ALEXANDRE ISCAIFE

**O uso de microRNA para tratamento do câncer de
próstata: estudos *in vitro* e *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: Prof^a. Dr^a. Katia Ramos Moreira Leite

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Iscaife, Alexandre

O uso de microRNA para tratamento do câncer de próstata : estudos *in vitro* e *in vivo* /
Alexandre Iscaife. -- São Paulo, 2016.

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

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.Metástase neoplásica 3.Terapêutica
4.Modelos animais 5.MicroRNAs 6.Imagem molecular 7.Transfecção 8.Expressão
gênica 9.Apoptose 10.Ciclo celular 11.Biologia molecular

USP/FM/DBD-131/16

Dedicatória

A minha querida Mariana, namorada, mulher, amiga, guerreira e companheira,
pelo amor presente em todos os momentos e por me aceitar com todos os meus
defeitos incorrigíveis

A minha mãe, a “Dona Rosa”, pelo amor incondicional e pelo exemplo sempre
presente no meu caráter

Aos que sempre torceram por mim e que precocemente partiram para o
desconhecido: minha querida avó Livia, meu querido avô Hélio e meu querido
pai Osvaldo

A todos os pacientes com câncer, que na sua luta diária pela vida e dignidade
me ensinam e me inspiram a buscar o melhor de mim e da ciência, para poder
lhes retribuir com alívio e conforto

Agradecimentos

A Prof. Dra. Katia Leite, por me receber na Faculdade de Medicina da USP e me guiar nos caminhos da ciência com paciência, coragem e apoio incondicional. Por apostar em mim e proporcionar os anos de maior engrandecimento científico da minha vida.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, Professor Titular de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por todo apoio acadêmico e profissional e por me inspirar e estimular a buscar sempre a excelência, mas sobretudo pelo seu exemplo de caráter e humanismo.

Ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, pelo aprendizado excepcional, exemplo, confiança e amizade e por permitir que eu conquistasse muito mais do que eu já pensei em conseguir. Agradeço também pelo estímulo ao livre pensamento científico e apoio primordial ao meu crescimento acadêmico e profissional.

A Dra. Sabrina, minha eterna amiga e irmã adotiva, que ilumina todos ao seu redor, pelos momentos de alegria e por me apoiar em todas situações difíceis com muita sensibilidade, mas acima de tudo por fazer eu ver o que há de melhor em mim.

Aos amigos do LIM 55:

Nayara, pela grande amizade e sem a qual essa tese não teria acontecido,
Dr. José Pontes, pelas discussões sempre engrandecedoras,
Ao Denis e Iran, por todo suporte e companheirismo,
Nelson, Caio, Vanessa e Isis, por todo apoio desprendido.

A todos os médicos e funcionários da Disciplina de Urologia, especialmente o Prof. José Cury e Prof. Homero Bruschini, e à equipe de secretarias, Elisa, Inisabete, Iones, Tereza e Aparecida, por estarem sempre dispostas a me ajudar e ao Joselito Estrela pela ajuda e amizade.

Aos Profs. Marilisa Mantovani Guerreiro, Carlos Alberto Mantovani Guerreiro e Helaine Maria Bestete Pires e à Maria Cecília Marcondes da Silveira (*in memoriam*) pelo apoio inestimável

Aos Profs. Hernandes Faustino de Carvalho, Cristina O. Massoco Salles Gomes pelo suporte científico e logístico.

À Mara de Souza Junqueira, por todo o cuidado rigoroso e dedicado aos animais utilizados nesse estudo.

Ao Prof. Luiz Francisco Poli de Figueiredo (*in memoriam*), por me estimular na pesquisa científica quando era apenas um residente de cirurgia.

Aos residentes e ex-residentes da Clínica Urológica do HCFMUSP, com os quais aprendo muito mais do que posso ensinar.

Aos colegas do grupo de próstata da Clínica Urológica do HCFMUSP, Dr. Paulo Cordeiro, Dr. Mario Paranhos, Dr. Elias Chedid, Dr. Elcio Nakano e Dr. Eduardo Muracca, pelas contribuições diárias.

Aos amigos Dr. Renato Fidélis, Dr. Eduardo Miranda e Dr. Bruno Cezarino, pela valiosa e constante troca de conhecimentos.

Ao Sr. Dirceu Amaral Camargo, sem o qual as mudanças na vida nunca teriam sido possíveis.

Por fim, agradeço com todo o meu respeito aos animais desse estudo, cujas vidas não se foram em vão e servirão ao propósito maior e mais nobre de beneficiar outras vidas. Agradeço também ao meu grande e fiel amigo canino Sky, pela companhia durante todas as madrugadas escrevendo essa tese.

Agradeço também ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com o auxílio a pesquisa sob o número #2012/21966-8 e a bolsa de doutorado sob o número #2013/07350-7.

*“A vida é breve,
a arte é longa,
a oportunidade passageira,
a experiência enganosa,
e o julgamento difícil”
(Hipócrates)*

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	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
<i>Summary</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer de próstata – Generalidades.....	2
1.2 Estado da arte da terapia do câncer de próstata metastático.....	8
1.2.1 Mecanismos de resistência ao andrógeno e bloqueio hormonal...	8
1.2.2 Quimioterapia citotóxica.....	10
1.2.3 Imunoterapia.....	11
1.2.4 Terapia de alvos específicos.....	11
1.3 A biologia molecular do câncer de próstata.....	13
1.3.1 Alterações genéticas somáticas no câncer de próstata.....	15
1.3.2 Biologia molecular nas metástases ósseas por câncer de próstata	16
1.4 Os miRNAs.....	17
1.4.1 Os miRNAs no câncer.....	18
1.4.2 Os miRNAs no câncer de próstata.....	19
1.5 Modelos experimentais em CaP.....	21
1.6 Justificativa.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
3. MÉTODOS.....	27
3.1 Estudos <i>in vitro</i>	28
3.1.1 Linhagens celulares.....	28
3.1.2 Estudos de transfecção.....	29
3.1.3 Análise de expressão dos genes pós transfecção.....	30
3.1.4 Análise de apoptose por citometria de fluxo.....	32
3.1.5 Análise da ploidia e proliferação em citometria de fluxo.....	33
3.1.6 Ensaios de invasão.....	34
3.2 Análise estatística.....	35

3.3	Estudos <i>in vivo</i>	36
3.3.1	Estabelecimento do modelo animal de CaP metastático.....	37
3.3.2	Tratamento sistêmico dos animais.....	39
4.	RESULTADOS.....	42
4.1	Estudos <i>invitro</i>	43
4.1.1	Apoptose.....	43
4.1.2	Índice de proliferação celular.....	45
4.1.3	Ploidia do DNA.....	47
4.1.4	Expressão gênica.....	48
4.1.5	Ensaio de invasão com uso de matrigel.....	56
4.2	Estudos <i>in vivo</i>	60
4.2.1	Tratamento dos grupos de animais.....	60
4.2.2	Análise da variação da bioluminescência.....	61
4.2.3	Análise da variação de peso dos animais.....	68
4.2.4	Análise histológica das lesões tumorais.....	69
5.	DISCUSSÃO.....	71
5.1	O papel dos miRNAs na maquinaria celular: o que os estudos <i>in vitro</i> mostraram	73
5.2	O tratamento de animais com CaP metastático utilizando miRNAs	76
5.3	O significado clínico dos nossos resultados e perspectivas futuras	82
6.	CONCLUSÕES.....	84
7.	ANEXOS.....	86
8.	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICES.....	

Lista de abreviaturas

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

Anti-Mir – Anti-miRNA

ATCC – *American Type Culture Collection*

AUA – *American Urology Association*

BAZ2A - *Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A*

BMP - *Bone morphogenetic protein* BLI – *Bioluminescence*

β2M – *Beta-2-microglobulin*

CaP – *Câncer de próstata*

cDNA - *Complementary Deoxyribonucleic acid*

CMYC - *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*

CRKL - *V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like*

CYP17 - *Cytochrome P-45017*

CAPB - *Cancer of the prostate and brain*

DHEA - *Dehydroepiandrosterone*

ETS - *E26 transformation-specific*

FDA - *Food and Drug Administration*

FGF - *Fibroblast growth factor*

FGFR - *Fibroblast growth factor receptors*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GWAS - *Genome-wide association study*

GSTT1 - *Glutathione S-transferase T1*

HPC - *Hereditary Prostate Cancer*

HER2/neu - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

IGF - *Insulin-like growth fator*

IVIS – *In Vivo Image System*

ISUP – *Intenational Society of Urological Pathology*

LHRH - *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*

MDM2 - *Mouse double minute 2 homolog* MEM - *Minimum Essential Medium*

miR - *MiRNA*

MMP9 - *Matrix Metallopeptidase 9*

NKX3.1 – *NK3 homeobox 1*

PSA – *Prostate Specific Antigen*

PCA3 – *Prostate Cancer Antigen 3*

P45014DM - *Sterol 14-Demethylase P450*

PCAP - *Predisposing for prostate câncer*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PBS - *Phosphate buffered saline*

PDGF - *Platelet-derived growth factor*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

RAS - *Rat sarcoma*

RB – *Retinoblastoma gene*

RANK - *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*

RNA – *Ribonucleic Acid*

mRNA - *RNA mensageiro*

SFB – *Soro Fetal Bovino*

SMARCA5 - *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5*

SNP - *Single nucleotide polymorphism*

TMPRSS2 - *Transmembrane protease, serine 2*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

THAP2 - *THAP domain-containing protein 2*

WGS - *Whole genome sequencing*

Lista de Figuras

Figura 1 -	Demonstração da eficiência da emissão de luminosidade pela linhagem PC-3M-luc-C6.....	36
Figura 2 -	Técnica de injeção intra-cardíaca)	37
Figura 3 -	Protocolo de preparo do complexo miRNA/atelocolágeno para injeção na veia da cauda.....	40
Figura 4 -	Esquematização do tratamento dos animais com miRNAs e seu acompanhamento durante o estudo.....	41
Figura 5 -	Índice de apoptose nas três linhagens após transfecção.....	44
Figura 6 -	Expressão relativa de <i>mTOR</i> nas 3 linhagens de câncer de próstata	49
Figura 7 -	Expressão relativa de <i>SMARCA5</i> nas 3 linhagens de câncer de próstata	50
Figura 8 -	Expressão relativa de <i>cMYC</i> nas 3 linhagens de câncer de próstata	51
Figura 9 -	Expressão relativa de <i>KRAS</i> nas 3 linhagens de câncer de próstata	52
Figura 10 -	Expressão relativa de <i>MMP9</i> nas 3 linhagens de câncer de próstata	54
Figura 11 -	Expressão relativa de <i>CD44</i> nas 2 linhagens de câncer de próstata	55
Figura 12 -	Análise do matrigel na linhagem DU145.....	57
Figura 13 -	Análise do matrigel na linhagem PC-3M-luc-C6.....	59
Figura 14 -	Curvas temporais do comportamento da bioluminescência absoluta para os grupos miR145 e controle negativo (CN)	62
Figura 15 -	Curvas temporais do comportamento da bioluminescência relativa para os grupos miR145 e controle negativo (CN). Dados normalizados.....	62
Figura 16 -	Camundongos nude (Balb/c) injetados com 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6 tratados com miR-145.....	63
Figura 17 -	Curvas temporais do comportamento da bioluminescência absoluta para os grupos miR100, anti-miR100 e controle negativo (CN)	64
Figura 18 -	Curvas temporais do comportamento da bioluminescência relativa para os grupos miR100, anti-miR100 e controle negativo (CN). Dados normalizados.....	64
Figura 19 -	Camundongos nude (Balb/c) tratados com miR100 ou anti-miR100	65

Figura 20 -	Curvas temporais do comportamento da bioluminescência absoluta para os grupos anti-miR-373 e controle negativo (CN)	66
Figura 21 -	Curvas temporais do comportamento da bioluminescência relativa para os grupos anti-miR-373 e controle negativo (CN). Dados normalizados.....	67
Figura 22 -	Camundongos nude (Balb/c) injetados com 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6 tratados com anti-miR-373	67
Figura 23 -	Variação do peso médio dos animais de cada grupo estudado.....	69
Figura 24 -	Análise histológica de órgãos acometidos pelas metástases.....	70
Figura 25 -	Corte transversal de miocárdio de rato de 6-8 semanas mostrando a relação entre a espessura do bisel das agulhas e do ventrículo esquerdo.....	77

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Classificação TNM/AJCC 2010.....	5
Tabela 2 -	Linhagens celulares de CaP e suas características.....	28
Tabela 3 -	Reagentes utilizados para transfecção do pré-miRNA e anti – miRNA.....	29
Tabela 4 -	<i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão dos genes alvo.....	31
Tabela 5 -	Grupos de animais.....	41
Tabela 6 -	Porcentagem de células em apoptose total nas linhagens transfectadas.....	43
Tabela 7 -	Porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M na linhagem DU145.....	46
Tabela 8 -	Porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M na linhagem PC-3M- luc-C6.....	47
Tabela 9 -	Expressão do gene mTOR nas três linhagens transfectadas com miR100 e anti-miR100.....	48
Tabela 10 -	Expressão do gene SMARCA5 nas três linhagens transfectadas com miR100 e anti miR100.....	49
Tabela 11 -	Expressão do gene cMYC nas três linhagens transfectadas com miR145.....	51
Tabela 12 -	Expressão gênica de KRAS nas três linhagens transfectadas com o miR145.....	52
Tabela 13 -	Expressão gênica da MMP9 nas três linhagens expostas ao miR373 e seu anti-miR.....	53
Tabela 14 -	Expressão gênica de CD44 nas linhagens DU145 e PC3 transfectadas com miR373 e seu anti-mir373.....	55
Tabela 15 -	Taxas de sucesso e mortalidade nos diferentes tipos de acesso.....	78

