboratory analyzed the miR-200c previously and observed its lower expression correlated with a higher Gleason score (15). We confirm this data now and believe that miR-200c loss is important in PCa progression also failing to control HAS.

The family of miR-200 is known to suppress epithelial mesenchymal transition in several neoplasms, including PCa (16, 17, 18).

In epithelial mesenchymal transition process, cells have a greater ability to survive and are more resistant to apoptosis, whereas miR-200 expression favors apoptosis. As the neoplasm progresses, there is a decrease in miR-200 expression and acquisition of a mesenchymal phenotype, which will be responsible for tumor invasion and cell migration (19,20).

MiR-33a is poorly studied in PCa and its function in tumor progression and development of metastases are still poorly understood. In the few cancer-related studies, miR-33a was already reported to be significantly downregulated in PCa tissue (21) confirming our findings. However, another research using quantitative real-time PCR showed that miR-33a was upregulated in PCa tissue and in PCa cell lines (22). Others found that miR-33a is downregulated and suppresses tumorigenesis in human breast cancer cell (23) and pancreatic cancer cell (24). The low expression of miR-33a is associated with an increase in Twist gene expression promoting the invasion and development of lung cancer metastases through epithelial mesenchymal transition (25). Our results suggest that there is a regulatory link between the loss of miR-33a expression and the overexpression of has2 and has3 that could contribute to PCa progression.

In summary, our results show that miR-220c and 33a could influence the expression of has2 and has3 genes, responsible for HA synthesis having a role

in the behavior of PCa. Future functional studies will confirm these preliminary findings

Table 1. Primers used in qRT-PCR for evaluation of genes and miRNAs expression

gene/miRNA	PRIMERS
has2	Hs00193436
has3	Hs00193435
B2M	Hs999999907
hsa- mir-33a	002135
hsa- mir-200c	002300
hsa- mir-511	001111
hsa- mir-10 ^a	000387
rNU43	001095

Table 2. Correlation between expression of genes has2 and has 3 and miRNAs with clinical and pathological features

	Pathological staging pTNM			PSA ng/mL		Gleason score			
	pT2	pT3	P	<10	≥10	p	< 7	≥7	P
has2 Median Min – Max	4.42 0.42-83.40	5.49 2.68-23.31	0.173*	5.02 1.05-83.40	3.99 1.09-23.31	1.000*	4.97 0.42-59.47	4.03 1.05-83.4	0.219*
has3 Median Min – Max	4.33 1.04-331.0	3.56 0.62-343.2	0.568*	3.62 0.77-331.07	5.01 0.62-343.22	0.484*	5.01 0.77-331.0	3.56 0.62-343.2	0.407*
MiRNA 200c Median Min – Max	0.46 0.03-1.61	0.43 0.05-11.38	0.856*	0.62 0.05-11.38	0.36 0.14-0.80	0.024*	0.64 0.03-1.61	0.38 0.05-11.38	0.026*
MiRNA 33a Median Min – Max	0.04 0.00-28.64	0.01 0.00-0.21	0.184*	0.04 0.00-28.64	0.00 0.00-0.20	0.002*	0.03 0.00-1.48	0.02 0.00-28.64	0.213*
MiRNA 511 Median Min – Max	1.63 0.15-74.62	2.16 0.44-72.37	0.338*	2.04 0.15-74.62	0.80 0.22-36.16	0.128*	1.84 0.15-74.62	1.62 0.22-37.59	0.790*
MiRNA 10a Median Min – Max	0.91 0.00-4.39	0.96 0.13-1.87	0.315**	0.93 0.00-4.39	1.12 0.30-2.78	0.744**	0.97 0.00-4.39	0.93 0.02-2.78	0.087**

*Mann-Whitney Test, ** T-Test

Figure 1. Genes and miRNAs expression profiles in 53 patients with PCa compared to BPH controls.

