RUBENS PARK

**O papel dos microRNAs -23b/-27b na progressão do câncer de próstata
resistente à castração: estudo *in vivo***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis
Faria

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Park, Rubens

O papel dos microRNAs -23b/-27b na progressão do
câncer de próstata resistente à castração : estudo in
vivo / Rubens Park. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Urologia.

Orientador: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.MicroRNA 2.Neoplasias de próstata
resistentes à castração 3.Ciclina G1 4.Modelos
animais 5.Imagem molecular 6.Ensaio antitumoral
modelo de xenoinxerto 7.Expressão gênica

USP/FM/DBD-207/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais Young Sik Park (in memoriam) e especialmente, para minha mãe In Suk Kim, pelo amor incondicional e por tudo que abdicou para dar aos seus filhos uma condição de vida privilegiada.

À minha esposa Thais pela paciência, cumplicidade e dedicação para construir nossa vida e nossa futura família.

Aos meus irmãos Leonardo e Silvia pelo apoio e fraternidade.

À minha família que sempre esteve presente para aliviar o fardo da minha mãe e com os quais divido as minhas conquistas.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sabrina Thalita dos Reis Faria, por acreditar e confiar no trabalho que propusemos, pela amizade que criamos e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos Professores Miguel Srougi e William Carlos Nahas, professores titulares de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por sempre apoiarem os residentes e pelo exemplo profissional e pessoal que serviram de modelo para nossa formação.

Ao Prof. Marcos Francisco Dall'Oglio, pelo companheirismo, amizade e apoio.

A toda a equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-55) de Urologia em especial a Prof^a. Dr^a. Kátia Ramos Moreira Leite, Nayara Izabel Viana, Iran Amorim Silva, Vanessa Ribeiro Guimarães, Ruan César Aparecido Pimenta e Denis Reis.

À Mara Souza Junqueira, bióloga que nos apoiou com todos experimentos animais pelo aprendizado e exemplo de respeito aos animais que nos ajudaram neste trabalho.

Aos meus amigos com quem tive a sorte de completar o programa de residência, Bruno Nicolino Cezarino, Eduardo de Paula Miranda, Guilherme Philomeno Padovani, Paulo Renato Marcelo Moscardi e Rodrigo Freddi pela união e ajuda sem as quais não conseguiria chegar onde cheguei.

Aos meus amigos de infância André Grunspum Pitta, Eduardo Brodsky, Gady Saiovici, João Naves Fellet, Pedro Mesquita Schaffa e Ricardo Leite Ribeiro.

Aos assistentes do Grupo de Oncologia da Divisão de Urologia do ICESP da FMUSP e especialmente aos amigos José Pontes Júnior, Luis Carlos Neves, Arnaldo Fazoli e Giuliano Betoni.

A Sr^a. Elisa Cruz, pelo seu sem competente trabalho dentro de serviço de Pós-Graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio de pesquisa para este estudo, sem o qual não seria possível (2015/03582-6).

Esta dissertação ou 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. Divisão 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: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Resumo.....	xiii
Summary	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de Próstata	2
1.2 O receptor androgênico e a resistência à castração	5
1.3 MicroRNA.....	7
1.4 Biogênese do miR	8
1.5 O miR e a resistência à castração	9
1.6 miR-23b e miR-27b.....	9
1.7 Justificativa.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. MÉTODOS	14
3.1 Linhagem celular	15
3.2 Reagentes para modulação do miR	15
3.3 Modelo <i>in vivo</i>	16
3.4 Extração do RNA e miRNA total.....	20
3.5 Transcrição reversa (RT).....	21
3.6 Análise de expressão dos genes e miRNAs por PCR em tempo real quantitativo..	22
3.7 Análise Estatística	23
3.8 Ética.....	24
3.9 Financiamento	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Transfecção	26
4.2 Expressão da CCNG1.....	26
4.3 Crescimento tumoral	27
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	35

7. REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE	44

Lista de abreviaturas

µg- micro grama

µl- micro litro

BLI - Bioluminescência

C - Celsius

CaP- Câncer De Próstata

CCNG1 – Ciclina G1

cDNA- DNA complementar

CPRC - Câncer de próstata resistente à castração

CPSC - Câncer de próstata sensível à castração

DHT - 5-alfa-dihidrotestosterona

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

g - aceleração da gravidade

ISUP - *International Society of Urological Patology*

mCaP - Câncer de próstata metastático

miR - microRNA

mL- mililitro

ng- nanograma

nM- nanomolar

p/s - fótons por segundo

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

PR - Prostatectomia Radical

pri-miRNA- microRNA primário

PSA- Antígeno Prostático Específico

qRT-PCR - Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

RA - receptor androgênico

RISC - complexo silenciador induzido por RNA

RNA- Ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

rpm- rotação por minuto

RT- Transcriptase Reversa

SFB - soro fetal bovino

TGF- β – Fator transformador de crescimento *beta*

TNF- α - Fator de necrose tumoral *alfa*

Lista de figuras

Figura 1. Biogênese do microRNA.....	9
Figura 2. Local de injeção dos xenoenxertos subcutâneos em região dorsal.....	16
Figura 3. Diagrama com programação do experimento.....	18
Figura 4. Exemplo da leitura de BLI através do IVIS®	19
Figura 5. Expressão relativa dos miRs em cada grupo de tratamento com seu desvio padrão.....	26
Figura 6. Expressão relativa entre os grupos de tratamento e grupo controle.. ..	27
Figura 7. Representação do crescimento final dos tumores em cada grupo.. ..	28

Lista de tabelas

Tabela 1. Correspondência entre a classificação de ISUP e o escore de Gleason.	4
Tabela 2. Tabela de reagentes utilizados para transfecção do pré-miR.	16
Tabela 3. Grupos de tratamento e número de tumores tratados.	17
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão dos miRNAs e genes pelo método de qRT-PCR.	22
Tabela 5. Média e desvio padrão da expressão da CCNG1 nos grupos Pró miR.	27

Resumo

Park R. *O papel dos microRNAs -23b/-27b na progressão do câncer de próstata resistente à castração: estudo in vivo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O Câncer de próstata metastático (mCaP) é uma doença incurável com progressão para o mCaP resistente à castração (mCPRC) após terapia de deprivação androgênica. Os microRNAs (miR) -23b e -27b tem ação antioncogênica e são suprimidos neste contexto. O gene da ciclina G1 (CCNG1) codifica uma quinase dependente de ciclina com potencial de inibição do crescimento e é um dos alvos dos miR-23b/-27b. **Objetivos:** Estimular os miR-23b/-27b isoladamente e em conjunto para avaliar e comparar o crescimento tumoral e a expressão do gene alvo CCNG1 em relação ao grupo controle em xen enxertos de PC-3M-luc-C6 em camundongos atímicos castrados. **Métodos:** Xen enxertos subcutâneos da linhagem celular PC-3M-luc-C6 foram implantados em camundongos machos *BALB/c nude*. Os animais foram castrados 10 dias após o implante e utilizamos injeções intratumorais para induzir o aumento da expressão dos miR-23b/-27b separadamente e em conjunto através de Pre-miR[®] específicos. Realizamos avaliações semanais da bioluminescência (BLI) para avaliar o crescimento tumoral após a castração. Utilizamos a reação em cadeia de polimerase reversa em tempo real (qRT-PCR) para analisar a expressão da CCNG1 e os animais foram sacrificados 21 dias após a castração. Dividimos um total de 21 xen enxertos nos seguintes grupos de tratamento: 4 no grupo controle, 5 no grupo Pró miR-23b, 6 no grupo Pró miR-27 e 6 no grupo Pró miR-23b associado ao Pró miR-27b. **Resultados:** Confirmamos o sucesso da transfecção dos miRs por qRT-PCR, e apresentamos o achado de superexpressão relativa da CCNG1 em relação ao grupo controle em: 9% (p=0,76), 46% (p=0,05) e 203% (p=0,01) nos grupos Pró miR-23b, Pró miR-27b e Pró miR-23b associado ao Pró miR-27b respectivamente. Comparamos o crescimento proporcional de cada tumor através da BLI, por meio da leitura no momento da castração ao final do experimento. Obtivemos um crescimento de 13,5; 8,69; 5,96 e 9,98 vezes nos grupos: controle, Pró miR-23b, Pró miR-27b e Pró miR-23b associado ao Pró miR-27b respectivamente. **Conclusão:** Demonstramos um modelo *in vivo* de CPRC que apresentou supreexpressão da CCNG1 após o tratamento intratumoral que aumentou a expressão dos miRs -23b e -27b. Este conjunto de miRs tem ação antioncogênica descrita no contexto do mCPRC e a sua estimulação neste contexto aumentou a expressão da CCNG1. Nosso estudo sugere que a CCNG1 deve apresentar uma ação pró-apoptótica quando superexpresso pelos miRs-23b/-27 no CPRC.