RESUMO

Iscaife A. *O uso de microRNA para tratamento do câncer de próstata: estudos in vitro e in vivo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: O câncer de próstata (CaP) é o tumor mais comum do homem nos países ocidentais e a segunda causa de óbito por câncer em homens nos EUA, Europa e Brasil. O câncer localizado tem sobrevida câncer específica elevada quando tratado adequadamente, porém a doença metastática ainda apresenta tratamentos pouco eficientes com sobrevida global de 28%. Os microRNAs (miRNAs) são um grupo de moléculas pequenas de RNA que contém entre 19 a 25 nucleotídeos não codificantes de proteína, com ação fundamental na regulação da expressão gênica. Eles estão envolvidos em processos essenciais nas células normais e neoplásicas como ciclo celular, proliferação, apoptose, metabolismo energético, invasão e metastatização. **Objetivos:** Realizar estudos *in vitro* e *in vivo* usando miRNA em um modelo de câncer de próstata metastático inédito no nosso meio com intuito de analisar o seu potencial como agente terapêutico dessa neoplasia. **Métodos:** Nos estudos *in vitro*, três linhagens celulares foram utilizadas (PC3, DU145 e LNCaP). Essas linhagens foram transfectadas com os miRNAs 100, 145 e 373 e seus respectivos antiMiRs utilizando-se lipofectamina. Analisamos a expressão dos genes alvo *mTOR*, *SMARCA5*, *KRAS*, *CMYC*, *MMP9*, *CD44* por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Foram realizados também estudos de apoptose, ciclo celular e ploidia utilizando o citômetro de fluxo. Alterações no potencial de invasão foram avaliadas pela técnica do matrigel. O modelo *in vivo* pré-clínico foi desenvolvido pela injeção intra-cardíaca da linhagem PC-3M-Luc-C6 em camundongos NUDE com 9 semanas. O crescimento tumoral foi avaliado com o sistema de bioluminescência *in vivo*. Após o pleno estabelecimento das metástases no dia 21, os animais foram tratados com três injeções na veia da cauda contendo o miRNA conjugado com o atelocolágeno. Os animais foram sacrificados e no dia 48 para análise dos tecidos. **Resultados:** miR-100 aumenta a apoptose na LNCaP, e reduz a apoptose na DU145. Na linhagem DU145 o miR 100 inibiu a proliferação. Na análise da expressão gênica o miR-100 inibe *SMARCA5* na DU145 e *PC3* e *mTOR* na LNCaP, o anti-miR 100 estimula *mTOR* e *SMARCA5* na LNCaP. O miR-145 promoveu aumento da apoptose em 24% na DU145. Na linhagem PC3 o miR-145 age inibindo a proliferação, com uma diferença absoluta de 18% em relação ao seu controle. O miR-145 inibe *KRAS* e *CMYC* nas três linhagens e o anti-miR-145 estimula *CMYC* na DU145 e *RAS* nas três linhagens. O miR-373 reduziu a apoptose em 29% na DU145 e diminui a proliferação com uma diferença absoluta de 13% em relação ao controle. O miR-373 estimula a *MMP9* na DU145 e na LNCaP e inibe o *CD44* na PC3. O anti-miR-373 inibe *MMP9* na DU145 e LNCaP. Nos estudos *in vivo* de CaP metastático o miR-100 apresenta tendência a redução no crescimento tumoral

($p=0,23$) e o miR-145 reduz o crescimento de forma significativa no dia 34 ($p=0,02$). Após esses dias o tumor volta a crescer de forma agressiva. Os animais tratados com anti-miR-373 não apresentaram alterações em relação aos controles. **Conclusões:** O miR-100 é um miRNA contexto dependente, com papel supressor tumoral em linhagens de tumor de próstata agressivo e o miR-373 age *in vitro* como oncomiR. O miR-145 age como supressor tumoral *in vitro* e em modelo animal de CaP metastático apresentando resposta terapêutica consistente, podendo ser utilizado no arsenal terapêutico contra essa neoplasia. Estudos futuros devem avaliar o uso dos miRNAs isoladamente ou de forma adjuvante no tratamento do CaP metastático.

Descritores: neoplasia da próstata; metástase neoplásica; terapêutica; modelos animais; microRNAs; imagem molecular; transfecção; expressão gênica; apoptose; ciclo celular; biologia molecular

SUMMARY

Iscaife A. *The use of microRNA for the treatment of prostate cancer: in vitro and in vivo studies* [thesis]. São Paulo: 'Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo'; 2016.

Introduction: Prostate cancer (PCa) is the most common neoplasia of man in Western countries and the second cause of death by cancer in men in the US, Europe and Brazil. The localized cancer has high cancer-specific survival when treated properly, however metastatic disease still presents low effective treatments with 28% of global survival. microRNAs (miRNAs) are a group of small RNA molecules containing from 19 to 25 nucleotides of noncoding protein with fundamental action in the regulation of gene expression. They are involved in key processes in normal and neoplastic cells as cell cycle, proliferation, apoptosis, energy metabolism, invasion and metastasis. **Objectives:** To carry out studies *in vitro* and *in vivo* using miRNA in a novel model of metastatic prostate cancer in our country in order to evaluate its potential as a therapeutic agent of this neoplasia. **Methods:** In the *in vitro* studies, three cell lines were used (PC3, DU145 and LNCaP). These cell lines were transfected with miRNAs 100, 145 and 373 and their antiMiRs using lipofectamine. We analyzed the gene expression of *mTOR*, *SMARCA5*, *KRAS*, *CMYC*, *MMP9*, *CD44* by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). We also performed studies of apoptosis, cell cycle and ploidy using flow cytometer. Changes in the invasion potential were evaluated by the technique of matrigel. The pre-clinical model *in vivo* was developed by intra-cardiac injection of PC-3MLuc-C6 cell line in NUDE mice with 9 weeks. Tumor growth was evaluated with an *in vivo* image system (IVIS). After the full establishment of metastases on day 21, the animals were treated with three injections into the tail vein containing the miRNA plus atelocollagen. The animals were sacrificed on day 48 for tissues analysis. **Results:** MiR-100 increases apoptosis in LNCaP and reduces apoptosis in DU145. The anti-miR-100 increased apoptosis in 14% in PC3. In cell line DU145, miR-100 inhibited proliferation. In the analysis of gene expression, the miR-100 inhibits *SMARCA5* in DU145 and PC3 and *mTOR* in LNCaP, anti-miR-100 stimulates *mTOR* and *SMARCA5* in LNCaP. The miR-145 promoted an increased in apoptosis by 24% in DU145. In PC3 cell line miR-145 acts by inhibiting the proliferation, with an absolute difference of 18% compared to control. MiR-145 inhibits *KRAS* and *CMYC* in the three cell lines and anti-miR-145 stimulates *CMYC* in DU145 and *KRAS* in the three cell lines. The miR-373 reduced apoptosis by 29% in DU145 and reduces proliferation with an absolute difference of 13% relative to control. MiR-373 stimulates *MMP9* in DU145 and LNCaP cells and inhibits *CD44* in PC3. The anti -miR-373 inhibits *MMP9* in DU145 and LNCaP. In the *in vivo* studies of metastatic PCa, miR-100 shows a tendency to decrease tumor growth ($p=0.23$) and miR-145 reduces tumor growth on day 34 ($p=0.02$). After those days, the tumor grows back aggressively. Animals treated with anti-miR-373 showed no changes relative to controls. **Conclusion:** The miR-100 is a context-dependent

miRNA, with tumor suppressor role in aggressive tumor cell lines. The miR-373 acts *in vitro* as oncomiR and miR-145 acts as a tumor suppressor *in vitro* and in an animal model with consistent therapeutic response and can be used in the therapeutic arsenal against this neoplasia. Future studies should evaluate the use of miRNAs alone or adjuvant in the treatment of metastatic prostate cancer.

Descriptors: prostatic neoplasms; neoplasm metastasis; therapeutics; animal models; microRNAs; molecular imaging; transfection; gene expression; apoptosis; cell cycle; molecular biology

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de próstata - Generalidades

O câncer de próstata (CaP) é o tumor mais comum do homem nos países ocidentais (excluindo os tumores de pele) e a segunda causa de óbito por câncer em homens nos EUA ¹. Em 2015 foram estimados 220.800 casos novos e 27.540 mortes por CaP nos EUA, no Brasil 13.772 homens morreram da doença em 2013 sendo esperados 61.200 novos casos em 2016 ^{2, 3}. Aproximadamente 14% dos homens serão diagnosticados com CaP em algum momento durante a vida enquanto 1 em 33 ou aproximadamente 3% morrerão da doença. Embora a sobrevida global do câncer localizado atualmente seja de aproximadamente 100% em 5 anos, quando a doença é metastática essa taxa cai para 28% ³.

Após o tratamento local considerado curativo cerca de 30% dos homens sofrerão recidiva bioquímica. Em um período médio de 8 anos espera-se o surgimento de metástases e após a disseminação metastática a sobrevida média até a morte é de 5 anos ⁴.

O surgimento do CaP depende da interação de vários eventos que incluem fatores genético/familiares, hormonais, ambientais e alimentares. Os principais fatores não modificáveis são idade, raça negra e ter parente de primeiro grau (pai ou irmão) com CaP antes dos 60 anos ⁵. Dentre os fatores de risco modificáveis o único que apresenta evidências em estudos recentes é a síndrome metabólica, estando associada principalmente com tumores clinicamente significantes e de alto grau ⁶.

A avaliação clínica do paciente com suspeita de câncer de próstata inclui basicamente o exame sérico do antígeno prostático específico (PSA) e o toque retal. Atualmente ganha espaço a ressonância magnética multiparamétrica da próstata e o uso de outros marcadores, como o PCA3 e o 4Kscore. O PCA3 é um RNA tecido-específico da próstata e que está superexpresso no câncer. O 4Kscore utiliza uma combinação de parâmetros clínicos com frações do PSA e kaliceína humana tipo 2 e informa a probabilidade de uma biópsia apresentar CaP de alto grau ^{7, 8}.

Na era pré PSA a sobrevida câncer específica em 5 anos de pacientes diagnosticados com CaP era de 70-75% e atualmente é de 98,6%, sendo que apenas 4% a 6% dos pacientes têm doença metastática ao diagnóstico, fato esse que se acredita dever-se a difusão da medida de PSA como rastreamento^{3, 4, 9}.

Apesar dessas estatísticas, o câncer de próstata localizado e de baixo risco apresenta mortalidade global semelhante à população sem doença, o que desencadeou recente debate sobre a real necessidade do rastreamento do câncer de próstata. Dois estudos, o PLCO - *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial* dos Estados Unidos ¹⁰ e o ERSPC - *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* ¹¹ mostraram resultados controversos em relação a queda de mortalidade com o rastreamento com PSA. Baseada nesses estudos, a *U.S. Preventive Services Task Force* (USPSTF), recomendou que não fosse realizado rastreamento de câncer de próstata na população geral. Entretanto, a análise da força tarefa tem sido questionada pelas diversas sociedades urológicas e a *American Urology Association* (AUA) recomenda o rastreamento com restrições ^{12, 13}.

O diagnóstico do CaP é feito por meio da realização de biópsia por agulha, via transretal ou perineal e também em produtos de ressecção transuretral (RTU) de próstata ou adenomectomias. O tipo histológico mais comum é o adenocarcinoma em 95% dos casos, sendo os outros 5% tumores mesenquimais ou uroteliais.

O CaP é graduado conforme o escore de Gleason, que valoriza o padrão glandular e a relação entre glândulas e o estroma prostático. Classifica-se em 5 graus histológicos, sendo o grau 1 a lesão mais diferenciada e o grau 5 a mais indiferenciada. Nos produtos de prostatectomia radical e de RTU de próstata, o escore é obtido pela soma do padrão mais comum com o segundo mais comum. Nos produtos de biópsias, o escore resulta da soma do padrão mais comum com o padrão de mais alto grau. Os tumores com escore 6 são considerados de baixo grau, o escore 7 é considerado de grau intermediário e pode ser dividido em 7 (3+4) e 7 (4+3), esse último com comportamento mais agressivo. Os tumores de escore 8,9 e 10 são considerados de alto grau ^{14, 15}. A graduação de Gleason é até hoje a

mais utilizada e difundida, porém, a nota 6 de Gleason está associada geralmente a um tumor indolente, e opções alternativas ao tratamento imediato devem ser consideradas.

D'Amico e colaboradores em 1998, propuseram uma estratificação em três grupos de risco com a finalidade de prever a recidiva bioquímica após prostatectomia radical ou radioterapia. Esse sistema divide os pacientes com doença localizada em risco baixo, intermediário e alto. O paciente de baixo risco é definido como tendo estágio clínico T1/T2a, PSA ≤ 10 ng/ml, e Gleason ≤ 6 . O CaP de risco intermediário é aquele com estágio T2b, PSA 10–20 ng/mL e/ou Gleason 7. O grupo de alto risco é classificado como tendo tumores $\geq T2c$, PSA > 20 ng/mL ou Gleason 8–10 ¹⁶.

Mais recentemente a *International Society of Urothology* (ISUP) propôs uma nova classificação, variável de 1 a 5, sendo o grau 1 correspondente ao Gleason 3+3, o grau 2 ao Gleason 3+4, o 3 ao 4+3, o 4 ao 4+4 e o grau 5 aos Gleasons 4+5, 5+4 ou 5+5 ¹⁷.

Essa graduação parece ser mais realista com relação ao prognóstico dos pacientes ^{18, 19}. O prognóstico depende do escore de Gleason e do estadiamento patológico TNM da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*, 2010), conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Classificação TNM/AJCC 2010

T - Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (p. ex., devido a PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor que envolve uma metade de um dos lobos ou menos
T2b	Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos
T2c	Tumor que envolve ambos os lobos
T3	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni- ou bilateral)
T3b	Tumor que invade vesícula(s) seminal(ais)
T4	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus ou parede pélvica
N- Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
M - Metástase à Distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Linfonodo(s) não regional(ais)
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

O tratamento do adenocarcinoma da próstata deve ser analisado individualmente, pois diversos fatores interferem na conduta terapêutica, como grau de Gleason, estadiamento, idade, comorbidades, risco de complicações e anseios do paciente. Baseado na história natural do câncer da próstata, o

tratamento radical não deve ser considerado, em geral, para indivíduos que apresentam uma expectativa de vida inferior a 10 anos.

Para os tumores localizados de risco baixo e intermediário, a *American Urology Association* (AUA) considera como opções a prostatectomia radical, a radioterapia, braquiterapia e a vigilância ativa (VA) ou “*active surveillance*”. Os pacientes devem ser informados sobre todas essas alternativas para discussão conjunta sobre riscos e benefícios de cada conduta.

Para pacientes com tumores de baixo risco e expectativa de vida maior que 10 anos e menor que 20 anos, a VA pode ser a primeira opção de conduta (Grau de recomendação 1C)²⁰. Na realidade a prática da VA pode ser considerada como uma possibilidade de postergar o tratamento curativo para um melhor momento futuro sem acarretar um risco aumentado de progressão da doença ²⁰⁻²².