- 1) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians. 2015 Jan-Feb;65(1):5-29.
- 2) Feneley MR, Partin AW. Indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. The Urologic clinics of North America. 2001 Aug;28(3):443-58
- 3) Moreira Leite KR, Camara-Lopes LH, Dall'Oglio MF, Cury J, Antunes AA, Sanudo A, et al. Upgrading the Gleason score in extended prostate biopsy: implications for treatment choice. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2009 Feb 1;73(2):353-6.
- 4) Miguel Srougi LAR, Afonso Celso Piovesan, José Roberto Colombo, Adriano Nesrallah. Doenças da Próstata. In: Paulo) RMS, editor. 2008.
- 5) Toner L, Weerakoon M, Bolton DM, Ryan A, Katelaris N, Lawrentschuk N. Magnetic resonance imaging for prostate cancer: Comparative studies including radical prostatectomy specimens and template transperineal biopsy. Prostate international. 2015 Dec;3(4):107-14
- 6) Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. Cell. 2003 Jun 13;113(6):673-6
- 7) Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Camara-Lopes LH, et al. MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer--from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. Urologic oncology. 2013 Aug;31(6):796-801.
- 8) Simpson MA. Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. The American journal of pathology. 2006 Jul;169(1):247-57

- 9) Louderbough JM, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular cancer research : MCR*. 2011 Dec;9(12):1573-86
- 10) Karbownik MS, Nowak JZ. Hyaluronan: towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(5):1056-74.
- 11) Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia*. 2007 Oct;21(10):2085-9
- 12) Rizzardi AE, Vogel RI, Koopmeiners JS, Forster CL, Marston LO, Rosener NK, et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors. *Cancer*. 2014 Jun 15;120(12):1800-9.
- 13) Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer research*. 2001 Jul 1;61(13):5207-14
- 14) Karbownik MS, Nowak JZ. Hyaluronan: towards novel anti-cancer therapeutics. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(5):1056-74
- 15) Katz B, Reis ST, Viana NI, Morais DR, Moura CM, Dip N, et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PloS one*. 2014;9(11):e113700
- 16) Ma C, Ding YC, Yu W, Wang Q, Meng B, Huang T. MicroRNA-200c overexpression plays an inhibitory role in human pancreatic cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Minerva medica*. 2015 Aug;106(4):193-202
- 17) Liu S, Tetzlaff MT, Wang T, Yang R, Xie L, Zhang G, et al. miR-200c/Bmi1 axis and epithelial-mesenchymal transition contribute to acquired resistance to BRAF inhibitor treatment. *Pigment cell & melanoma research*. 2015 Jul;28(4):431-41

- 18) Banyard J, Chung I, Wilson AM, Vetter G, Le Behec A, Bielenberg DR, et al. Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Scientific reports*. 2013;3:3151
- 19) Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1131-43
- 20) Mejlvang J1, Kriaevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2007 Nov;18(11):4615-24
- 21) Ambros S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6162–70
- 22) Q. Li, S. Lu, X. Li, G. Hou, L. Yan, W. Zhang, B. Qiao. Biological function and mechanism of miR-33a in prostate cancer survival and metastasis: via downregulating Engrailed-2. *Clin Transl Oncol*. 2017 May;19(5):562-570
- 23) Zhang C, Zhang Y, Ding W, Lin Y, Huang Z, Luo Q. MiR-33a suppresses breast cancer cell proliferation and metastasis by targeting ADAM9 and ROS1. *Protein Cell*. 2015;6(12):881–9
- 24) Liang C, Wang Z, Li YY, Yu BH, Zhang F, Li HY. miR-33a suppresses the nuclear translocation of beta-catenin to enhance gemcitabine sensitivity in human pancreatic cancer cells. *Tumour Biol: J Int Soc Oncodev Biol Med*. 2015;36(12):9395–403
- 25) Yang L, Yang J, Li J, Shen X, Le Y, Zhou C, et al. MicroRNA-33a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis and could be a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Scientific reports*. 2015;5:13677