Descritores: MicroRNA; Neoplasias de próstata resistentes à castração; Ciclina G1; Modelos animais; Imagem molecular; Ensaios antitumorais modelo de xen enxerto; Expressão gênica.

Summary

Park R. *The role of microRNAs -23b/-27b in the progression of castration-resistant prostate cancer: an in vivo study* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: Metastatic prostate cancer (mPCa) is an incurable disease that invariably progresses to castration-resistant mPCa (mCRPC) after androgen deprivation therapy. The microRNAs miR-23b/-27b have been reported as tumor suppressors and are underexpressed in this context. The cyclin G1 gene (CCNG1) encodes a cyclin-dependent kinase with potential growth inhibitory activity that is a potential target of miR-23b/-27b. **Objectives:** We aim to explore a bioluminescent xenograft model of CRPC in castrated mice the effect positive modulation of the miR-23b/-27b on CCNG1 expression and mCRPC growth. **Material and Methods:** We injected subcutaneous xenografts of PC-3M-luc-C6 PCa cell line in BALB/c nude male mice. We neutered the animals after 10 days and used intratumoral injections up-regulating miR-23b/-27b separately and simultaneously through specific Pre-miRTM. We used weekly bioluminescence imaging (BLI) to assess tumor growth after castration and real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to analyze the expression of CCNG1. We sacrificed the animals 21 days after castration. We randomized 21 xenografts in experimental groups as follows: n=4 in the negative control group; n=5 in Pro miR-23b group; n=6 in Pro miR-27b group and an n=6 tumors in the Pro miR-23b plus Pro miR-27b. **Results:** We confirmed successful transfection of both miRNAs with overexpression of CCNG1 of 9% (p=0.76), 46% (p=0.05) and 203% (p=0.01) in the Pro miR-23b, Pro miR-27b and Pro miR-23b plus -27b groups respectively. We compared the fold-change in BLI growth by the end of experiment finding an increase of 13.5-fold, 8.69-fold, 5.96-fold and 9.98-fold in groups Pro miR-negative control, Pro miR-23b, Pro miR-27b and Pro miR-23b plus Pro miR-27b groups respectively. **Conclusions:** We showed an *in vivo* model with overexpression of CCNG1 upon artificial upregulation of miR-23b and -27b in CRPC. This cluster of antineoplastic miRNA increased the expression of this cyclin, often described as oncogenic. Our study suggests that CCNG1 has a pro-apoptotic role when up-regulated by miR-23b/-27b in CRPC.

Descriptors: MicroRNA; Prostatic neoplasms, castration-resistant; Cyclin G1; Models, animal; Imagem molecular; Xenograft model antitumor assays; Gene Expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

Foram estimados 164.690 novos casos de câncer de próstata (CaP) nos Estados Unidos da América no ano de 2018, o que representa 19% do total de neoplasias malignas esperadas para o ano¹. No Brasil, dados mais recentes do Instituto Nacional de Câncer estimam para 2018, 68.220 novos casos ou 66,12 casos novos a cada 100 mil homens. Desta forma, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, o CaP é o tumor maligno mais prevalente no sexo masculino e a segunda causa de óbito por câncer no Brasil².

A análise dos padrões de incidência e mortalidade do CaP no mundo através de dados coletados em 2012 revela que, de modo geral, os países com maior Produto Interno Bruto e melhores Índices de Desenvolvimento Humano têm maior incidência do CaP, porém, com taxas de mortalidade estáveis ou em declínio³. As demais diferenças na incidência do CaP ao redor do globo são explicadas pela somatória da distribuição etária da população, diferenças genéticas, ambientais e de estilo de vida com maior incidência do CaP nos países ocidentais em relação aos asiáticos³. Até o presente momento, não existem recomendações dietéticas ou medicamentosas seguras para profilaxia primária do CaP⁴.

A faixa etária mais acometida é a dos homens acima dos 65 anos, sendo este o fator de risco mais bem estabelecido para o CaP, com apenas 1% dos novos casos em pacientes abaixo dos 50 anos⁵. Classicamente, o antecedente familiar de primeiro grau positivo com menos de 60 anos é um fator de risco que aumenta de 3 a 10 vezes o risco de desenvolver o CaP^{6,7}. Entretanto após a era do rastreamento ostensivo do CaP pelo antígeno prostático específico (PSA), este fator de risco teve seu peso diminuído nas formas mais graves do CaP com diagnósticos cada vez mais precoces⁸. Ainda não foi

demonstrado haver diferença na taxa de sobrevida livre de recorrência entre as formas esporádica e familiar após prostatectomia radical (PR)^{9,10}. Estudos genéticos ainda investigam o papel de determinados genes envolvidos nas formas familiares como os genes HOXB13 e o BRCA1/2, que estão associados a maior risco de CaP^{11,12}.

Em 1986, o PSA foi aprovado para a monitorização da progressão do CaP e em 1994, para o rastreamento¹³. O PSA mudou o panorama do CaP com diagnóstico precoce e foi um dos fatores responsáveis pela queda de 40% na mortalidade desta doença nos últimos 25 anos nos EUA¹⁴. Esse impacto se deve principalmente à forma avançada do CaP, mas também à evolução do tratamento curativo também foi responsável por 22-33% desta queda¹⁵.

O CaP tem seu risco estratificado clinicamente através da medida do PSA, toque retal, biópsia transretal da próstata e da cintilografia óssea em casos de risco intermediário e alto¹⁶. A ressonância magnética multiparamétrica de próstata tem ganhado papel cada vez mais relevante na avaliação de neoplasia clinicamente significativa. Este exame é capaz de avaliar a extensão local da doença e caracterizar áreas suspeitas, sendo muito útil em protocolos de vigilância ativa¹⁷. Pode ser indicada em nova biópsia quando houver suspeita persistente, apesar de biópsia prévia negativa¹⁸, e foi recentemente recomendada para direcionar biópsia diagnóstica inicial pela associação europeia de urologia¹⁹⁻²³.

A classificação de Gleason foi estabelecida para determinar o grau de diferenciação histológica tumoral com 5 padrões distintos, sendo que o bem diferenciado tem o valor de 1 e o mais indiferenciado, o valor de 5. A somatória do padrão mais comum e do padrão mais agressivo encontrados na biópsia determina a pontuação final. A classificação foi modificada com o passar dos anos e atualmente se considera, para efeito diagnóstico, o escore de Gleason a partir de 6 para confirmação

do CaP²⁴.