A vigilância ativa tem um conceito diferente do “*watchful waiting*” ou observação, na qual a decisão de intervir se faz a partir de sintomas (como obstrução urinária ou dor óssea), sendo essa intervenção apenas paliativa. O “*watchful waiting*” é uma alternativa a terapia local para pacientes com idade avançada e comorbidades que reduzem a expectativa de vida para menos de 10 anos ²³.

Os critérios para indicar a entrada na VA são variados, porém o mais utilizado é o do grupo do professor Klotz de Toronto que considera estágio clínico T1c ou T2a, Gleason ≤ 6 e PSA ≤ 10 ng/mL. Os pacientes em VA são monitorados por PSA, toque retal e novas biópsias da próstata, porém ainda não existem dados apropriados para se definir os intervalos e quais alterações deveriam desencadear a intervenção. O aparecimento de tumor de alto grau na biópsia parece ser o parâmetro mais utilizado para intervenção atualmente ²⁴.

Para os pacientes não candidatos à VA ou que queiram um tratamento curativo imediato, a prostatectomia radical e a radioterapia apresentam taxas de cura de 95% e 75% em 10 anos ²⁵. As principais complicações da cirurgia radical são a incontinência urinária, a disfunção erétil e a estenose da uretra. A radioterapia externa promove cistites, colites, retites, incontinência urinária e disfunção erétil tardia, mas num percentual menor do que a prostatectomia radical. A braquiterapia,

com taxas de cura em torno de 66% em 12 anos, promove sintomas urinários irritativos e retenção urinária inicialmente, além de colites, cistites tardias e estenoses de uretra ²⁶.

Os pacientes com estágio clínico localmente avançados (T3-T4) têm aproximadamente 50% de possibilidade de apresentarem linfonodos pélvicos positivos. Por isso, as tentativas de tratamento localizado são, no mínimo, discutíveis e muitos acreditam que esses pacientes devam ser tratados como portadores de tumores metastáticos ²⁷.

Os locais mais comuns de metástases são os linfonodos e os ossos. Metástases pulmonares são extremamente comuns em autopsias e geralmente assintomáticas. Além de linfonodos e ossos, podem ocorrer metástases para bexiga, fígado, adrenais e sistema nervoso central ²⁸.

O CaP metastático tem uma predileção por acometer os ossos e não existe uma explicação clara para esse acometimento, porém uma das teorias proposta por Paget em 1889 é que os ossos se apresentam como solo fértil (*seed and soil theory*), apresentando fatores locais propícios à proliferação tumoral. Células tumorais circulantes aderem à cortical e medula óssea por meio de integrinas, colágeno, lamininas e outras proteínas transmembrana. A expansão tumoral causa dor, compressão, fraturas patológicas e distúrbios hematológicos pela substituição da medula ²⁹.

A principal manifestação clínica é a dor, e as localizações mais comuns das metástases são pelve, coluna vertebral, costelas e região proximal dos ossos longos. Quando as metástases acometem o esqueleto apendicular estas apresentam pior prognóstico. A compressão medular é a principal complicação, considerada emergência médica; se não abordada precocemente pode levar a disfunções motoras permanentes e até a morte a depender do local de compressão

1.2 Estado da arte da terapia do câncer de próstata metastático

1.2.1 Mecanismos de resistência ao andrógeno e bloqueio hormonal

O receptor androgênico (RA) é um fator de transcrição membro de uma superfamília de proteínas receptoras celulares que incluem o estrógeno e a vitamina D. O receptor após sua ligação com o andrógeno se associa a cofatores e transpõe a membrana nuclear onde se liga ao DNA, ativando a transcrição de genes que possuem elementos de resposta ao RA responsáveis principalmente pela indução da proliferação celular ³¹.

O conceito do tratamento hormonal do câncer de próstata foi descrito pela primeira vez em 1893 por W. H. White, mas não chamou a atenção da comunidade científica até 1940 quando Huggins e Hodges demonstraram a eficácia do estrógeno e da orquiectomia no tratamento do câncer de próstata ³². A partir desse momento este passou a ser o tratamento padrão para a doença até os anos de 1980 quando os agonistas do *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone* (LHRH) foram introduzidos na prática clínica.

Existem várias modalidades de bloqueio hormonal, como a orquiectomia bilateral, os agonistas LHRH como a goserelina, os antagonistas LHRH como o degarelix, outros antiandrogênicos como os estrógenos orais, ciproterona e o ketoconazol. O bloqueio androgênico máximo (BAM) ocorre quando associamos um bloqueador central com um bloqueador periférico como um antiandrogênio, que bloqueia a ação da testosterona local e a produção nas adrenais. Aparentemente não há diferenças entre orquiectomia e BAM conforme estudos de eficácia ³³. Os efeitos colaterais do bloqueio hormonal incluem prejuízo da libido e ereção, ondas de calor, ginecomastia, anemia, osteoporose, depressão, hepatotoxicidade e diarreia crônica ^{34, 35}.

No início da década de 1990 a quimioterapia foi introduzida como tratamento paliativo nos casos de resistência ao tratamento antiandrogênico, melhorando na década seguinte o tempo de sobrevida dos pacientes. Apesar dos esquemas terapêuticos amplamente aplicados atualmente, tais como bloqueio androgênico

completo, quimioterapia e manipulações hormonais sequenciais, os mecanismos de resistência resultam na progressão da doença metastática com índices de sobrevida em 5 anos próximos de 25% ³⁶.

Existem múltiplas vias de resistência ao bloqueio androgênico que são promovidas pelos múltiplos tratamentos que induzem a seleção de clones celulares com mutações ou amplificações do RA que, de um modo geral, facilitam a sinalização celular no ambiente com baixos níveis de testosterona. A expressão de variantes do RA, resultante de *splicing*, permite a manutenção da sinalização do receptor sem a necessidade da ligação receptor-hormônio ^{37, 38}. Os esteroides sexuais produzidos pela adrenal assim como a sinalização autócrina se tornam importantes para a manutenção da neoplasia e são a marca da doença resistente a castração. Além disso, cofatores e adaptadores se ligam aos receptores androgênicos facilitando a ligação desses com os elementos de resposta no DNA, sinalizando a proliferação celular mesmo em condições de castração. Um desses mecanismos é a interação entre o receptor androgênico e a proteína adaptadora CRKL que resgata a atividade do RA usando vias de sinalização distintas durante o tratamento com bicalutamida ³⁹.

Embora essa situação seja denominada *status* hormônio-refratário ela, ainda é baseada na sinalização androgênica, sendo fundamental a atividade do receptor, recomendando-se a denominação de resistência à castração. Esse fato é relevante desde que o desenvolvimento de novas drogas deve considerar essa como a primeira via de manutenção da neoplasia.

Assim, o uso do ketoconazol como um inibidor não seletivo da síntese de andrógenos pela adrenal promove a diminuição dos níveis de testosterona e de deidroepiandrosterona (DHEA) através da inibição das enzimas P45014DM e CYP17. Seu uso induz uma queda do antígeno prostático específico (PSA) em 20 a 60% dos pacientes com duração de 3 a 7 meses. As limitações do seu uso se devem à elevada toxicidade ⁴⁰.

Em 2009, Attard e colaboradores demonstraram a superexpressão de CYP17 no carcinoma da próstata, o que levou a síntese da abiraterona, um inibidor seletivo da biossíntese de esteroides que promove queda da testosterona circulante

a níveis indetectáveis em pacientes que já sofreram castração ⁴¹. O estudo de fase II em pacientes com doença refratária não tratados com quimioterapia mostrou uma redução de mais de 50% do PSA em 85% dos pacientes ⁴². O mesmo efeito foi demonstrado em pacientes tratados previamente com docetaxel. O estudo de fase III pós-docetaxel mostrou um aumento de sobrevida considerável, com mediana de 14,8 meses quando comparado ao grupo placebo ⁴³.

1.2.2 Quimioterapia citotóxica

A quimioterapia para o tratamento do câncer de próstata atualmente se baseia na combinação docetaxel-prednisona que substituiu a mitoxantrona a partir de 2004, oferecendo um benefício de sobrevida de poucos meses e queda do PSA em metade dos pacientes⁴⁴. Em 2010 um novo taxano, o carbazitaxel, foi apresentado como uma alternativa a pacientes que progrediram com o docetaxel. O estudo TROPIC randomizou 755 homens que receberam mitoxantrone (377) ou cabazitaxel (378) sendo a sobrevida mediana de 15,1 meses para o grupo tratado com o taxano *versus* 12,7 meses do grupo mitoxantrona ($p < 0,001$)⁴⁵.

Uma terceira geração de quimioterápicos baseados em platina oral é representada pelo satraplatin, cujo ensaio clínico de fase III (SPARC) randomizou 950 pacientes que receberam satraplatin, prednisona ou placebo, demonstrando um retardo na progressão e diminuição de dor, não havendo ganho na sobrevida global ⁴⁶.

Classicamente a quimioterapia estava restrita à pacientes com doença resistente à castração, porém, recentemente surgiu um novo conceito introduzindo a quimioterapia associada ao bloqueio hormonal para pacientes com doença sensível à castração. Sweeney e colaboradores compararam um grupo que recebeu docetaxel e bloqueio hormonal com um grupo que recebeu apenas bloqueio hormonal. Em um seguimento médio de 28,9 meses a sobrevida global foi de 13,6 meses maior no grupo de terapia combinada, mostrando maior benefício nos pacientes com doença metastática de alto volume ⁴⁷.

1.2.3 Imunoterapia

A terapia imune tem sido aplicada tradicionalmente aos carcinomas de rim e melanomas, pois a implicação do sistema imunológico no controle e progressão dessas doenças é particularmente óbvio ⁴⁸. O CaP não parece sofrer grande influência da atividade imune, entretanto o uso de vacinas pode ser utilizado em pacientes refratários aos tratamentos da doença avançada. A GVAX é uma vacina desenvolvida a partir da linhagem de CaP LNCaP que expressa GM-CSF com resultados animadores em ensaio clínico de fase II, mas que falhou em estudo de fase III, não afetando a sobrevida dos pacientes. A Sipuleucel T (PROVENGE) é uma vacina aprovada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer de próstata baseado em um estudo de fase III que demonstrou um aumento de sobrevida de 4,1 meses sem grandes respostas tumorais ⁴⁹.

1.2.4 Terapias de alvos específicos

O conhecimento das vias biológicas das neoplasias abre um novo caminho para o desenvolvimento de drogas específicas tendo como alvo as alterações moleculares relacionadas à promoção e progressão do câncer. As alterações genéticas se acumulam e fazem com que sejam adquiridas novas capacidades como promoção da angiogênese, crescimento independente de fatores de crescimento, evasão da apoptose e da vigilância imune, infiltração e metastatização. Esses conhecimentos foram responsáveis pelo desenvolvimento do imatinib para o tratamento da leucemia mieloide crônica. A translocação *BCR-ABL* promove a expressão de um receptor tirosina-quinase permanentemente ativado, responsável pelo desenvolvimento da doença.⁵⁰ O desenho de uma molécula inibidora específica transformou a história natural da doença na última década, sendo posteriormente utilizada para o tratamento do tumor do estroma gastrointestinal (GIST) que apresenta um aumento de atividade do receptor C-KIT, também bloqueado pela molécula ⁵¹.

O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) está superexpresso pelo câncer de próstata entre 40 a 80% sem nenhuma mutação específica. O uso de gefitinib em um estudo clínico de fase II não demonstrou atividade da droga em pacientes com doença resistente a castração ⁵². O mesmo resultado desapontador foi descrito com o uso de inibidores do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) ⁵². Atualmente existem numerosos ensaios clínicos em andamento com o uso de drogas-alvo, principalmente inibidores tirosina-quinase do tipo sorafenib, sunitinib e bevacizumab ⁵³.

A ativação da via *hedgehog* ocorre em tumores metastáticos e sua inibição, como pela ciclopamina, está em estudos pré-clínicos. A importante via PI3K/Akt/mTOR está envolvida na sinalização de diversos fatores de crescimento sendo de papel fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral e o regulador negativo desta via é o PTEN, que está deletado em mais de 50% dos tumores metastáticos. Estudos em modelos experimentais de xenoenxerto de tumores com deleção do PTEN mostrou que a restauração da atividade funcional do PTEN e a inibição da via do mTOR pode reduzir o crescimento tumoral e aumentar a sensibilidade à quimioterapia ^{54, 55}.

A endotelina 1 está envolvida na interface óssea e seus receptores estão superexpressos no CaP, apresentando correlação com estágio e grau do tumor. O seu bloqueio pode impedir a interação tumor-estroma nas metástases ^{56, 57}. Um estudo de fase II com o atrasentan, que bloqueia o receptor da endotelina A mostrou aumento no tempo para progressão tumoral em pacientes com CaP resistente a castração ⁵⁸.

Nos últimos anos ganhou força o uso de moléculas com alvos específicos nas vias de síntese e ação do andrógeno, bem como no seu receptor. A abiraterona é um inibidor do citocromo P17, responsável pela biossíntese de esteroides que promove queda de testosterona circulante a níveis indetectáveis em pacientes que já sofreram castração ⁴¹.

A internalização do RA é passo fundamental para sua atuação no núcleo e essa translocação e ligação com o DNA pode ser bloqueada pela enzalutamida. Essa droga promove aumento médio na sobrevida para os pacientes em 5 meses

quando comparado ao placebo. O grupo tratado também teve melhores respostas em relação a qualidade de vida, progressão de PSA, sobrevida livre de progressão e de eventos ósseos ^{36, 42, 59, 60}.

Estudos iniciais com uma abordagem aos eventos epigenéticos no CaP metastático não mostraram resultados satisfatórios. O vorinostat é um inibidor da acetilação das histonas e mostrou resultados promissores *in vivo* e em modelos animais ⁶¹. Trata-se de uma droga já aprovada para uso em linfoma de células T, que não apresentou resposta em um estudo como segunda linha de tratamento em pacientes com CaP resistentes a castração ⁶². Uma nova droga, o panobinostat, está em estudo para uso associado a docetaxel como primeira linha em pacientes resistentes à castração ⁶³.