A *International Society of Urological Patology* (ISUP), a partir dos recentes estudos que questionam o sobretratamento do CaP nos casos de tumores mais indolentes^{25,26}, criou uma nova classificação denominada ISUP que tem valores que variam de 1 a 5 e é mais representativa em relação ao prognóstico do paciente²⁷. A tabela 1 demonstra a nova classificação do Gleason segundo a ISUP²⁸:

Tabela 1 - Correspondência entre a classificação de ISUP e o escore de Gleason.

ISUP	Escore de Gleason
1	3+3
2	3+4
3	4+3
4	4+4
5	4+5, 5+4 ou 5+5

O tratamento curativo no CaP confinado ao órgão pode ser feito pela PR ou pela radioterapia e, em casos selecionados de baixo risco, pode ser manejado pela vigilância ativa²⁹. O tratamento local é extremamente eficaz, porém até 35% dos pacientes tratados com PR terão recorrência bioquímica^{27,30,31}, definida pela elevação do PSA acima de 0,2 ng/mL. Após a recidiva bioquímica, 24% desses pacientes devem apresentar progressão sistêmica com metástase³⁰ durante o seguimento clínico.

A despeito dos avanços no tratamento da doença localizada e das discussões atuais a respeito do rastreamento e o sobrediagnóstico^{25,26}, em série populacional de 1988 a 2009, os pacientes com doença metastática não tiveram ganho significativo de sobrevida apesar da redução de 65% de sua incidência no período³². Todavia, recentes

estudos clínicos controlados com novas drogas têm demonstrado aumento de sobrevida do CaP metastático (mCaP)³³⁻³⁶.

O mCaP é uma doença incurável, com sobrevida em 5 anos de apenas 29,8% com o tratamento de primeira linha baseado na castração, seja ela cirúrgica ou farmacológica. A patologia que inicialmente é responsiva à castração, invariavelmente progride para a fase do CaP resistente à castração (CPRC) em período médio de 18 a 24 meses, com sobrevida média de 1,5 anos³⁷. Apesar do ganho de sobrevida através das múltiplas alternativas terapêuticas apresentadas nos últimos anos como a Abiraterona, o Radium Ra 223 e a Enzalutamida entre outros, o prognóstico do CPRC não apresentou mudanças drásticas.

Neste contexto, novos tratamentos que visam circundar os mecanismos de resistência à castração são foco importante da pesquisa em CPRC³⁸ e alterações genéticas relacionadas ao receptor androgênico (RA) protagonizam a maior parte desses mecanismos. Com a descoberta do microRNA (miR) nos anos 90³⁹, esta molécula vem sendo foco de estudos e sendo apontada como um alvo para uma terapia genética em potencial.

1.2 O receptor androgênico e a resistência à castração

O RA é um receptor nuclear codificado no cromossomo X, da mesma família dos receptores de estrogênio, mineralocorticóides e de progesterona. É um fator de transcrição dependente de seus ligantes 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) e testosterona³⁸.

A testosterona, produzida pelas células de Leydig no testículo, circula na corrente sanguínea ligada à globulina ligadora de hormônios sexuais e em sua forma

livre. A forma livre da testosterona entra na célula prostática e é convertida pela enzima 5-alfa-redutase em DHT, metabólito mais potente que a testosterona e que mantém o trofismo e crescimento da célula prostática. A combinação do RA com a DHT libera proteínas inibitórias associadas ao receptor, o qual é dimerizado e internalizado para o núcleo. No espaço intranuclear, o RA se liga aos elementos de resposta hormonal, atuando em regiões promotoras de genes alvo como o PSA, e finaliza a cascata de processos que culminam nas respostas celulares necessárias para o crescimento e sobrevivência da célula prostática³⁸.

Huggins e Hodges em 1941 demonstraram a eficácia da terapia de deprivação androgênica no CaP⁴⁰. No entanto, após resposta inicial à castração em mais 80% dos pacientes com mCaP, todos eles invariavelmente desenvolvem resistência à castração⁴¹ e os mecanismos para este fato são variados e ainda tema importante de pesquisas.

Dentre os principais mecanismos de resistência à castração já descritos até o momento, temos: o aumento da sensibilidade do RA aos andrógenos através do aumento da conversão de testosterona para o DHT, o aumento da produção endógena de andrógenos e o aumento da expressão do RA na célula tumoral. Também existem mutações em que o RA se torna promíscuo, sendo ativado por esteróides não androgênicos, por antagonistas como a flutamida ou até por ligantes não esteroidais como tirosina quinase e HER-2. Finalmente, a resistência pode ser também secundária a vias paralelas de proliferação totalmente independentes do RA^{41,42}.

Dentre as mutações do RA, a de maior relevância clínica é a variante 7, pois está relacionada ao mecanismo de resistência a drogas como enzalutamida e abiraterona. Esta variante não possui a região ligante-receptor, mas é ativa constitutivamente, mantendo a cascata de sinalização que leva à proliferação celular. Sua importância é ainda maior porque é passível de ser detectada em exames séricos, sendo um potencial

biomarcador para estratificação prognóstica no CPRC e para a predição de resposta à abiraterona ou à enzalutamida^{43,44}.

1.3 MicroRNA

O microRNA (miR) é uma molécula de RNA que não é codificada, composta por 19 a 25 nucleotídeos e responsável pela modulação pós transcricional de até 30% da expressão gênica⁴⁵. Sua ação reguladora da expressão gênica influencia os processos de proliferação celular, diferenciação e apoptose. Portanto, está intimamente relacionada com os processos que levam ao desenvolvimento do câncer⁴⁶.

Estudos recentes demonstraram que diferentes estádios das neoplasias possuem padrões diferentes de expressão de miR. Sendo assim, os miRs têm um grande potencial de se tornarem biomarcadores e alvos de novos tratamentos⁴⁷. Estima-se que representem 3 a 4% de todo genoma humano e cada miR possa ter cerca de 100 possíveis genes alvo⁴⁸.

A ação dos miRs permite um ajuste celular rápido e eficiente em sua expressão gênica. E apesar das evidências iniciais mostrarem que os miRs exercem somente um efeito de regulação negativa dos RNAs mensageiros (RNAm)⁴⁹, diversas investigações comprovam que os miRs também podem ter uma regulação positiva no seu RNAm alvo. A modulação positiva de um gene alvo através do miR pode ser feita de maneira direta ou indireta, como por exemplo, ao reprimir um miR que inibe a expressão do gene alvo^{50,51}.

Cada miR pode possuir múltiplos genes alvo em potencial, e dependendo do tipo de tecido, das condições celulares específicas e cofatores, um mesmo miR pode exercer um efeito de aumento ou mesmo de supressão da expressão de um gene. Deste modo, é

essencial contextualizar a ação de cada miR. Dentro desta realidade, os miRs têm protagonizado descobertas importantes nos estudos envolvendo o câncer⁵²⁻⁵⁵.

1.4 Biogênese do miR

Os miRs são sintetizados pela RNA polimerase II ou III, gerando um RNA precursor longo e primário chamado pri-miRNA com capacidade de codificar 1 ou mais miRNAs maduros. Esta estrutura é processada pelo complexo microprocessador nuclear Drosha em uma estrutura menor do tipo *hairpin*, denominada pré-miRNA, que é então transportada para o citoplasma pela proteína de transporte exportina-5⁵⁶.

No citoplasma, este pré-miRNA perde sua estrutura *hairpin* através da enzima *Dicer*, tornando-se uma fita duplex contendo o miR e a sua fita complementar. Esta fita dupla é então clivada novamente pela enzima *Dicer* e a fita complementar é geralmente degradada, permanecendo o miR maduro de fita única. Este é então incorporado a um complexo efetor denominado RISC (complexo silenciador induzido por RNA)^{51,57}, e levado para o seu RNAm alvo, quando ocorre a repressão da tradução da proteína ou o aumento de sua expressão (Figura 1)^{50,58}.

Figura 1 - Biogênese do microRNA⁵⁹.

1.5 O miR e a resistência à castração

O mecanismo biomolecular da transição do CaP sensível à castração (CPSC) para a resistência à castração é um tema atual e linha de investigação de diversos pesquisadores. Existem muitas evidências acerca do papel dos miRs nesta transição que podem trazer alternativas diagnósticas⁶⁰ e terapêuticas nesta doença^{54,61,62}.

Diversos miRs estão sendo estudados no CPRC e os miR-27b e miR-23b apresentam subexpressão em linhagens de CPRC⁶²⁻⁶⁶.

1.6 miR-23b e miR-27b

Os miR-23b e miR-27b estão localizados em um mesmo *cluster* no cromossomo 9 e em estudos que avaliaram o perfil de expressão de miR em CPRC, se apresentaram

subexpressos nos tumores primários e principalmente nas lesões metastáticas⁶³. Estudos *in vivo* e *in vitro* com PC-3 demonstraram redução da invasão local e metástases à distância com o aumento da expressão dos miR-23b/-27b^{65,66}.

Novas evidências têm relacionado o aumento da expressão dos miR-23b/-27b com a supressão da ciclina G1 (CCNG1)^{47,67}. Descoberta em 1995⁶⁸, ela é única em sua classe, uma vez que pode ser um regulador positivo ou negativo do crescimento celular de neoplasias malignas⁴⁷. Sua superexpressão foi implicada na tumorigênese em estudos *in vitro* em tumores malignos de próstata, mama e ovário⁶⁹ por mecanismo de feedback negativo com a expressão de p53⁷⁰. Ela também foi descrita com ação supressora tumoral em diferentes contextos celulares através de outros mecanismos⁷¹, como por exemplo, ao interromper a fase G2/M do ciclo celular em resposta à lesão de DNA e por facilitar apoptose induzida por fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α).

Em estudos *in vitro*, em um trabalho realizado por nosso grupo, demonstramos taxa de apoptose elevada em cultura de células de CPRC após o aumento da expressão dos miR-23b/-27b quando associado à administração de flutamida⁷².

1.7 Justificativa

O CPRC é a fase letal desta doença para a qual ainda não temos um tratamento curativo. Os miRs são objeto de muitos estudos e diversas evidências apontam um papel de protagonismo dos miRs nos mecanismos oncogênicos e reguladores das diversas fases do CaP.

Neste contexto, foi demonstrado que os miR-23b/-27b podem ser importantes marcadores de resistência precoce à castração. Além disso, não há trabalhos na literatura relacionando os miR-23b/-27b com o gene alvo CCNG1 no contexto do CPRC. Deste

modo, são necessários estudos *in vivo* para avaliar se a resistência à castração seria reversível com a modulação destes miRs.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da modulação positiva dos miR-23b/-27b em xenoenxertos de linhagem PC-3M-luc-C6 em camundongos atímicos castrados com o intuito de comparar crescimento tumoral e expressão do gene alvo CCNG1 em relação ao grupo controle.

3.MÉTODOS

3.1 Linhagem celular

Foi utilizada a PC3-M-luc-C6, linhagem celular proveniente da Caliper Life Sciences (Hopkington, EUA) derivada de metástase óssea de CPRC modificada com o gene que expressa luciferase.

As células foram acondicionadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio de cultura MEM (Life Technologies, Carlsbad, EUA), com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St. Louis, EUA) a 1%. Os frascos foram mantidos em estufa para cultura contendo atmosfera úmida composta por 95% de ar e 5% de CO₂ na temperatura de 37° C.

As células PC-3M-luc-C6 são derivadas da linhagem celular de CPRC PC-3M e apresentam a expressão constitutiva de um plasmídeo com o gene da enzima luciferase, que converte a luciferina em oxiluciferina, liberando energia luminosa. A reação depende de adenosina trifosfato, portanto, apenas células viáveis emitirão o sinal luminoso. Esta bioluminescência (BLI) é captada pelo Xenogen - IVIS[®] Spectrum, aparelho que mede o total de fótons por segundo (p/s) que o tumor emite, correlacionando sua intensidade ao volume tumoral biologicamente ativo.

3.2 Reagentes para modulação do miR

Os reagentes usados neste experimento estão apresentados na Tabela 2. Pré-miR[®] (Ambion, Austin, EUA) ou mimics são pequenos miRs sintéticos, similares aos miRs biológicos maduros, sendo utilizados para aumentar a expressão do miR alvo.

Tabela 2 - Tabela de reagentes utilizados para transfecção do pré-miR.

Reagentes	Identificação do Ensaio
Mimic-miR-23b	MC10711 (Ambion)
Mimic-miR-27b	MC10750 (Ambion)
Pré-miR miRNA Precursor Negative Control	AM-17110 (Ambion)

Neste estudo, foram utilizados mimics para aumentar a expressão dos miR-23b/-27b e para o grupo controle, o mimic Pró miR-negativo. Os tratamentos foram realizados em 4 grupos: Pró miR-23b, Pró miR-27b, Pró miR-23b associado ao Pró miR 27b além grupo controle Pró miR-negativo.

A solução de tratamento foi preparada com 2 µg de miR em 3 µl de solução, que foi misturada a 22 µl de SFB e 25 µl de atelocolágeno adicionados ao final e centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto a 4° C. Esta solução final foi então homogeneizada por rotação de 4 rpm por 20 minutos a 4° C. Para o grupo com tratamento conjugado, foi mantido volume final de 50µl de cada injeção, tendo sido reduzido o volume de PBS para 19 µl, contendo ao final, 2 µg de cada miR.

O tratamento foi realizado com um total de 3 doses injetadas com um intervalo de 3 a 5 dias entre cada uma delas.

3.3 Modelo *in vivo*

Utilizamos camundongos atímicos machos *BALB/c NUDE* com 7 a 8 semanas de vida para o implante subcutâneo de xenoinxertos de PC-3M-luc-C6.

Injetamos 2 amostras de $1,5 \times 10^6$ células da linhagem PC-3M-luc-C6 suspendidas em 80 μ l de meio de cultura sem antibiótico no subcutâneo da região lombar e da região torácica do dorso dos camundongos como na figura 2. Optamos por utilizar 2 enxertos por animal para utilizar menos animais e economizar recursos.

Figura 2 - Local de injeção dos xenoenxertos subcutâneos em região dorsal.

Foram utilizados 14 animais durante o trabalho, totalizando 28 xenoenxertos. Cada grupo de tratamento apresentou um número de tumores final utilizado para análise como descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Grupos de tratamento e número de tumores tratados.

Grupo de tratamento	Número de tumores
Pró miR-23b	5
Pró miR-27b	6
Pró miR-23b + Pró miR-27b	6
Pró miR negativo	4

O tratamento foi iniciado 10 dias após a inoculação subcutânea das células, quando tumor era palpável. Foi realizada a orquiectomia total bilateral via escrotal sob anestesia com isoflurano inalatório a 3%. No dia seguinte à castração, foi realizada a primeira leitura da BLI no IVIS® além da primeira injeção de uma série de 3 injeções intratumorais com intervalo de 3 a 5 dias contendo 2 µg de miR de cada tipo de tratamento. O diagrama do experimento está representado na figura 3.