Um estudo de fase II nos pacientes com doença metastática e resistente a castração com um inibidor de polimerase associada a aberrações no DNA, o Olaparib, mostrou resposta na regressão das lesões e queda do PSA em 88% dos pacientes, principalmente nos pacientes com mutação no BRCA2. A droga já havia sido aprovada para uso em câncer de ovário associado a mutações no BRCA1/2. ⁶⁴

Apesar desses avanços na terapia do câncer de próstata metastático, nesse estágio ele é incurável, e nos melhores cenários os ganhos em sobrevida e qualidade de vida ainda são discretos. Os estudos da biologia molecular no câncer permitiram compreender melhor a regulação dos genes envolvidos na oncogênese proporcionando novas perspectivas de ação nas vias responsáveis pelo surgimento e progressão tumoral.

1.3 A biologia molecular do câncer de próstata

A prevalência do CaP difere entre grupos étnicos, sendo os negros mais (137:100.000) e os asiáticos menos (<10:100.000) acometidos pela doença ⁶⁵, sugerindo fortemente um papel de predisposição genética. Estudos com gêmeos mostram que o papel da hereditariedade no desenvolvimento do CaP é maior do que em outras neoplasias ⁶⁶. Enquanto a hereditariedade corresponde a 56% do

risco, os fatores ambientais são os responsáveis pelos 44% restantes e as mudanças nos hábitos de vida e exposições ambientais têm promovido um aumento na incidência da doença nos países asiáticos incluindo o Japão ⁶⁷.

Os primeiros agregados familiares foram identificados por Morganti e colaboradores em 1956. Porém apenas em 1996 Smith e colaboradores encontraram o primeiro gene localizado no cromossomo 1q24-25, denominado *HPC1* (*Hereditary Prostate Cancer 1*) ⁶⁸. O gene relacionado a esse *loci* foi posteriormente clonado e trata-se de *RNASEL* (RNAaseL 2'-5'-oligoadenilato (2-5A)-dependente), um candidato a gene supressor, inibidor de proliferação e indutor de apoptose através da via regulada pelo interferon ⁶⁹. Outros dois *loci* importantes foram identificados neste cromossomo, o 1q42.2-43, denominado *PCAP* (*Predisposing for ProstateCancer*) ^{70, 71}, e o 1p36 *CAPB* (*Cancer, Prostate and Brain*). Outras análises de ligação mostram anormalidades nos *loci* 16q23.2, 17p (*HPC2 – Hereditary Prostate Cancer 2*), 20q13 (*HPC20*), 8p22 (*MSR1*) e Xq27-28 (*HPCX*). Mutações no gene *BRCA2*, relacionado ao desenvolvimento do câncer de mama, parecem ter papel importante no desenvolvimento do CaP, principalmente em indivíduos jovens ^{64, 72}.

Recentemente, pesquisadores mapearam mais de 200 genes na região 17q21 em 94 homens não aparentados, mas pertencentes a famílias com mais homens afetados pela doença com uma idade média inferior a 65 anos. Neste estudo identificaram uma mutação rara, mas recorrente no gene *HOXB13*. Este gene faz parte de uma subfamília da superfamília homeobox de fatores de transcrição. A mutação G84E em *HOXB13* (rs138213197) foi identificada em probandos de quatro famílias com história de CaP. Análises caso-controle adicionais revelaram que esta variante se mostrou associada ao aumento no risco do desenvolvimento do CaP hereditário ⁷³.

Apesar de se acreditar que a hereditariedade tenha um papel importante no câncer de próstata, todas as análises de associação têm-se mostrado fracas e não reprodutíveis em diferentes populações. Especula-se que esta dificuldade na identificação de genes de susceptibilidade de alta penetrância se deva ao início tardio da neoplasia, que torna difícil a identificação do acometimento em mais de

duas gerações sucessivas, e a alta incidência do tumor, que pode considerar fenocópias como segregações familiares. Outra dificuldade é a ausência de diferenças fenotípicas entre os carcinomas hereditários e esporádicos.

O uso recente das plataformas de análise de genes em larga escala (GWAS) identificou polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) em várias regiões cromossômicas relacionados a susceptibilidade ao desenvolvimento do CaP. Alterações nos genes envolvidos no metabolismo da testosterona e na via do andrógeno são as mais provavelmente envolvidas na predisposição à doença ⁷⁴.

Estudos caso-controle têm associado polimorfismos na *5 α -esteroide redutase 2*, *citocromo p-450 17 α* e *3- β -hidroxiesteroidedesidrogenase* com o risco de desenvolvimento da neoplasia, assim como polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de carcinógenos ambientais como a glutatona S-transferase T1 (*GSTT1*) e a n-acetiltransferase 2 (*NAT2*). Mais recentemente, Liu e colaboradores realizaram uma meta-análise combinando dados de estudos GWAS e estudos caso-controle que foram realizados na grande maioria na América do Norte e Europa, e encontraram 31 SNPs em 14 *loci* de risco independentes, que foram classificados como sendo impactantes na susceptibilidade do CaP e considerados relevantes para a saúde pública mundial ⁷⁵.

1.3.1 Alterações genéticas somáticas no câncer de próstata

O câncer de próstata apresenta uma série de anormalidades, como mutações, deleções, amplificações gênicas, translocações cromossômicas e alterações de metilação, que se acumulam e podem estar presentes em um fenótipo normal. A metilação do gene *GSTP1* é observada desde a neoplasia intraepitelial prostática e ocorre em mais de 90% dos carcinomas⁷⁶. Um evento precoce no desenvolvimento da neoplasia é a reativação da telomerase, fundamental para que ocorra a imortalização das células tumorais ⁷⁷.

A fusão do gene *TMPRSS2* regulado pelo andrógeno e genes da família de fatores de transcrição *ETS* é uma das alterações genéticas mais frequentes no CaP,

detectada entre 50 a 80% dos casos, contribui na evolução de PIN para o carcinoma invasivo através da desregulação de expressão de genes envolvidos na invasão⁷⁸. Anormalidades de outros oncogenes, embora frequentemente presentes, ocorrem tardiamente na progressão da doença, em geral já no estágio de resistência a castração. O *CMYC* é um gene localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q24) e codifica uma proteína envolvida no crescimento, diferenciação e apoptose. Encontra-se amplificado no CaP, principalmente nos tumores metastáticos e resistentes a castração. A amplificação do gene *BCL2* com ação antiapoptótica está relacionada a doença metastática e hormônio-independente⁷⁹. A mutação do gene *KRAS* é um evento raro e tardio no CaP⁸⁰. Outros oncogenes também têm sido descritos, porém com papel limitado na progressão do tumor como *MDM2*⁸¹ e *HER2/neu*⁸². Do mesmo modo, genes supressores de tumor estão alterados nas fases avançadas da doença como *P53*^{81, 83, 84}, *PTEN*⁸⁵ e *RB*⁸⁶. O gene homeobox *NKX3.1* localizado no braço curto do cromossomo 8 (8p21) é específico da próstata e regulado pelo andrógeno, sua expressão é essencial para o desenvolvimento da próstata normal. Tem sido descrito como um gene supressor de tumor e a diminuição da sua expressão já foi detectada na PIN e no câncer invasivo⁸⁷.

1.3.2 Biologia molecular nas metástases ósseas por câncer de próstata

A adesão de uma célula tumoral circulante ao sítio ósseo depende de sua interação entre moléculas transmembrana, sendo a principal a classe das integrinas. Nas células tumorais as integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ apresentam maior afinidade pela matriz óssea. Essa matriz por sua vez pode liberar substâncias quimiotáticas como a citocina *CXCL12*, que quando interage com o receptor na célula tumoral propicia adesão e invasão por meio da *MMP9*. Após a adesão e invasão, as células tumorais estimulam a diferenciação de osteoclastos via interação entre o receptor e ligante *RANK-RANKL*. A ativação dos osteoclastos induz a reabsorção óssea, o que gera liberação de diversos fatores de crescimento como *TGF- β* , endotelina-1, *FGF*, *PDGF*, *IGF* e as *BMPs* que promovem a ativação

de osteoblastos levando a formação de lesões osteoblásticas. Esse é o tipo de lesão mais comum nas metástases ósseas e apesar de ser causada por neoformação óssea, esse osso neoformado não possui estrutura lamelar normal, e associado a um aumento da atividade osteoclástica, predispõe aos eventos ósseos ^{88, 89}.

O excelente e elegante estudo sobre a história natural do câncer de próstata metastático, conduzido recentemente por Gundem e colaboradores apresentou novos aspectos do comportamento das metástases. Realizando “whole-genome sequencing” (WGS) de tumores primários, metastáticos sensíveis e resistentes à castração, a primeira e mais importante descoberta foi que as metástases, embora originadas de uma única célula com esse potencial na próstata, são policlonais, heterogêneas e podem ser provenientes, além do tumor primário, de outros sítios de metástases. Outro achado interessante foi que as mutações mais precoces, até mesmo antes da disseminação, ocorrem em genes supressores tumorais como o *P53* e o *RB1*. Demonstraram, ainda, que a primeira alteração no receptor de andrógeno, em resposta à terapia anti-androgênica, foi o aumento de expressão de seu receptor e não alteração de sua sensibilidade ⁹⁰.

1.4 Os microRNAs

Os miRNAs formam um grupo de moléculas pequenas de RNA sintetizados pela RNA polimerase II, que contém entre 19 a 25 nucleotídeos não codificantes de proteína, com ação fundamental na regulação da expressão dos genes ⁹¹.

Até setembro de 2015, 1881 precursores e 2588 miRNAs maduros haviam sido identificados (<http://www.mirbase.org>). Os miRNAs são responsáveis pela regulação de processos fundamentais da célula, como a proliferação, diferenciação, resposta ao estresse e apoptose. Estão localizados nas regiões intergênicas, assim como em íntrons, e podem fazer parte da fita codificante ou não codificante do DNA. Metade dos miRNAs situam-se nos chamados sítios frágeis do genoma, cujas anormalidades estão associadas ao câncer. As alterações da biogênese e expressão dos miRNAs são similares àsquelas descritas nos processos

carcinogénicos e resultam em irregularidades nos níveis de expressão tanto de genes supressores de tumor como de oncogenes ⁹².

1.4.1 Os microRNAs no câncer

A primeira descrição da participação do miRNA no câncer foi publicada por Calin e colaboradores no laboratório de Carlo Croce, onde se observou uma relação entre a perda do braço longo do cromossomo 13, onde se localizam os miR-15a e miR-16, com o desenvolvimento da leucemia de células B ⁹³. Esses dois miRNAs tem como alvo o RNA mensageiro (mRNA) do BCL2, um importante inibidor da apoptose relacionado com o desenvolvimento do linfoma e leucemia de células B.

Posteriormente demonstrou-se que o perfil de expressão de miRNAs tem maior acurácia na classificação dos tumores do que o mRNA devido ao seu envolvimento com os processos de diferenciação celular ⁹⁴.

De um modo geral os miRNAs podem ser classificados como supressores tumorais (tsmiRs) ou como oncogênicos (oncomiRs), havendo, no entanto, muitos que têm ações diferentes em diferentes tecidos ou durante diferentes estágios de determinada neoplasia. Esses miRNAs são denominados de “contexto-dependentes”.

Alguns estudos usando miRNAs para tratamento de tumores têm sido realizados em modelos animais. A aplicação local ou endovenosa de miRNAs supressores tumorais promove a apoptose, reduz o crescimento celular e a invasão além de sensibilizar o tumor às drogas citotóxicas e ao sistema imune ⁹⁵.

Após a identificação da superexpressão de diferentes miRNAs no câncer de pâncreas, Pramanik e colaboradores injetaram miR-143/145 e miR-34a na veia caudal de camundongos, observando redução significativa do crescimento tumoral e áreas de necrose confluyente nos grupos tratados quando comparados com os controles⁹⁶.

Alguns ensaios clínicos utilizando miRNA no tratamento de doenças em humanos já foram publicados ou estão em andamento como o anti-miR-122 (Miravirsen) utilizado para o tratamento da hepatite C ⁹⁷.

Um estudo de fase 1 de uma companhia denominada *MiRNA Therapeutics* está em andamento utilizando o miR-34 (MRX34) para o tratamento de carcinoma hepatocelular, carcinoma de pequenas células do pulmão, melanoma, linfomas e leucemias (NCT01829971). Essa mesma empresa está estudando também os miRNA 101, 215, let7 e 16 em fase pré-clínica, sem dados disponíveis no momento (www.clinicaltrials.gov).

1.4.2 Os miRNAs no câncer de próstata

Os primeiros estudos de miRNA em câncer de próstata tiveram início com Porá a e colaboradores em 2007. Esses autores publicaram os resultados de um estudo de expressão de miRNA por técnica de *microarray* utilizando um pequeno número de espécimes clínicos demonstrando subexpressão de 37 miRNAs e superexpressão de 14, correlacionando este perfil de expressão ao fenótipo resistente a castração ⁹⁸. Posteriormente, o miR-125b e 32 foram descritos como oncogênicos e o papel supressor do miR-15a e 16-1 também foi confirmado na próstata ⁹⁹⁻¹⁰¹. Os miR-221 e 222 mostraram-se superexpressos em linhagens de câncer de próstata resistente a castração em estudo publicado por Sun e colaboradores, sendo que a inibição dos mesmos com anti-miR restaurou a sensibilidade das células tumorais ao bloqueio hormonal, vislumbrando uma nova possibilidade terapêutica ¹⁰².

Nosso grupo estudou a expressão de miRNAs relacionados ao câncer em vários estádios do desenvolvimento da neoplasia desde o PIN até o câncer metastático e demonstrou uma perda da expressão de miRNAs 16, 25, 146 e 191 entre o PIN e o câncer localizado e de miR-let7c, miR-100, e miR-218 na transição entre o CaP localizado e o carcinoma metastático ^{103, 104}.

Confirmou-se em estudo experimental *in vitro* utilizando as linhagem DU145 e PC3 que *THAP2*, *SMARCA5* e *BAZ2A* são alvos do miR-100 com diminuição significativa da expressão dos mesmos após a adição do miRNA ¹⁰⁵.

Dado interessante e contraditório é o fato de que apesar da perda da expressão do miR-100 durante o processo de progressão do CaP, observamos uma relação independente entre recidiva bioquímica pós prostatectomia e altos valores de miR-100 ¹⁰⁶.