Figura 3 - Diagrama com programação do experimento

Para as aplicações, utilizamos seringas de insulina com agulha de 0,3 mm de diâmetro diretamente no tumor, no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP com os camundongos anestesiados com isoflurano inalatório a 3%.

Semanalmente foi realizada a injeção de D-luciferina intraperitoneal na dose de 5 mg/Kg para análise da BLI através do IVIS® (figura 4). O crescimento tumoral foi

avaliado utilizando o valor de BLI ao final do experimento comparado à primeira leitura de BLI e a análise estatística, realizada comparando cada grupo de tratamento com o controle.

Figura 4 - Exemplo da leitura de BLI através do IVIS®

Em estudos com xenoinxertos de CPSC em animais castrados, os tumores adquiriram resistência à castração após cerca de 2 a 4 semanas da cirurgia⁷³. Deste modo, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ 21 dias após sua castração e seus tumores foram removidos. Parte do tumor foi congelada em solução de RNA later com nitrogênio líquido e a outra parte foi fixada em formol a 10% para análise em parafina. As carcaças dos animais foram descartadas conforme o capítulo de Resíduos Infectantes do manual do LIM-HC-FMUSP.

3.4 Extração do RNA e miRNA total

Os miR e RNA dos xenoinxertos foram extraídos com o kit de isolamento *miRVana miRNA*[®] (Ambion, Austin, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA, incluindo os miRs.

As preparações das amostras de tecido fresco foram realizadas em gelo para prevenir a degradação por proteases, e foram maceradas no equipamento *TissueLyser LT* (Qiagen, Germantown, EUA) com 500 µl do tampão de lise e 10% do volume total de aditivo para homogeneização. Após a maceração, os tubos foram colocados no gelo por 4 minutos e foram adicionados 500 µl de fenol-clorofórmio. Então, as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas na velocidade de 10.000 g por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado um terço do volume de etanol 100% em temperatura ambiente. A solução foi então transferida para o filtro (coluna GFX) e novamente centrifugada a 10.000 g por 1 minuto.

Neste momento, o filtro contém RNA e o filtrado, os pequenos RNA. Este filtro foi então reservado. Ao filtrado que contém o miRNA, foram adicionados 2/3 do volume de etanol e esta solução foi transferida para uma nova coluna, centrifugada, e o filtrado resultante, descartado.

Os filtros com os RNAs e miRs foram lavados com soluções próprias do kit, intercaladas com centrifugações e, após o descarte do filtrado, centrifugados por mais 1 minuto a 10.000 g para secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e adicionados 50 µl de água livre de RNase pré-aquecida a 95° C. Após 1 minuto em temperatura ambiente, as colunas contendo os miRs e os RNAs foram centrifugadas e armazenadas a -80° C até sua utilização.

A pureza e concentração dos miRs e RNAs foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

3.5 Transcrição reversa (RT)

Com o *TaqMan® miRNAs Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), obtivemos o DNA complementar (cDNA) do miR. A solução de 200 ng/μl de miR foi diluída em 20 μl de água e desta diluição, 1 μl foi submetida à transcrição reversa, adicionando 9 μl de *mix* contendo os seguintes reagentes do kit: 0,15 μl de DNTP *mix*, 0,5 μl da enzima transcriptase reversa, 1,5 μl do tampão da enzima, 0,19 μl de inibidor de RNase, 3,66 μl de água livre de nuclease e 1 μl de *primer stem-loop* com sequência específica para os miRs, totalizando 10 μl de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Vertiti® (Applied Biosystems, Foster City, EUA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 minutos a 16° C, 30 minutos a 42° C e 5 minutos a 85° C.

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems, Foster City, EUA) que utilizou a Transcriptase reversa *Multiscribe*® e *primers* randômicos. O RNA total foi então diluído em água livre de nucleases em um volume final de 20 μl e concentração de 500 μl/ng. 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), 2 μl da enzima transcriptase reversa e 8,4 μl de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperatura (25° C por 10 minutos, 37° C por 120 minutos e 85° C por 5 minutos) no termociclador *Vertiti*® (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Ao final das reações, ambos os cDNAs foram armazenados a -20° C até o seu uso.

3.6 Análise de expressão dos genes e miRNAs por PCR em tempo real quantitativo

A partir do cDNA dos miRs e RNAs, realizamos a reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR) no sistema *ABI 7500 Fast qRT-PCR* no modo *standard* utilizando-se *Master Mix PCR TaqMan Universal* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A expressão de miRs e RNAs individuais foram analisadas utilizando-se *primers* sequência-específicos adquiridos pela Applied Biosystems (Tabela 4).

Tabela 4. *Primers* utilizados para quantificação da expressão dos miRNAs e genes pelo método de qRT-PCR.

Genes e miRNAs	Identificação do ensaio
CCNG1	Hs00171112_m1
Mimic-23b	000400
Mimic-27b	000409
RNU48	1006
β 2-microglobulina	Hs00984230_m1

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 um *quencher* que absorve luz emitida pelo fluoróforo. A sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado durante os ciclos da PCR. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* que pode ser então medida através de uma câmera situada na

parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação do miR e do RNA alvo contidos na reação após cada ciclo da PCR em tempo real.

Para amplificação dos fragmentos desejados, as reações foram feitas com 0,5 µl de uma solução contendo um par de *primer* e a sonda (com a marcação), 5 µl do *TaqMan Master Mix*, 3,5 µl de água livre de nuclease e 1 µl de cDNA, somando um total de 10 µl para cada reação. As condições das reações foram: 2 minutos a 50° C, 10 minutos a 95° C e 40 ciclos de 15 segundos a 95° C e 1 minuto a 60° C.

O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}^{74}$. O gráfico logarítmico produzido por este método padroniza a expressão do grupo controle com uma linha basal representada pelo valor de 1. Sendo que a expressão relativa dos miRs e RNAs são demonstradas em vezes, acima do valor 1 quando superexpressa e abaixo do valor 1 quando subexpressa.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e o gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como controle endógeno da reação para a expressão dos genes e o RNU48 foi utilizado como controle endógeno para a expressão dos miRs.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão para as variáveis quantitativas. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Mann Whitney.

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS19.0. Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como

estatisticamente significantes os resultados que apresentavam valor de p inferior a 5% ($p < 0,05$).

3.8 Ética

Nos experimentos animais, seguimos todas as normas éticas preconizadas pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O nosso estudo foi submetido e aprovado neste comitê sob protocolo no 018/15.

3.9 Financiamento

Nosso projeto foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo com auxílio à pesquisa sob o número 2015/03582-6.

4. RESULTADOS

4.1 Transfecção

Analizamos os tumores e selecionamos para análise os animais que apresentaram sucesso na transfecção confirmado por qRT-PCR. Os grupos de tratamento isolado Pró miR-23b e Pró miR-27b apresentaram superexpressão destes miRs de 182 vezes e 37 vezes maior que o grupo controle, respectivamente (Figura 5). No grupo de tratamento conjugado, o tratamento com a mesma dose individual de miR apresentou aumento importante da expressão na ordem de 5.268 vezes no miR-23b e de 440 vezes no miR-27b (Figura 5).

Figura 5 - Expressão relativa dos miRs em cada grupo de tratamento com seu desvio padrão. **A)** Análise da expressão do miR-27b entre os grupos de tratamento Pró miR-27b e o grupo de tratamento conjugado apresentou um aumento de 182 vezes e 5.268 vezes respectivamente. **B)** Análise da expressão do miR-23b demonstra um aumento de 37 vezes no grupo Pró miR-23b e de 440 vezes no grupo Pró miR-23b + Pró miR-27b.