Posteriormente, utilizou-se a técnica de *microarray* e *genome-wide association* (GWA) para estudo de espécimes de prostatectomia radical e identificamos expressão diferenciada de miRNAs relacionada a recidiva bioquímica. Observamos uma subexpressão de miR-129, 145, 340 e 16 e superexpressão de miR 21, 373, 1238, 370, 181c em pacientes com recidiva bioquímica pós prostatectomia, sendo que alguns desses miRNAs associam-se com fatores prognósticos desfavoráveis e recidiva bioquímica. Validamos, utilizando PCR em tempo real (RT-PCR), a superexpressão de miR-21 como marcador de agressividade, demonstrando em estudos *in vitro* o seu controle sobre *RECK*, alterando a capacidade de invasão das células tumorais¹⁰⁷.

Também em nosso laboratório, Reis e colaboradores demonstraram que o miR 21 tem como alvo *RECK*, um inibidor da metaloproteinase 9 (*MMP9*), envolvida no processo de invasão sugerindo que a superexpressão de miR 21 estaria relacionada a um pior prognóstico no CaP ¹⁰⁸.

Um passo fundamental na oncogênese é a transição epitélio-mesênquimal (TEM), onde as células adquirem características mesênquimais para o processo de invasão tecidual e metastatização. Esse processo é regulado de forma complexa pelos miRNAs, principalmente pela família do mir 200, como verificamos no estudo publicado por Katz e colaboradores ¹⁰⁹.

Estudos usando miRNAs como estratégia de tratamento do CaP são escassos e se iniciaram recentemente. Estudos *in vitro* utilizando miR 34a demonstraram parada no ciclo celular, indução da apoptose e redução a resistência a droga camptotecina ^{110, 111}. Mercatelli e colaboradores, em 2008, utilizando modelo de camundongo com xenoenxerto de câncer de próstata agressivo

demonstraram redução da dimensão da neoplasia após injeção subcutânea de anti-miR-221/222¹¹².

1.5 Modelos experimentais em CaP

Os modelos experimentais em CaP envolvem atualmente animais mutados com algum grau de deficiência do sistema imune, podendo ser completamente desprovidos de imunidade ou parcialmente como os NUDE, que não possuem timo e, portanto, não apresentam células T. Os animais NUDE foram descobertos em 1962, no laboratório de virologia de Glasgow e apresentam uma deleção espontânea no gene *FOXP1*, humanos com essa mutação também são atímicos e imunodeficientes. Animais *knockout* para esse gene também apresentam esse fenótipo. Nesses animais, a resposta imunológica adaptativa não desenvolve resposta mediada por células T, CD4 e CD8 e por isso não exibem reação de hipersensibilidade, resposta a infecção viral e produção de anticorpos mediados por células T CD4. Assim, não apresentam rejeição aos enxertos, a chamada resposta enxerto versus hospedeiro. Embora essas deficiências sejam ideais ao modelo de metástases, isso leva a uma grande suscetibilidade desses animais a infecção e óbito^{113, 114}.

Esses animais podem receber um xenoenxerto proveniente de tecido tumoral ou células. Quando células ou tecido tumoral são inoculados no sítio primário do tumor temos o chamado modelo ortotópico; quando em outro local, heterotópico e metastático quando difuso.

A incidência de CaP é muito baixa em animais comparado com humanos, ocorrendo mais comumente em cães, sendo raro em roedores e primatas. Os cães castrados e não castrados desenvolvem CaP, sendo a maioria deles resistente à castração. Além disso não expressam PSA, diferente de modelos de xenoenxerto que podem apresentar PSA circulante devido a origem humana dos tumores¹¹⁵.

Algumas linhagens de ratos têm uma incidência aumentada como o *Lobund Wistar*¹¹⁵. O uso da metilnitrosureia (MNU) e testosterona aumenta a incidência

de câncer para 90% aos 12 meses de idade nesses animais. Esses tumores raramente metastatizam para linfonodos e pulmões e nunca para os ossos¹¹⁶.

As metástases ósseas espontâneas em animais são incomuns, sendo necessário injeção de xenoenxerto celular ou tecidual no ventrículo cardíaco esquerdo ou diretamente na tíbia e fêmur.

O modelo de injeção cardíaca intraventricular esquerda é muito vantajoso e é baseado no conceito de “semente e solo” de Paget no qual o microambiente ósseo é altamente propício ao desenvolvimento de metástases a partir de células com esse potencial. As desvantagens desse modelo são a dificuldade em se realizar a injeção intraventricular, prever se as metástases se estabelecerão, quando e como. Geralmente elas se desenvolvem nas metáfises dos ossos longos que são altamente perfundidos, com vasos sinusoidais e fenestrados com alta taxa de remodelação óssea. Além disso, nas metáfises, os vasos apresentaram curvaturas de 180° permitindo a embolização de células tumorais que ali se desenvolverão¹¹⁷.

A radiografia simples detecta grandes lesões osteolíticas, mas não lesões pequenas e muito menos as micrometástases, que são o foco de estudos de intervenção.

Para solucionar o problema da identificação de micrometástases, surgiu a possibilidade de injetar no animal células tumorais geneticamente modificadas contendo genes que codificam proteínas emissoras de fluorescência ou bioluminescência (BLI), e a utilização dos chamados sistemas de imagem *in vivo* (SIIV). O surgimento dessa técnica permitiu estudos do desenvolvimento tumoral abrindo possibilidades para a avaliação contínua da resposta tumoral à diversas intervenções.

Os estudos utilizando modelos experimentais para tratamento com miRNAs são recentes e variam conforme o modelo empregado e o tratamento aplicado. Em 2008, Mercatelli e colaboradores utilizando modelo de camundongo com xenoenxerto de câncer de próstata agressivo demonstraram redução da dimensão da neoplasia após injeção subcutânea de anti-miR-221/222¹¹².

Um modelo de CaP metastático para osso foi utilizado por Takeshita e colaboradores em 2005 sendo utilizada injeção intra-ventricular esquerda e o

sistema de imagem IVIS. Nesse modelo foi utilizado tratamento com siRNA obtendo-se resposta satisfatória com regressão tumoral significativa. O veículo utilizado para transportar o siRNA foi o atélocolágeno, um colágeno manipulado por uma empresa do Japão (*Koken®*, *Tokyo, Japan*). Esse colágeno modificado apresenta menor reação imunogênica e protege o miRNA da degradação no plasma¹¹⁸. Esse mesmo grupo repetiu o modelo em 2010 utilizando o miR-16 também com regressão tumoral, em ambos os estudos o miRNA foi injetado na veia da cauda utilizando-se atélocolágeno como veículo iniciando o tratamento no mesmo dia da injeção de células ^{110, 119}.

Os miRNAs utilizados para intervenção devem ter papel supressor tumoral, como o miR-16, entretanto também podem ser utilizados os antagonistas dos oncomiRs. Dentre os supressores tumorais ainda em investigação destaca-se o miR-145. Dentre os oncomiRs, o miR-373, que pode ser bloqueado pelo seu anti-miR. O miR-100 ainda sem papel bem definido no CaP, com resultados controversos, pode apresentar papel supressor no CaP ^{106, 120, 121}.

1.6 Justificativa

Embora tenha havido uma melhora significativa no tratamento do câncer de próstata metastático nas últimas décadas, os resultados ainda são precários com aumento de poucos meses na sobrevida, o que abre uma janela de oportunidade para o desenvolvimento de novas drogas. Com a melhor compreensão da fisiopatologia da doença, incluindo-se recentemente os miRNAs, essa é uma grande oportunidade de inovação. Com base em resultados do nosso laboratório e na necessidade de progredir na investigação, nosso objetivo é realizar estudos *in vitro* e *in vivo* usando miRNA em um modelo de câncer de próstata metastático inédito no nosso meio, com intuito de analisar o seu potencial como agente terapêutico nessa neoplasia.

2. OBJETIVOS

Objetivo primário

Estudo da ação dos miRNAs 100, 145 e anti-miR-373 no tratamento do câncer de próstata metastático em modelo animal.

Objetivos secundários

1. Reproduzir um modelo de câncer de próstata metastático em camundongos atímicos.
2. Estudar *in vitro* a capacidade de controle da expressão dos genes *mTOR*, *SMARCA5*, *KRAS*, *CMYC*, *MMP9* e *CD44*, pelos miRNAs 100, 145 e 373 em linhagens de câncer de próstata.
3. Estudar *in vitro* a ação dos miRNAs 100, 145 e 373 sobre a apoptose, proliferação, ploidia e alterações do potencial de invasão em linhagens de câncer de próstata.

3. MÉTODOS

3.1 Estudos *in vitro*

3.1.1 Linhagens celulares

As linhagens de CaP DU145 (metástase cerebral) e PC3 (metástase óssea) foram obtidas do ATCC (*American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA*) e cultivadas em DMEM e MEM respectivamente. A linhagem LNCaP (metástase linfonodal) foi gentilmente cedida pelo prof. Hernandes Faustino de Carvalho (Departamento de Biologia Celular – Unicamp) e cultivada em meio RPMI. A linhagem PC-3M-luc-C6, originada de uma linhagem do *MD Anderson Cancer Center (University of Texas/Novartis Institute for Biomedical Research)* foi adquirida da Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA, EUA) e cultivada em meio MEM suplementada com glutamina. Todas as culturas foram complementadas com 10% de soro fetal bovino e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) a 1% em frascos apropriados em estufa de cultura de células a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias e no estado de subconfluência as células foram ressuspendidas e subcultivadas em frascos adicionais (Tabela 2).

Tabela 2. Linhages celulares de CaP e suas características.

Linhagem	LNCaP	DU145	PC3 e PC3M-luc-C6
Origem (metástase)	linfonodal	cerebral	óssea
Receptor androgênico	+	–	–
Sensibilidade ao andrógeno	+	–	–
PSA	+	–	–
P53	Mutação silenciosa	Mutação	Deleção
Meio de cultura	RPMI	DMEM	MEM

3.1.2 Estudos de transfecção

A técnica usada para transfectar às células com o Pre-miR™ e o Anti-miR™ foi realizada de acordo com o ensaio Pre-miR™ miRNA *Precursor* (Ambion, Austin, TX, EUA). Os reagentes usados para este experimento estão expostos na tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados para transfecção do pré-miRNA e anti-miRNA

Reagentes	Identificação do Ensaio
Pré-miR-100	AM 17100 (Ambion)
Anti-miR-100	AM 17000 (Ambion)
Pré-miR-145	MC 11480 (Ambion)
Anti-miR-145	MH 11480 (Ambion)
Pré-miR-373	MC 10083 (Ambion)
Anti-miR-373	MH 10083 (Ambion)
Pré-miR controle negativo	AM 17110 (Ambion)
Anti-miR controle negativo	AM 17010 (Ambion)
Lipofectamine 2000	11668-027 (Invitrogen)
OPTI-MEM I	11058 (Invitrogen)

Os Pre-miR™ miR-100, 145 e 373 (5nmol), Anti-miR™ miRNA anti-miR-100, 145 e 373 (5nmol) e seus respectivos controles negativos (Ambion, EUA) foram suspensos em 100µL de água livre de nuclease para obtenção de uma solução de 50µM, e posteriormente diluídos para uma concentração de 10µM. Os Pré-miR, anti-miR e seus respectivos controles foram diluídos em 50µL de meio OPTI-MEM I em diferentes tubos em uma concentração final de 50nM. A seguir 2,5µL do agente de transfecção Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) foi diluído em 50µL de meio OPTI-MEM I em um tubo falcon. As diluições do pré-miR-100, 145 e 373, respectivos anti-miRs e do agente de transfecção foram combinadas e misturadas, e posteriormente incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente para formação do complexo de transfecção. A seguir foram dispensados 100µL do complexo de transfecção em cada poço de uma placa de cultura de 12 poços. As células em suspensão foram transferidas e semeadas na cavidade dos poços da

placa de cultura para sobreposição dos complexos de transfecção em um volume de 900µL de meio de cultura DMEM contendo 5×10^4 células/poço para realização do RT-PCR, 10^5 células/poço para ensaios de apoptose, 2×10^5 células/poço para ensaios de proliferação e ploidia e 3×10^4 células/poço para ensaios de invasão. Após 48hs o meio foi trocado para evitar toxicidade do agente de transfecção. Os experimentos foram sempre realizados em triplicata.

3.1.3 Análise de expressão dos genes pós-transfecção

Isolamento do RNA

Para extração do RNA total, utilizamos o *pellet* de células obtido após tripsinização das células. O RNA foi isolado com o kit mirVana (*Ambion, Austin, TX, EUA*) de acordo com as recomendações do fabricante. Esse kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA. Ao tubo foram adicionados 250µl do tampão de lise e 25µl do aditivo de homogeneizar e a solução foi deixada 4 min no gelo, posteriormente foi adicionado 250 µl de fenol-clorofórmio e as amostras foram vortexadas e centrifugadas na velocidade máxima (14.000 RPM) por 5 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 100%. Então a solução foi transferida para uma coluna e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. No filtro continha o RNA total que foi armazenado até o procedimento de lavagens. A solução foi transferida para uma nova coluna e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. Foram então feitas as lavagens com 700µl de *wash solution 1/3*, e duas com 500µl de *wash solution 2/3*, e nos intervalos as amostras foram centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. O filtrado foi descartado e foram adicionados 50 µl de água livre de *RNase* a 95°C no filtro para eluição do RNA. Ambos foram armazenados em freezer -20°C até serem utilizados. A concentração e pureza foram estimadas em espectrofotômetro (*Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA*) (260/280 nM).

Síntese do DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se a enzima *Multiscribe™ transcriptase* reversa e iniciadores randômicos (Applied Biosystems, Fostercity, CA, EUA), para o RNA.

O RNA total foi diluído em água livre de nuclease em volume final de 20µL. A este volume foram acrescentados 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6µL do mix de dNTPs (100 mM), 4µL do tampão da enzima (10X), 2,0µl da enzima transcriptase reversa e 8,4µl de água livre de nuclease. 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. Após o término dos ciclos o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real quantitativo

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes foram desenhados com o auxílio do programa *primer Express* (Applied Biosystems, CA, EUA) (Tabela 4), e para as reações utilizamos o termociclador ABI 7500 *fast* (Applied Biosystems, CA, EUA) no modo *standard*. Para quantificação das amostras foi utilizado o reagente TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EUA).