4.2 Expressão da CCNG1

A expressão da CCNG1 apresentou aumento de 9% no grupo Pró miR-23b ($p=0,76$). Nos grupos de tratamento Pró miR-27b e no grupo conjugado, a expressão da

CCNG1 apresentou um aumento estatisticamente significativo de 46% ($p=0,05$) e de 203% ($p=0,01$), respectivamente, como demonstrado na figura 6 e na tabela 5.

Figura 6 - Expressão relativa entre os grupos de tratamento e grupo controle, mostrando um aumento de 9% ($p=0,76$) na expressão da CCNG1 no grupo Pró miR-23b. Os grupos Pró miR-27b e Pró miR-23b + Pró miR-27b apresentaram um aumento estatisticamente significativo de 46% ($p=0,05$) e de 203% ($p=0,01$) respectivamente.

Tabela 5. Média e desvio padrão da expressão da CCNG1 nos grupos Pró miR.

Grupo	Média de expressão da CCNG1	Desvio Padrão
Pró miR-23b	1,09	0,34
Pró miR-27b	1,46	0,25
Pró miR-23b + 27b	3,03	0,35

4.3 Crescimento tumoral

Não encontramos diferenças significativas no crescimento tumoral entre o início do experimento e seu final, quando comparamos os grupos de tratamento e o controle.

Entretanto, o grupo controle foi o que apresentou a maior média de crescimento tumoral, que foi de 13,58 vezes ao final do experimento. Enquanto nos grupos de tratamento observamos um aumento de 8,69 vezes ($p=0,43$), 5,96 vezes ($p=0,41$) e de 9,98 vezes ($p=0,55$) quanto utilizamos o Pró miR-23b, Pró miR-27b e no grupo conjugado Pró miR-23b e Pró miR-27b respectivamente (Figura 7).

Figura 7 - Representação do crescimento final dos tumores em cada grupo. O grupo controle cresceu 13,58 vezes os grupos de tratamento Pró miR-23b, Pró miR-27b e no grupo conjugado Pró miR-23b e Pró miR-27b cresceram respectivamente 8,69 vezes ($p=0,43$), 5,96 vezes ($p=0,41$) e 9,98 vezes ($p=0,55$).

5. DISCUSSÃO

O CPRC é a fase terminal do paciente com CaP, que apesar dos avanços, continua sendo um ponto de inflexão de sobrevida na história natural do CaP³⁷. Novas drogas conseguem atuar em diferentes vias da resistência à castração, como a Abiraterona através da inibição seletiva da enzima CYP17A1 e a Enzalutamida através de bloqueio mais eficaz do RA. A Abiraterona bloqueia a síntese de andrógenos nas adrenais, no testículo e nas células tumorais e a Enzalutamida, bloqueia a internalização do RA para o núcleo⁷⁵. Apesar desses avanços, estes tratamentos inevitavelmente falham^{35-37,76}. Mesmo com estas novas drogas, as mutações do tipo *splicing* alternativo do RA como no caso da variante 7 do RA, ou mesmo mutações pontuais, podem ser responsáveis pela falha do tratamento.

Nosso estudo demonstrou que em um modelo *in vivo* de CPRC, o estímulo dos miR-23b e -27b levou ao aumento da expressão da CCNG1. A linhagem de camundongo *BALB/c nude* foi escolhida por tratar-se de um animal sem timo e com deleção do gene FOXP1, provocando imunodeficiência celular secundária à redução de linfócitos T. Esta característica torna esses animais ideais para o implante de enxertos heterólogos sem provocar rejeição celular pelo seu sistema imune. O modelo animal foi inspirado em Mercatelli et al, que realizaram o tratamento de forma semelhante demonstrando que este regime de injeções intratumorais teve efeito desejado na expressão dos miRs alvo por pelo menos 4 semanas⁷⁷.

Nosso estudo utiliza uma linhagem celular bioluminescente para ter uma análise mais fidedigna do crescimento neoplásico, com o benefício de avaliar apenas células tumorais viáveis que são capazes de processar a luciferina⁷⁸. O IVIS® é a plataforma mais bem estabelecida na literatura para a obtenção de imagens de BLI em modelos animais e permite a avaliação da quantidade de células ativas no enxerto de maneira não-invasiva^{79,80}.

Os miR-23b/-27b no CaP estão subexpressos nos tumores metastáticos e de maior agressividade, sendo implicados principalmente na regulação da expressão de e-caderina, uma molécula de adesão celular que é subexpressa no mCaP^{66,81}. Goto et al sugeriram que o conjunto dos miR-23b/-27b tem o potencial de ser um marcador prognóstico e um preditor de tempo de progressão para o CPRC⁶⁴. Mu et al demonstraram que o aumento da expressão de miR-27b resultou em efeito sinérgico com drogas anticancerígenas em câncer de fígado e rim através de ativação de apoptose dependente de p53 e reduzindo a detoxificação celular da medicação através da enzima CYP1B1⁸². Majid et al estimularam a expressão do miR-23b em xenoenxerto de CaP com achado de retenção das células tumorais nas fases G0/G1 do ciclo celular e aumento das taxas de apoptose, evidenciando o potencial terapêutico da modulação deste miR⁸³.

No CaP, existem poucas evidências investigando a agressividade tumoral ou a resistência à castração em relação à expressão da CCNG1, que se mostrou superexpressa em amostras de CaP^{69,72}.

A CCNG1 é uma ciclina da família da SRC quinase descrita inicialmente como uma ciclina responsiva a p53^{69,84}. A proteína p53 é uma proteína nuclear supressora tumoral regulada através de feedback negativo pela Mdm2, uma ubiquitina que bloqueia a função desta proteína, exportando ela do núcleo para o citoplasma, onde esta proteína é então degradada pelo proteossoma⁸⁵.

A ação oncogênica da CCNG1 foi implicada através da supressão da p53 mediada pelo recrutamento da proteína fosfatase 2A que desfosforila a Mdm2, aumentando a degradação da p53⁷⁰. Apesar disso, novos estudos descobriram que esta ciclina única possui a capacidade de se ligar a sítios distintos da Mdm2 podendo provocar tanto a degradação quanto a estabilização da p53⁸⁵. Além desse mecanismo,

Zhao et al comprovaram ação intrínseca da CCNG1 com efeito pró apoptótico totalmente independente de p53 além de interações com o gene ARF e com o fator de transformação do crescimento *beta* (TGF- β) tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ocasionando redução da proliferação celular⁸⁵. Okamoto et al descobriram que a ação pró apoptótica mediada pelo TNF- α foi amplificada após superexpressão de CCNG1^{71,86}.

Encontramos um aumento da expressão da CCNG1 em nosso modelo *in vivo* principalmente quando estimulamos ambos miRs simultaneamente. Em estudo *in vitro* realizado em nosso laboratório, Pimenta et al trataram linhagem celular de CPRC com miR-23b ou miR-27b isoladamente, e nestas duas condições apresentou expressão elevada desse gene, corroborando os nossos achados *in vivo*. Neste estudo, só foi demonstrado um aumento da taxa de apoptose quando o tratamento com os miR-23b e miR-27b foi realizado em conjunto com a flutamida. Tal fato pode ser explicado pela dependência de altos níveis de expressão da CCNG1 para que ela exerça sua ação pró apoptótica intrínseca⁸⁵.

Nossos achados não demonstraram diferença estatisticamente significativa de crescimento tumoral entre os grupos de tratamento. Porém todos os grupos tratados apresentaram média de crescimento menor que o grupo controle, achado que pode ser melhor esclarecido em estudo com maior número de tumores estudados.