Tabela 4 - *Primers* utilizados para quantificação da expressão dos genes alvo

Gene	Identificação do ensaio
SMARCA5	HS00186149_m1
mTOR	HS01042424_m1
CMYC	Hs00153408_m1
KRAS	Hs00364284_g1
MMP9	Hs00234579_m1
CD44	Hs01075862_m1
B2M (controle)	Hs99999907_m1

As reações ocorreram nas seguintes concentrações: 0,5µL do *primer* específico, 5µL de *TaqMan® Universal PCR master mix* (Applied Biosystems, CA, EUA), 2,5 µL de água livre de nuclease e 2,0 µL de cDNA (concentrado em 15 ng de RNA e 10ng de miRNA).

O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ 122.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e o gene da $\beta 2$ -microglobulina (B2M) (Applied Biosystems, CA, USA) foi usado como controle endógeno da reação.

3.1.4 Análise de apoptose por citometria de fluxo

A detecção da apoptose foi realizada através da marcação da célula com a proteína anexina V através de suas propriedades de ligação aos fosfolipídios de membrana como a fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Com a morte celular a fosfatidilserina é translocada para a região externa, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina V. Como a translocação da fosfatidilserina também ocorre em processos de necrose, utilizou-se o iodeto de propídeo (PI), que cora as células necrosadas, permitindo a diferenciação dos dois processos. Para análise de apoptose as linhagens celulares foram transfectados com pré-miR-100, 145, 373 e anti-miR-100, 145, 373 e os controles negativos por 96 horas. Após o termino do tratamento as células foram ressuspensas em solução de tripsina a 37°C e em seguida a tripsina foi bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com 10% SFB. As células foram centrifugadas por 6 minutos a 2000 rpm e lavadas com tampão PBS por duas vezes. Posteriormente as células foram ressuspensas em uma concentração de 1×10^5 células em 100µl de tampão de ligação (0.1M HEPES, 140mM NaCl, 25mM CaCl₂, pH 7,4). Em seguida, foi adicionado 5µl de anexina V (FITC Anexina, B Pharmingen™ - 556547) e 5µl (50µg/ml) de PI. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 400µl da solução tampão de ligação e posteriormente foi feito a análise

pelo citômetro de fluxo. O experimento foi feito em triplicata para cada condição de exposição

Os resultados obtidos mostram a porcentagem da população de células viáveis, em necrose e apoptose. Durante a leitura, as células viáveis apresentavam-se sem nenhuma marcação. Células em apoptose apresentavam marcação positiva para anexina V e negativa para PI. Células em necrose apresentavam-se positivas para anexina V e PI, ou negativas para anexina V e positivas para PI.

3.1.5 Análise da ploidia e proliferação em citometria de fluxo

A utilização do corante fluorescente e intercalante de DNA, o iodeto de propídeo (PI), permite marcar o DNA de uma forma estequiométrica, ou seja, a quantidade de DNA é diretamente proporcional à quantidade do corante que é medida pela fluorescência emitida em um equipamento de citometria de fluxo (31). A análise de ploidia do DNA e proliferação celular nas linhagens celulares de CaP foram realizadas após o período de 96 horas de exposição destas ao miR-100, 145, 373 e anti-miR-100,145, 373 e seus controles negativos em uma concentração de 70 nM, usando $2,5 \times 10^5$ de células por poço em uma placa de 12 poços. O experimento foi feito em triplicata para cada condição de exposição. Utilizamos como controle interno, células não tumorais diploides (linfócitos humanos). Os linfócitos foram separados do sangue humano, fornecidos por voluntário saudável usando *Ficoll-Plaque* seguindo as recomendações do fabricante, posteriormente lavados com tampão PBS e contados. Os linfócitos e as células tumorais foram centrifugadas por 5 min, a 2000 rpm e ressuspendidas em 1 ml de etanol 70% por 2 horas para fixação das mesmas. Após a fixação das células o etanol foi descartado e as mesmas foram lavadas por duas vezes em tampão PBS e preparadas para marcação com PI. Em seguida foi misturado $2,5 \times 10^5$ das células tumorais a 5×10^5 de linfócitos que foram ressuspendidas em 200 μ l de solução de PI (200 μ g/ml, RNase A 20 mg/ml, triton X-100 em PBS pH 7,4) e incubadas por 15 min a 37°C. Após esse período as amostras foram filtradas com filtro de nylon 50

µm em tubo de citometria e acrescentado a este 200 µl de tampão PBS para análise em citômetro de fluxo.

A ploidia do DNA é expressa como índice de DNA (ID), isto é, a razão entre a fluorescência média do pico G0/G1 tumoral e a do pico G0/G1 da população de referência diploide (2n). Como padrão interno diploide, utilizam-se geralmente as células não malignas, linfocitárias ou fibroblásticas, misturadas na amostra tumoral analisada. O cálculo da ploidia de DNA foi realizado da seguinte maneira: média da fluorescência do canal do pico G1 células tumorais / média da fluorescência do canal do pico G1 células controle/linfócitos. Os resultados obtidos, ainda demonstram em qual período do ciclo celular as células se encontram G0/G1, S ou G2/M e os dados são apresentados em porcentagem.

A leitura e análise dos ensaios de ploidia do DNA, proliferação celular (Fase S+G2/M do ciclo celular) e apoptose foram realizadas pela Professora Dra. Cristina O Massoco Salles Gomes, utilizando o citômetro de fluxo *FACSCalibur* (*Becton Dickinson, Bedford, MA*), no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e por Rodrigo Tamura no laboratório de vetores virais do ICESP (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) - FMUSP, utilizando o citômetro *Attune Flow Cytometer* (*Thermo Scientific*). A aquisição dos dados foi realizada por meio do programa *CellQuestPro* e o *Attune cytometric* software. A análise dos dados de fluorescência e das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular, ploidia celular e apoptose foi realizada através do programa *Flowjo* (TreeStar) versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (TreeStar).

3.1.6 Ensaios de invasão

Os ensaios de invasão foram realizados em câmaras *BioCoat Matrigel Invasion Chamber* (*Becton Dickinson, Bedford, MA*) que contém poros de 8µm, revestidas por Matrigel (*BD Biosciences, San Jose, CA, EUA*). O método de transfecção foi o mesmo descrito acima. As células DU145 e PC-3M-luc-C6 pós transfecção foram tripsinizadas e plaqueadas (12×10^4 células /câmara) com meio

livre de soro no compartimento superior da câmara, contendo ou não os miRNAs 100, 145 e 373 e seus anti-miRNA. O compartimento inferior foi preenchido com meio que continha 10% de soro fetal bovino, que é usado como quimioatrativo. As células foram incubadas durante 48h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após a incubação, as células que não invadiram foram removidas a partir da superfície superior da membrana usando um cotonete. As câmaras contendo as células foram então fixadas utilizando paraformaldeído e coradas com cristal violeta 0,2%. As células que migraram foram então quantificadas em 9 campos sob microscopia, com uma ampliação de 200x para determinar o número de células e colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2 Análise estatística

Para calcular a diferença de expressão dos genes-alvo, da apoptose, ploidia, proliferação e invasão nas linhagens celulares após exposição aos miRNAs, seus anti-miRNAs comparando com os controles negativos, utilizamos o Teste *t* de *Student* para os dados paramétricos e o teste de *Mann-Whitney* para os dados não paramétricos. O teste de *Kolmogorov - Smirnov* foi utilizado para definir os dados paramétricos e os não-paramétricos. Nos animais, o crescimento tumoral foi analisado pelo Teste *t* de *Student* comparando tratados e controles em cada dia do estudo. As análises foram realizadas separadamente para os valores absolutos da bioluminescência e para os valores normalizados pelo dia pré-tratamento segundo a formula $BLI\ D(X)/BLI\ D21$ (Onde BLI é bioluminescência, X representa qualquer dia do experimento e o D21 como base sendo o dia da primeira dose do tratamento). Utilizamos o software SPSS versão 19.0 (*IBM Corp. Armonk, NY*) com um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

3.3 Estudos *in vivo*

A célula PC-3M-luc-C6 é uma linhagem celular derivada de metástase óssea humana obtida de um paciente no *MD Anderson Cancer Center*, transfectada com o gene *Luciferase* do vaga-lume (Firefly) espécie *Photinus pyralis* da América do Norte utilizando um plasmídeo, no caso o pGL3. Essa linhagem serve para modelos *in vivo* de tumores subcutâneos, intravenosos e intra-cardíacos. Os tumores se desenvolvem em modelos atômicos em praticamente 100% em 21 dias e a emissão de luz ocorre em 150-250 fótons/seg/célula. As células foram testadas *in vitro* previamente ao uso *in vivo* (Figura 1).

Figura 1 - Demonstração da eficiência da emissão de bioluminescência pela linhagem PC-3M-luc-C6 *in vitro* (A) teste *in vitro*, em triplicata, realizado antes da injeção de luciferina para verificação da atividade da luciferase (B) Injeção correta intraventricular esquerda demonstrando a circulação sistêmica das células tumorais (C). Injeção incorreta, perfurando septo e alcançando ventrículo direito demonstrando a permanência das células tumorais na circulação pulmonar.

3.3.1 Estabelecimento do modelo animal de câncer de próstata metastático

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da FMUSP sob o número 0053/13. Camundongos machos Balb/c atímicos de 9 a 11 semanas foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e 3 dias antes do início do experimento foram ambientados na área de experimentação e exame de imagem.

As técnicas descritas na literatura referentes a esse modelo de doença metastática foram iniciadas nos animais pilotos, demonstrando-se ineficientes. Desenvolvemos então uma nova técnica esquematizada na Figura 2 e descrita em detalhes.

Figura 2 - Técnica de injeção intra-cardíaca. (A) Utilizando agulha 30G injetamos $2 \cdot 10^6$ células abaixo do terceiro espaço intercostal esquerdo angulado em 45° apontando para o ombro direito. (B) Imagem axial da localização do VE para punção. (C) Angulação de 15° da agulha com o plano horizontal.

Para a injeção das células tumorais no ventrículo esquerdo (VE), os animais foram anestesiados com ketamina 50-70µl e lidocaína intra-peritoneal. Após sedação profunda, porém com respiração espontânea, os animais foram testados para qualquer sensibilidade à dor e quando ela estava abolida os animais foram posicionados em decúbito dorsal com as patas imobilizadas. Utilizamos paramentação estéril e anti-sepsia do tórax do animal com álcool 70%.

A injeção foi feita com seringa de 1ml com agulha 30G, 6mm (BD®) com 100µl de uma solução de Dulbecco's PBS estéril contendo 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6. Após aspiração das células uma bolha de ar foi aspirada para manter uma pressão levemente negativa dentro da seringa.

A punção foi realizada no 3º/4º espaço intercostal esquerdo, 3 mm lateral ao esterno, com uma inclinação de 15 graus em relação ao plano horizontal com a agulha, apontando para o ombro direito do animal. Pode-se utilizar a prega inferior da pata anterior esquerda como referência, o nível da punção deve ser 2mm abaixo dessa prega.

Após a punção, a agulha foi avançada lentamente até a perfuração do VE e o acesso a sua cavidade, porém sem ultrapassá-la. O sucesso da punção foi alcançado quando um jato contínuo de sangue arterial foi visualizado no interior da seringa (devido à pressão arterial positiva e a pressão negativa dentro da seringa devido aspiração da bolha de ar). Isso ocorre com a progressão de aproximadamente 5mm da agulha. Nesse momento injeta-se lentamente 50µl do volume e após 3 segundos mais 50µl com o cuidado de nunca injetar a bolha de ar. Retiramos a agulha e realizamos uma leve compressão no tórax observando a frequência cardíaca, respiratória e estado geral do animal.

Imediatamente após a aplicação das células, injetamos por via intra-peritoneal o substrato da luciferase, a D-luciferina (Promega) na dose de 5 mg/Kg para primeira imagem *in vivo* IVIS (*Xenogen - IVIS® Spectrum*) 5-10 minutos após a injeção ventricular. As imagens analisadas servem para confirmar a eficiência da injeção, sendo considerados válidos apenas os animais que apresentam bioluminescência em todo o corpo (> 90% de superfície corpórea) (Figura 1). Os animais validados são então examinados pelo sistema IVIS semanalmente, sendo

considerado D0 o dia da injeção ventricular. O aparecimento de metástases ocorre por volta da terceira semana (D21) e quando confirmada a presença de metástases o animal é submetido ao tratamento.

Para preparação do complexo miRNA e atelocolágeno, um volume igual de atelocolágeno (0,1% em PBS, pH 7,4) e solução de miRNA foram combinados e mantidos em rotação por 1 h a 4°C, sendo a concentração final de atelocolágeno de 0,05% ¹²³. Nos dias 21, 24 e 27 após a injeção das células tumorais 200µl de volume constituído por 56µg de miRNA complexado com atelocolágeno foram injetados na veia caudal dos animais, conforme protocolo abaixo.

3.3.2 Tratamento sistêmico dos animais com a solução miRNA/atelocolágeno

Micro RNA – Solução estoque

- Água estéril livre de nuclease
- 250nM de miRNA + 100µl de água = Solução de 2,5mM (Estoque 1)
- 40µl de solução de Estoque 1 + 160 µl de água = Solução de 200µl a 500µM (Estoque 2 – de trabalho)

MicroRNA com atelocolágeno

Utilizamos uma solução de 20µM de miRNA para um volume final de 200µl (100µl de atelocolágeno + 100µl de miRNA em tampão 1x) – Corresponde a dose de 3mg/Kg para animal de 20g (conforme bula Ambion), ou 56µg de miR ou 4nmol por dose ¹¹⁰. O preparo foi realizado com 8 µl de miR (estoque 2) + 92µl de tampão 1x (tampão 10x + água em relação 1/9) =100µl. O produto final é constituído por 100µl de miRNA (20nM) mais tampão e 100µl de atelocolágeno que são mantidos em rotação de 4 rpm por 20 min a 4°C (Figura 3).

Figura 3 - Protocolo de preparo do complexo miRNA/atelocolágeno para injeção na veia da cauda.

A solução é injetada lentamente na veia da cauda que é previamente aquecida com água a 39°C. Realizamos 3 doses do tratamento com intervalo de 3 dias, ou seja, no D21, D24 e D27. Antes de cada injeção de miRNA e nos dias 34, 42 e 48 os animais foram novamente examinados pelo sistema de imagem.

Os fótons provenientes da *firefly luciferase* foram contados como descrito anteriormente pelo sistema IVIS ¹¹⁹. Essa variável foi comparada entre os grupos para cada dia analisado usando o teste estástico descrito acima. No dia 48, após o último exame em sistema de imagem os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos examinados macroscopicamente. Cortes representativos dos tecidos foram fixados em formol 10%, processados rotineiramente, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina e eosina para exame microscópico conforme esquema abaixo (Figura 4). Os grupos foram formados conforme a tabela 5, com proposta mínima de 6 animais em cada grupo.

Figura 4 - Esquematização do tratamento dos animais com miRNAs e seu acompanhamento durante o estudo.

Tabela 5 - Grupos de animais.

Grupo	Intervenção	Número
Controle Negativo	Injeção de atelocolágeno + <i>scrambled</i> miRNA	6
Tratamento miR-145	Injeção de atelocolágeno + miR-145	6
Tratamento anti-miR-373	Injeção de atelocolágeno + anti-miR- 373	6
Tratamento miR-100	Injeção de atelocolágeno + miR-100	6
Tratamento anti-miR-100	Injeção de atelocolágeno + anti-miR-100	6

4. RESULTADOS

4.1 Estudos *in vitro*

4.1.1 Apoptose

A cisplatina foi utilizada para indução de apoptose nas células do grupo controle na concentração de 25µM por poço por 48hs como previamente descrito¹²⁴. Após 96hs da transfecção, realizamos citometria de e analisamos a apoptose total, que é a soma da porcentagem da apoptose precoce com apoptose tardia. Os dados estão expostos na tabela 6 e figura 5.

O miR-100 reduziu a apoptose em 65% ($p=0,04$) na linhagem DU145 quando comparado com o controle, porém na LNCaP, o miR-100 apresentou um comportamento oposto, aumentando apoptose em 20% em relação ao controle ($p=0,02$). Na PC3 não houve alteração nos índices de apoptose pós transfecção de miR-100.

O anti-miR-100 foi transfectado nas três linhagens apresentando resultados significativos apenas na PC3, onde aumentou a apoptose em 14% ($p=0,02$). O miR-145 promoveu aumento da apoptose em 24% na DU145 ($p=0,01$), sem alterar os índices de apoptose na LNCaP e PC3. O anti-miR-145 não apresentou alterações nas três linhagens. O miR-373 reduziu a apoptose em 29% ($p=0,04$) na DU145 e na PC3 em 4,4% com diferença marginal ($p=0,06$) sem altera a LNCaP. O anti-miR-373 não alterou a apoptose nas três linhagens.

Tabela 6 - Porcentagem de células em apoptose total nas linhagens transfectadas. Comparação entre os miRNAs e anti-miRNAs com os controles miR negativo e anti-miR negativo respectivamente

	LNCaP	p	PC3	p	DU145	p
miR-100	85,1% (+20%)	0,02	64,72% (0%)	0,90	11,68%(-65%)	0,04
Anti-miR-100	76,35% (+3%)	0,77	70,71(+14%)	0,02	16,43% (-13%)	0,44
miR-145	74,9% (+5%)	0,65	63,16% (0%)	0,87	41,52%(+24%)	0,01
Anti-miR-145	86,5% (+17%)	0,21	66,04% (+6%)	0,24	21,16%(+12%)	0,45
miR-373	83% (+16,9%)	0,20	54,82%(-4,4%)	0,06	23,75% (-29%)	0,04
Anti-miR-373	76,3% (+3%)	0,69	67,64% (+9%)	0,30	20,20% (+7%)	0,08
miR negativo	71%		64%		33,50%	
Anti-miR negativo	73,90%		62,10%		18,86%

Figura 5 - Índice de apoptose nas três linhagens após transfecção de miR-100, anti-miR-100, miR-145, anti-miR-145, miR-373, anti-miR-373 e controles.

4.1.2 Índice de proliferação celular

Realizamos citometria de fluxo para avaliar a proliferação celular e a ploidia nas linhagens DU145 e PC3-luc-C6 quando transfectadas com os miR-100, miR-145, miR-373, anti-miR-100, anti-miR-145 e anti-miR-373 bem como os seus respectivos controles. Analisamos as fases G1, S e G2/M e consideramos em proliferação as células em fase S + G2/M. Os dados apresentados mostram as porcentagens de eventos em relação ao total de eventos registrados no citômetro quando as células são passadas no aparelho.

Na linhagem DU145 o miR-100 inibiu a proliferação quando comparado ao controle, com 39% de células em proliferação versus 48% no controle negativo, com diferença absoluta de 9% e $p < 0,01$. Não houve diferenças com relação ao anti-miR-100. Nessa linhagem celular o miR-145, o miR-373 e seus anti-miRs não apresentaram mudanças significativas no ciclo celular (Tabela 7).

Na linhagem PC3-luc-C6 o miR-100 e seu anti-miR não modificaram significativamente o ciclo celular. Nessa linhagem, o miR-145 age como supressor tumoral inibindo as fases S e G2/M de proliferação, com uma diferença absoluta de 18% em relação ao seu controle com $p = 0,01$. O anti-miR-145 não modificou os parâmetros do ciclo celular de forma significativa. O miR-373 diminuiu a proliferação celular com uma diferença absoluta de 12% em relação ao controle com $p < 0,01$. Seu anti-miR, diminuiu em 3% a proliferação ($p = 0,04$) (Tabela 8).

Tabela 7 - Porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M na linhagem DU145 transfectadas com o pré-miR-100, anti-miR-100, pré-miR-145, anti-miR-145, pré-miR-373, anti-miR-373 e controles

	%G1	%S	%G2/M	p
Pré-miR-100	62	10	29	<0,01
Pré-miR negativo	52	11	37	
Anti-miR-100	55	14	31	0,46
Anti-miR negativo	55	16	29	
Pré-miR-145	58	32	10	0,44
Pré-miR negativo	64	26	10	
Anti-miR-145	68	24	8	0,99
Anti-miR negativo	68	24	8	
Pré-miR-373	67	23	9	0,74
Pré-miR negativo	64	26	10	
Anti-miR-373	68	26	6	0,98
Anti-miR negativo	68	24	8	

Tabela 8 - Porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M na linhagem PC-3M-luc-C6 transfectadas com o pré-miR-100, anti-miR-100, pré-miR-145, anti-miR-145, pré miR-373, anti-miR-373 e controles

	%G1	%S	%G2/M	p
Pré-miR-100	67	11	22	0,36
Pré-miR negativo	74	8	18	
Anti-miR-100	73	13	14	0,35
Anti-miR negativo	76	8	15	
Pré-miR-145	75	6	19	0,01
Pré-miR negativo	57	12	30	
Anti-miR-145	65	8	26	0,06
Anti-miR negativo	62	8	29	
Pré-miR-373	69	10	20	< 0,01
Pré-miR negativo	57	12	30	
Anti-miR-373	65	7	28	0,04
Anti-miR negativo	62	8	29	

4.1.3 Ploidia do DNA

A linhagem DU145 não apresentou nenhuma alteração na ploidia do DNA quando comparamos os grupos tratados com miR-100, miR-145, miR-373 e seus anti-miRs com os controles. Na linhagem PC-3M-luc-C6, o grupo tratado com miR-100 apresentou 5,5% de células hipodiplóides e no grupo controle 3%, embora com diferença absoluta de 2,5%, a diferença relativa foi de 83% com $p=0,04$. O anti-miR-100 não promoveu alterações. O miR-145 e seu anti-miR também não alteraram a ploidia nessa linhagem. O miR-373 promoveu um aumento absoluto de 5% e relativo de 100% de células hipodiplóides em relação ao controle com $p=0,02$, seu anti-miR não promoveu alterações.

4.1.4 Expressão Gênica

miR-100

mTOR - Na linhagem DU145 a transfecção do miR-100 reduziu a expressão de *mTOR* em 27%, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,76$). Na linhagem LNCaP exposta ao miR-100 houve uma redução na expressão em 40%. A mesma linhagem exposta ao anti-miR-100 teve um aumento na expressão do *mTOR* em 83%, e quando comparamos a expressão do *mTOR* entre as células expostas ao miR-100 e as expostas ao anti-miR-100 notamos uma diferença marginal ($p=0,05$) (Tabela 9 e Figura 6). Na linhagem PC3 houve redução da expressão do *mTOR* quando comparamos o miR-100 com o anti-miR-100, porém sem significância estatística.

Tabela 9 - Expressão do gene *mTOR* nas três linhagens trasfectadas com miR-100 e anti-miR-100.

mTOR			
		Expressão média	p
DU145	miR-100	0,73	0,76
	anti miR-100	0,77	
LNCAP	miR-100	0,60	0,05
	anti miR-100	1,83	
PC3	miR-100	0,66	0,09
	anti miR-100	0,93

Figura 6 - Expressão relativa de *mTOR* nas 3 linhagens de câncer de próstata após transfecção de miR-100 e anti-miR-100

SMARCA5 - Nas linhagens DU145, LNCaP e PC3 expostas ao miR-100 houve redução estatisticamente significativa na expressão do *SMARCA5* comparado com o anti-miR (46%, $p=0,01$), (40%, $p=0,03$) e (51%, $p<0,01$) respectivamente (Tabela 10 e Figura 7).

Tabela 10- Expressão do gene *SMARCA5* nas três linhagens trasfectadas com miR-100 e anti-miR-100.

SMARCA5			
		Expressão média	p
DU145	miR-100	0,54	0,01
	anti miR-100	0,80	
LNCaP	miR-100	0,60	0,03
	anti miR-100	1,98	
PC3	miR-100	0,49	<0,01
	anti miR-100	0,97

Figura 7 - Expressão relativa de *SMARCA5* nas 3 linhagens de câncer de próstata após transfecção de miR-100 e anti-miR-100 (* $p < 0,05$).

miR-145

CMYC – A linhagem DU145 exposta ao miR-145 mostrou uma redução na expressão do CMYC (38%). A mesma linhagem exposta ao anti-miR-145 teve um aumento na expressão do CMYC (82%). Essa diferença, entretanto, não foi significativa ($p=0,08$). Na LNCAP o mesmo aconteceu, sendo que miR-145 reduziu a expressão do CMYC em 29%, enquanto que o anti-miR-145 aumentou a expressão em 15%, ($p= 0,05$). Na PC3, apesar da redução na expressão do CMYC com o miR-145, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 11 e Figura 8).

Tabela 11 -. Expressão do gene *CMYC* nas três linhagens transfectadas com miR-145

CMYC			
		Expressão média	p
DU145	miR-145	0,62	0,08
	anti miR-145	1,82	
LNCaP	miR-145	0,71	0,05
	anti miR-145	1,15	
PC3	miR-145	0,67	0,13
	anti miR-145	1,04

Figura 8 - Expressão relativa de *CMYC* nas 3 linhagens de câncer de próstata após transfecção de miR-145 e anti-miR-145

KRAS - As células DU145 expostas ao miR-145 mostraram uma redução na expressão do *KRAS* (49%), enquanto a transfecção de anti-miR-145 mostrou um aumento na expressão do *KRAS* (82%). Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,10$). Na LNCaP a redução da expressão de *KRAS* nas células

transfectadas com miR-145 foi de 57% sendo que nas células tratadas com anti-miR-145 houve aumento de 12%, a diferença entre os dois grupos foi significativa ($p=0,01$). Na PC3 a transfecção de miR-145 resultou na redução de 32% e a de anti-miR-145 em aumento de 17%, sendo que a diferença entre esses dois experimentos foi estatisticamente significativa ($p=0,01$) (Tabela 12 e Figura 9).

Tabela 12 - Expressão gênica de *KRAS* nas três linhagens transfectadas com o miR-145

KRAS			
		Expressão média	p
DU145	miR-145	0,51	0,10
	anti miR-145	1,82	
LNCaP	miR-145	0,43	0,01
	anti miR-145	1,12	
PC3	miR-145	0,68	0,01
	anti miR-145	1,17

Figura 9 - Expressão relativa de *KRAS* nas 3 linhagens de câncer de próstata após transfecção de miR-145 e anti-miR-145 (* $p<0,05$).

miR-373

MMP9 - As células DU145 expostas ao miR-373 mostraram um aumento na expressão do *MMP9* (474%). A mesma linhagem exposta ao anti-miR-373 teve uma redução na expressão do *MMP9* em 33% ($p=0,12$). Na LNCaP houve a manutenção do mesmo padrão, porém em menor escala, com aumento de 214% na expressão quando transfectada com miR-373 e redução de 31% com o anti-miR-373. Comparando miR-373 com o anti-miR não encontramos significância estatística ($p=0,41$). Na PC3 o grupo miR-373 e o grupo anti-miR-373 apresentaram expressões semelhantes com aumentos discretos 24% e 11% respectivamente, sem diferença estatística ($p=0,70$) (Tabela 13 e Figura 10).

Tabela 13 - Expressão gênica da *MMP9* nas três linhagens expostas ao miR-373 e seu anti-mir

MMP9			
		Expressão média	p
DU145	miR-373	4,74	0,12
	anti miR-373	0,67	
LNCaP	miR-373	2,14	0,41
	anti miR-373	0,69	
PC3	miR-373	1,24	0,70
	anti miR-373	1,11

Figura 10 - Expressão relativa de *MMP9* nas 3 linhagens de câncer de próstata após transfecção de miR-373 e anti-miR-373

CD44 - As células DU145 expostas tanto ao miR-373 quanto ao anti-miR-373 mostraram uma redução na expressão do *CD44* em 40% e 34% respectivamente ($p=0,82$). Na PC3, as células tratadas com miR-373 apresentaram redução de 43% ($p= 0,02$) na expressão do *CD44*, sendo que as células tratadas com anti-miR-373 não apresentaram variações na expressão (Tabela 14 e Figura 11). A linhagem LNCaP não apresentou expressão desse gene por qRT-PCR.

Tabela 14 - Expressão gênica de *CD44* nas linhagens DU145 e PC3 transfectadas com miR-373 e seu anti-miR-373.

CD44			
		Expressão média	p
DU145	miR-373	0,60	0,82
	anti miR-373	0,66	
PC3	miR-373	0,57	0,02
	anti miR-373	1,00	
LNCaP	miR e antimiR-373	0

Figura 11 - Expressão relativa de *CD44* nas 2 linhagens de câncer de próstata após transfecção de miR-373 e anti-miR-373(* $p < 0,05$)

4.1.5 Ensaio de invasão com uso de Matrigel

Nos ensaios de invasão pelo matrigel, consideramos a contagem das células que atravessam a câmara para compararmos os grupos de células transfectadas com os controles negativos.