A CCNG1 usualmente é descrita com ação pró proliferativa, sendo que sua expressão no contexto oncológico normalmente apresenta uma relação inversa com a expressão dos miR-23b e -27b e, dentro do contexto do CaP e do CPRC, os miR-23b e -27b são sabidamente supressores tumorais. O peculiar em nosso estudo foi o achado que em todos os grupos e, principalmente no grupo de tratamento conjugado, demonstramos um aumento na expressão de CCNG1, o que pode sugerir um papel controlador do ciclo celular desta ciclina multifacetada.

Com o grande número de alvos potenciais dos miRs, estudos exploratórios muitas vezes despertam mais questões acerca de mecanismos potenciais em doenças tão heterogêneas e complexas como o CaP do que respostas definitivas. Nosso estudo apresentou uma proposta de tratamento epigenético, o que já é uma realidade com drogas em estudos clínicos de fase dois como Miravirsen® no tratamento da hepatite C entre outros^{48,87}.

Portanto, nosso estudo, apesar de apresentar limitações inerentes aos estudos *in vivo*, contribui com dados inéditos sobre o efeito da modulação positiva dos miR-23b/-27b na expressão da CCNG1 no CPRC.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Nosso trabalho apresentou limitações na forma de analisar o crescimento tumoral. Medidas de BLI no dia do implante tumoral e a extensão do experimento por mais tempo poderiam permitir uma análise mais completa acerca do crescimento, porém esbarrariam em questões éticas pois os tumores em crescimento causavam sofrimento importante aos animais. Idealmente, ensaios de apoptose a partir do tecido coletado poderiam trazer informações mais precisas acerca do efeito no ciclo celular do nosso tratamento, porém, não temos protocolos no nosso laboratório para tal análise.

PERSPECTIVAS

Avaliar o eixo miR-23b/-27b - CCNG1 - p53 em estudo *in vivo* em modelo castrado e em animais não castrados com avaliação do crescimento tumoral por BLI. Explorar o efeito em ensaios *in vitro* do aumento da expressão do CCNG1 através da

técnica de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) em linhagens celulares de CPRC.

6. CONCLUSÃO

A modulação positiva dos miR-23b/-27b em xenoenxertos bioluminescentes de CPRC provocou aumento da expressão da CCNG1 no grupo miR-27b e especialmente no grupo de tratamento conjugado.

O crescimento tumoral entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa apesar de menores médias de crescimento nos grupos tratados.

7. REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(1):7-30.
2. INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2017;2017.
3. Wong MC, Goggins WB, Wang HH, Fung FD, Leung C, Wong SY, et al. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *European urology*. 2016;70(5):862-74.
4. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *European urology*. 2014;65(1):124-37.
5. INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva 2015;2015.
6. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003;62(6 Suppl 1):3-12.
7. Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer*. 2007;121(7):1571-8.
8. Yossepowitch O, Briganti A, Eastham JA, Epstein J, Graefen M, Montironi R, et al. Positive surgical margins after radical prostatectomy: a systematic review and contemporary update. *European urology*. 2014;65(2):303-13.
9. Roehl KA, Loeb S, Antenor JA, Corbin N, Catalona WJ. Characteristics of patients with familial versus sporadic prostate cancer. *J Urol*. 2006;176(6 Pt 1):2438-42; discussion 42.
10. Siddiqui SA, Sengupta S, Slezak JM, Bergstralh EJ, Zincke H, Blute ML. Impact of familial and hereditary prostate cancer on cancer specific survival after radical retropubic prostatectomy. *J Urol*. 2006;176(3):1118-21.
11. Lynch HT, Kosoko-Lasaki O, Leslie SW, Rendell M, Shaw T, Snyder C, et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(11):2579-91.
12. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *The New England journal of medicine*. 2012;366(2):141-9.
13. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, et al. Cancer surveillance series: Interpreting trends in prostate cancer - Part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(12):1017-24.
14. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(4):212-36.
15. Etzioni R, Gulati R, Tsodikov A, Wever EM, Penson DF, Heijnsdijk EA, et al. The prostate cancer conundrum revisited: treatment changes and prostate cancer mortality declines. *Cancer*. 2012;118(23):5955-63.
16. Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol*. 2004;171(6 Pt 1):2122-7.
17. Pessoa RR, Viana PC, Mattedi RL, Guglielmetti GB, Cordeiro MD, Coelho RF, et al. Value of 3-Tesla multiparametric magnetic resonance imaging and targeted biopsy for improved risk stratification in patients considered for active surveillance. *BJU international*. 2017;119(4):535-42.
18. de Rooij M, Hamoen EH, Witjes JA, Barentsz JO, Rovers MM. Accuracy of Magnetic Resonance Imaging for Local Staging of Prostate Cancer: A Diagnostic Meta-analysis. *European urology*. 2016;70(2):233-45.
19. European Urology. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. 2019.

20. Drost F-JH, Roobol MJ, Nieboer D, Bangma CH, Steyerberg EW, Hunink MGM, et al. MRI pathway and TRUS-guided biopsy for detecting clinically significant prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017.
21. Rouviere O, Puech P, Renard-Penna R, Claudon M, Roy C, Mege-Lechevallier F, et al. Use of prostate systematic and targeted biopsy on the basis of multiparametric MRI in biopsy-naive patients (MRI-FIRST): a prospective, multicentre, paired diagnostic study. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):100-9.
22. van der Leest M, Cornel E, Israel B, Hendriks R, Padhani AR, Hoogenboom M, et al. Head-to-head Comparison of Transrectal Ultrasound-guided Prostate Biopsy Versus Multiparametric Prostate Resonance Imaging with Subsequent Magnetic Resonance-guided Biopsy in Biopsy-naive Men with Elevated Prostate-specific Antigen: A Large Prospective Multicenter Clinical Study. *European urology*. 2019;75(4):570-8.
23. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *The New England journal of medicine*. 2018;378(19):1767-77.
24. Egevad L, Delahunt B, Srigley JR, Samaratunga H. International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer - An ISUP consensus on contemporary grading. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2016;124(6):433-5.
25. 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;384(9959):2027-35.
26. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(2):125-32.
27. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU international*. 2013;111(5):753-60.
28. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. 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*. 2016;40(2):244-52.
29. Bokhorst LP, Valdagni R, Rannikko A, Kakehi Y, Pickles T, Bangma CH, et al. A Decade of Active Surveillance in the PRIAS Study: An Update and Evaluation of the Criteria Used to Recommend a Switch to Active Treatment. *European urology*. 2016;70(6):954-60.
30. Boorjian SA, Thompson RH, Tollefson MK, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Blute ML, et al. Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *European urology*. 2011;59(6):893-9.
31. Pound CR PA, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *Jama*. 1999;281(5):1591-7.
32. Wu JN, Fish KM, Evans CP, Devere White RW, Dall'Era MA. No improvement noted in overall or cause-specific survival for men presenting with metastatic prostate cancer over a 20-year period. *Cancer*. 2014;120(6):818-23.
33. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10024):1163-77.
34. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(8):737-46.

35. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2014;371(5):424-33.
36. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, et al. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2013;368(2):138-48.
37. Karantanos T, Evans CP, Tombal B, Thompson TC, Montironi R, Isaacs WB. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level. *European urology*. 2015;67(3):470-9.
38. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(1):3-23.
39. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
40. Huggins C, Hodges CV. Studies of prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Archives of Surgery*. 1941;43(2):209.
41. Ferraldeschi R, Welte J, Luo J, Attard G, de Bono JS. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene*. 2015;34(14):1745-57.
42. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer research*. 1999;59(4):803-6.
43. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(11):1028-38.
44. Li H, Wang Z, Tang K, Zhou H, Liu H, Yan L, et al. Prognostic Value of Androgen Receptor Splice Variant 7 in the Treatment of Castration-resistant Prostate Cancer with Next generation Androgen Receptor Signal Inhibition: A Systematic Review and Meta-analysis. *European urology focus*. 2017.
45. Devere White RW, Vinall RL, Tepper CG, Shi XB. MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer. *Urologic oncology*. 2009;27(3):307-11.
46. 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;31(6):796-801.
47. Yan J, Jiang JY, Meng XN, Xiu YL, Zong ZH. MiR-23b targets cyclin G1 and suppresses ovarian cancer tumorigenesis and progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:31.
48. Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Res*. 2013;2:136.
49. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in genetics : TIG*. 2007;23(5):243-9.
50. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2012;3(3):311-30.
51. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics*. 2014;2014:970607.
52. Qu Y, Huang X, Li Z, Liu J, Wu J, Chen D, et al. miR-199a-3p inhibits aurora kinase A and attenuates prostate cancer growth: new avenue for prostate cancer treatment. *The American journal of pathology*. 2014;184(5):1541-9.
53. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpileva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer*. 2010;127(8):1785-94.

54. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(11):857-66.
55. Iscaife A, Reis ST, Morais DR, Viana NI, da Silva IA, Pimenta R, et al. Treating metastatic prostate cancer with microRNA-145. *Apoptosis*. 2018;23(7-8):388-95.
56. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17(24):3011-6.
57. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):376-85.
58. Ladomery MR, Maddocks DG, Wilson ID. MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics. *International journal of molecular epidemiology and genetics*. 2011;2(3):253-60.
59. Pimenta RCA. O papel de microRNAs -221/-222 e -23b/-27b no câncer de próstata resistente à castração: Universidade de São Paulo; 2017.
60. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology*. 2008;26(4):462-9.
61. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(1):34-45.
62. Thieu W, Tilki D, deVere White RW, Evans CP. The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. *Urologic oncology*. 2014;32(5):517-23.
63. Sun T, Yang M, Chen S, Balk S, Pomerantz M, Hsieh CL, et al. The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer. *The Prostate*. 2012;72(10):1093-103.
64. Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, et al. The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014;5(17):7748-59.
65. Rice MA, Ishteiwy RA, Magani F, Udayakumar T, Reiner T, Yates TJ, et al. The microRNA-23b/-27b cluster suppresses prostate cancer metastasis via Huntingtin-interacting protein 1-related. *Oncogene*. 2016.
66. Ishteiwy RA, Ward TM, Dykxhoorn DM, Burnstein KL. The microRNA -23b/-27b cluster suppresses the metastatic phenotype of castration-resistant prostate cancer cells. *PloS one*. 2012;7(12):e52106.
67. Shang Y, Feng B, Zhou L, Ren G, Zhang Z, Fan X, et al. The miR27b-CCNG1-P53-miR-508-5p axis regulates multidrug resistance of gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):538-49.
68. Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, Tran D, Neubauer M, Wahl AF. Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(11):6050-61.
69. Reimer CL, Borrás aM, Kurdستاني SK, Garreau JR, Chung M, Aaronson Sa, et al. Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(16):11022-9.
70. Okamoto K, Li H, Jensen MR, Zhang T, Taya Y, Thorgeirsson SS, et al. Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Molecular cell*. 2002;9(4):761-71.
71. Okamoto K, Prives C. A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene*. 1999;18(32):4606-15.
72. Pimenta RC, Viana NI, Amaral GQ, Park R, Morais DR, Pontes J, Jr., et al. MicroRNA-23b and microRNA-27b plus flutamide treatment enhances apoptosis rate and decreases CCNG1 expression in a castration-resistant prostate cancer cell line. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2018;40(11):1010428318803011.
73. Fokidis HB, Yieng Chin M, Ho VW, Adomat HH, Soma KK, Fazli L, et al. A low carbohydrate, high protein diet suppresses intratumoral androgen synthesis and slows

castration-resistant prostate tumor growth in mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;150:35-45.

74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

75. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *The Lancet*. 2016;387(10013):70-82.

76. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2017;377(4):352-60.

77. Mercatelli N, Coppola V, Bonci D, Miele F, Costantini A, Guadagnoli M, et al. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PloS one*. 2008;3(12):e4029.

78. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal models of bone metastasis. *Cancer*. 2003;97(3 Suppl):748-57.

79. Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Dugger K, et al. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR J*. 2008;49(1):103-15.

80. Kim S, Zhang Y, Tang S, Qin C, Karelia D, Sharma A, et al. Optimizing live-animal bioluminescence imaging prediction of tumor burden in human prostate cancer xenograft models in SCID-NSG mice. *The Prostate*. 2019.

81. Pontes-Junior J, Reis ST, Dall'Oglio M, Neves de Oliveira LC, Cury J, Carvalho PA, et al. Evaluation of the expression of integrins and cell adhesion molecules through tissue microarray in lymph node metastases of prostate cancer. *Journal of carcinogenesis*. 2009;8:3.

82. Mu W, Hu C, Zhang H, Qu Z, Cen J, Qiu Z, et al. miR-27b synergizes with anticancer drugs via p53 activation and CYP1B1 suppression. *Cell Res*. 2015;25(4):477-95.

83. Majid S, Dar AA, Saini S, Arora S, Shahryari V, Zaman MS, et al. miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer research*. 2012;72(24):6435-46.

84. Okamoto K, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *The EMBO journal*. 1994;13(20):4816-22.

85. Zhao L, Samuels T, Winckler S, Korgaonkar C, Tompkins V, Horne MC, et al. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Molecular cancer research : MCR*. 2003;1(3):195-206.

86. Jiang L, Liu R, Wang Y, Li C, Xi Q, Zhong J, et al. The role of Cyclin G1 in cellular proliferation and apoptosis of human epithelial ovarian cancer. *J Mol Histol*. 2015;46(3):291-302.

87. Reid G, Kao SC, Pavlakis N, Brahmbhatt H, MacDiarmid J, Clarke S, et al. Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. *Epigenomics*. 2016;8(8):1079-85.

APÊNDICE

5/19/2019

Gmail - Tumor Biology - Manuscript ID TUB-19-0042

Rubens Park <rubens.park@gmail.com>

Tumor Biology - Manuscript ID TUB-19-0042

1 mensagem

Tumor Biology <onbehalf@manuscriptcentral.com>

21 de abril de 2019 12:53

Responder a: tubadmin@sagepub.co.uk

Para: rubens.park@gmail.com, gabriela.queiroz.amaral@gmail.com, ruanpimenta22@gmail.com, denisreis_morais@yahoo.com.br, nayara_viana_2@hotmail.com, iransilva@gmail.com, vanessarguima@hotmail.com, wnahas@uol.com.br, srougi@uol.com.br, katiaramos@uol.com.br, docjpjr@uol.com.br, sasareis@gmail.com

21-Apr-2019

Dear Mr. Park:

Your manuscript entitled "Up-regulation of miR-23b/27b target cyclin G1 and reduce castration-resistant prostate cancer growth." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Tumor Biology.

Your manuscript ID is TUB-19-0042.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/tumorbiology> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/tumorbiology>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID iDs during the peer review process. If you already have an ORCID iD you can link this to your account in ScholarOne just by logging in and editing your account information. If you do not already have an ORCID iD you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.

Thank you for submitting your manuscript to Tumor Biology.

Sincerely,
Tumor Biology Editorial Office