Na linhagem DU145 o miR-100 não promoveu alteração significativa na migração de células (média de 61,7 vs 72,2 $p=0,29$). O anti-miR-100 também não alterou significativamente as taxas de migração de células (55,2 vs 79,9 $p=0,062$)

O miR-145 não promoveu alteração significativa na invasão de células (média de 85,2 vs 72,2 $p=0,12$). O anti-miR-145 também não alterou significativamente as taxas de migração de células (73,2 vs 79,9 $p=0,49$)

O miR-373 não promoveu alteração significativa na migração de células (média de 73,3 vs 72,2 $p=0,92$). O anti-miR-373 também não alterou significativamente as taxas de migração de células (66,2 vs 79,9 $p=0,10$) (Figura 12).

Figura 12 - Análise do matrigel na linhagem DU145 transfectada com o miR-100, anti-miR-100, miR-145 e anti-miR-145, miR-373, anti-miR-373 e controles.

Na linhagem PC-3M-luc-C6 o miR-100 não promoveu alteração significativa na migração de células (média de 27,2 vs 21,6 $p=0,06$). O anti-miR-100, entretanto, agiu como oncomiR e aumentou a invasão celular (40,0 vs 20,2; $p<0,01$).

O miR-145 não promoveu alteração significativa na migração de células (média de 33 vs 21,6; $p=0,11$). O anti-miR-145 agiu como oncomiR aumentando significativamente a migração celular (93,8 vs 20,2; $p<0,01$).

O miR-373 promoveu aumento significativo na migração de células (média de 48,1 vs 21,6; $p<0,01$). O anti-miR-373 não alterou significativamente as taxas de migração de células (20,9 vs 20,2 $p=0,79$) (Figura 13).

Figura 13 - Análise do matrigel na linhagem PC-3M-luc-C6 transfectada com o miR-100, anti-miR-100, miR-145, anti-miR-145, miR-373, anti-miR-373 e controles.
* $p < 0,05$

4.2 Estudos *in vivo*

4.2.1 Tratamento dos grupos de animais com miR-145, miR-100, anti-miR-100, anti-miR-373 e controles negativos

O estudo envolveu 60 animais inicialmente, dos quais 50 entraram no protocolo por apresentarem metástases ósseas difusas no 21^o pós-injeção e receberam as três doses do tratamento endovenoso na veia caudal no 21^o, 24^o e 27^o dia. Durante o curso do experimento 4 animais do grupo miR-145 não terminaram o experimento, 2 morreram durante o tratamento e 2 foram sacrificados por apresentarem dificuldade de alimentar-se perdendo muito peso. Dos 13 animais tratados com controle negativo (*scramble*), 5 animais morreram sem causa aparente antes de concluir o experimento. Os 8 animais tratados com miR-100 sobreviveram e dos 10 animais tratados com anti-100, 4 animais morreram. Dos 8 animais tratados com anti-miR-373, 2 morreram ao final do experimento.

A proposta inicial era analisar no mínimo 6 animais em cada grupo, porém, ao final do estudo conseguimos um número maior do que a proposta inicial. Assim, terminamos o estudo com 7 animais tratados com miR-145, 8 animais tratados com controle negativo (*scramble*), 8 animais tratados com miR-100, 6 animais tratados com o anti-miR-100 e 6 animais tratados com anti-miR-373, totalizando 35 animais analisados. Esses animais tiveram seus pesos analisados no início (D0), no primeiro dia do tratamento (D21) e no final do experimento (D48). A bioluminescência foi analisada semanalmente. O valor da bioluminescência também foi normalizado para o dia anterior ao início do tratamento a fim de homogeneizar os grupos, visto que dentro de cada grupo há variações significativas no desenvolvimento tumoral desde o início. A normalização foi feita dividindo-se o valor da bioluminescência do dia analisado pelo valor do dia 21 (valor imediatamente anterior ao início do tratamento) ¹²⁵.

4.2.2 Análise da variação da bioluminescência

Grupo miR-145 (n=7)

O tratamento com miR-145 promoveu uma redução na velocidade de crescimento tumoral conforme observado nas curvas temporais de comportamento da emissão de bioluminescência (Figuras 14, 15 e 16). Essa redução na velocidade de crescimento se dá a partir do início do tratamento, culminando com o maior efeito no dia 34 do experimento, ou seja, em média 7 dias após o fim do tratamento. Esse efeito é transitório e após o dia 34 o tumor volta a crescer na mesma velocidade do grupo controle e até mesmo com maior bioluminescência no fim do experimento. A figura 14 mostra as bioluminescências absolutas, esse dado é obtido a partir da média da soma de todas as lesões em cada animal do grupo, no dia 34 a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,03$). A figura 15 mostra os valores relativos ao dia 21 (início do tratamento) e cada valor representa quantas vezes o tumor aumentou a emissão de luciferase em relação ao dia 21. Nessa figura com dados normalizados (relativos ao dia 21) observa-se que os valores do grupo miR-145 sempre são inferiores ao controle negativo. No dia 34 a bioluminescência no grupo tratado é praticamente 6 vezes menor que no grupo controle e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,02$). Na figura 16 apresentamos a comparação evolutiva de dois animais que apresentavam tumores semelhantes no início sendo um tratado com o miR-145 e o outro com o controle negativo. Nessa comparação visual observa-se grande disseminação de metástases no animal controle e a manutenção da lesão inicial no tratado, ambos perdem peso, porém no animal controle essa perda foi mais pronunciada.

Figura 14 - Curvas temporais do comportamento da bioluminescência absoluta para os grupos miR-145 e controle negativo (CN), obtido pela média da soma de todas as lesões de cada grupo. Dados em fótons/segundo (* $p < 0,05$).

Figura 15 - Curvas temporais do comportamento da bioluminescência relativa para os grupos miR-145 e controle negativo (CN). Dados normalizados (pós-tratamento/pré-tratamento) (* $p < 0,05$).

Figura 16 - Camundongos nude (Balb/c) injetados com 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6 no ventrículo esquerdo no D0. O tratamento foi feito 50 μ g de miR-145 com atelocolágeno ou 50 μ g de miR controle negativo com atelocolágeno nos dias 21, 24 e 27. A melhor resposta foi observada no dia 34. No dia 48 os animais foram sacrificados e submetidos à necropsia.

Grupo miR-100 (n=8) e anti-miR-100 (n=6)

Na análise da bioluminescência absoluta (sem normalização), o tratamento com miR-100 praticamente não alterou o curso da progressão do tumor quando comparado ao controle. Entretanto o tratamento com o anti-miR-100 promoveu uma redução na velocidade de crescimento tumoral a partir do dia 21 com nadir no dia 27. Porém em nenhum dos dias foi alcançada diferença com significância estatística (Figura 17). O comportamento das curvas muda quando são analisadas com a normalização já descrita. Como observado na figura 18, o miR-100 promove uma redução na velocidade de crescimento a partir do dia 21 quando comparado ao controle e a partir do dia 27 quando comparado ao anti-miR-100, com maior diferença no final do experimento, porém sem diferença estatística ($p=0,23$). Utilizando dois animais como modelo, está demonstrada na figura 19 a evolução dos tumores em um animal tratado com miR-100 e outro com anti-miR-100 onde se observa uma disseminação mais agressiva no animal tratado com o anti-miR-100 no final do experimento.

Figura 17 - Curvas temporais do comportamento da bioluminescência absoluta para os grupos miR-100, anti-miR-100 e controle negativo (CN), obtido pela média da soma de todas as lesões de cada grupo. Dados em fótons/segundo.

Figura 18 - Curvas temporais do comportamento da bioluminescência relativa para os grupos miR-100, anti-miR-100 e controle negativo (CN). Dados normalizados (pós-tratamento/pré-tratamento).

Figura 19 - Camundongos nude (Balb/c) injetados com 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6 no ventrículo esquerdo no D0. Tratamento feito com 50 μ g de miR-100 com atelocolágeno ou 50 μ g de anti-miR-100 com atelocolágeno nos dias 21, 24 e 27. No dia 48 os animais foram sacrificados e submetidos à necropsia.

Grupo anti-miR-373 (n=6)

O tratamento com anti-miR-373 não alterou significativamente a velocidade de crescimento tumoral conforme observado nas curvas temporais de comportamento da emissão de bioluminescência (Figuras 20, 21 e 22). Observamos uma tendência a diminuição da velocidade de crescimento na curva dos animais tratados após o dia 34, porém sem diferença estatística. A figura 20 mostra as bioluminescências absolutas e a figura 21 mostra os valores relativos ao dia 21 (início do tratamento). Na figura 22 apresentamos a comparação evolutiva de dois animais que apresentavam tumores semelhantes no início, sendo um tratado com o anti-miR-373 e o outro com o controle negativo. Esse animal apresentou uma resposta satisfatória com regressão do tumor em mandíbula e tórax, porém esse não foi o padrão observado em todos animais do grupo e na média não encontramos diferença significativa.

Figura 20 - Curvas temporais do comportamento da bioluminescência absoluta para os grupos anti-miR-373 e controle negativo (CN), obtido pela média da soma de todas as lesões de cada grupo. Dados em fótons/segundo (* $p < 0,05$).

Figura 21 - Curvas temporais do comportamento da bioluminescência relativa para os grupos anti-miR-373 e controle negativo (CN). Dados normalizados (pós-tratamento/pré-tratamento) (* $p < 0,05$).

Figura 22 - Camundongos nude (Balb/c) injetados com 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6 no ventrículo esquerdo no D0. O tratamento foi feito 50 μ g de anti-miR-373 com atelocolágeno ou 50 μ g de miR controle negativo com atelocolágeno nos dias 21, 24 e 27. No dia 48 os animais foram sacrificados e submetidos à necropsia.

4.2.3 Análise da variação do peso dos animais

O grupo miR-145 iniciou o experimento com média de peso de 19,7 gramas, e no dia 21 (pré tratamento) apresentou média de 21,3 gramas. No final do experimento o grupo apresentava peso médio de 17,7 gramas, redução de 16% do peso em relação ao dia 21, pré tratamento. O grupo controle iniciou o experimento com média de 19 gramas, no dia 21 apresentava média de 19,1 gramas e no final do experimento peso médio de 15,3 gramas, redução de 20%. O grupo miR-100 iniciou o estudo com peso médio de 20,4g e no dia pré tratamento 21,2g. No final do experimento apresentava peso médio de 16,5g, variação de 22%. O grupo anti-miR-100 apresentou pesos médios de 19g, 20,1g e 14,6g no início, dia 21 e final do experimento respectivamente, com perda de 28% do peso. Os animais do grupo anti-miR-373 iniciaram o tratamento com peso médio de 20,7g e terminaram o estudo com peso médio de 16,6g, perda de 20% do peso. A figura 23 mostra a comparação da variação do peso entre o dia pré tratamento e o final do experimento entre todos os grupos. Todos os grupos apresentaram perda de peso, porém o grupo miR-145 foi o que apresentou menor perda e o grupo anti-miR-100 o que apresentou a maior perda. Comparamos todos os grupos com o controle e as diferenças não foram estatisticamente significantes.

Figura 23 - Variação do peso médio dos animais de cada grupo estudado. A variação foi calculada entre o peso no final do experimento dividido pelo peso no dia 21 (pré-tratamento). Dados em porcentagem.

4.2.4 Análise histológica das lesões tumorais

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ no dia 48 do experimento. Imediatamente após foram submetidos à necrópsia e seus tecidos foram separados para análise. Os tecidos foram fixados em formol 10%, processados, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina e eosina para exame microscópico. Os principais órgãos analisados microscopicamente foram os ossos da bacia e membros inferiores, mandíbula, cérebro, coração, pulmões, esterno, fígado e rins.

Na figura 24 (A) observa-se a metástase em metáfise de osso longo, em região altamente vascularizada. As metástases femorais foram frequentes como observado na Figura 24 (B). As metástases pulmonares (Figura 24 C) ocorreram em animais com grande volume tumoral. Metástases hepáticas e em adrenais (Figura 24 D e E) foram menos frequentes que as ósseas e a bioluminescência é menor. Também foram encontrados implantes no musculo cardíaco (Figura 24 F).

Os animais apresentaram metástases difusas nos ossos e também em órgãos sólidos, porém não evidenciamos sinais microscópicos de toxicidade hepática, renal, cardíaca, pulmonar ou cerebral.

Figura 24 - Análise histológica de órgãos acometidos pelas metástases. (A) Metáfise de osso longo (B) Fêmur (C) Pulmão (D) Fígado (E) Adrenal (F) Miocárdio.

5. Discussão

Estudamos o papel dos miRNAS 100, 145 e 373 em linhagens celulares e em um modelo *in vivo* de CaP metastático com o propósito de melhorar o entendimento de suas funções na terapia dessa doença. Realizamos também ensaios *in vitro*, avaliando a expressão dos genes alvo desses miRNAs (mTOR, SMARCA5, CMYC, KRAS, MMP9 e CD44), apoptose, ciclo celular e ensaios de invasão pelo matrigel.

Reproduzimos com sucesso um modelo de câncer de próstata metastático em camundongos NUDE com o uso da linhagem celular originada de uma metástase óssea conjugada com o gene da luciferase para emissão de bioluminescência, a PC-3M-luc-C6. Esse modelo, pioneiro no país, apresenta um meio de se avaliar a resposta tumoral a qualquer tipo de tratamento, de forma específica, contínua, segura e com grande reprodutibilidade. Diferente de outros métodos, como medidas de volume, tomografia e até o PETscan (*positrons emission tomography*), o sistema de bioluminescência *in vivo* traduz a atividade celular tumoral visto que a luz (dada em fótons por segundo) só é emitida por células viáveis e em atividade.

Há uma diferença entre fluorescência e bioluminescência (BLI), na fluorescência a emissão de luz de uma fonte atravessa o tecido do animal, excita as células que emitem fluorescência de volta a um detector. Na BLI, a luciferina serve como substrato, que injetada via intraperitoneal, se dissemina pelo corpo do animal reagindo com as células contendo luciferase. Essa reação, exotérmica e dependente de ATP, ocorre apenas nas células tumorais viáveis, não ocorrendo em células em apoptose, senescentes ou necróticas, o que tem grande relevância clínica, pois dessa forma avaliamos em tempo real as células tumorais viáveis. Os sistemas de captação de imagem podem captar uma fotografia do animal e acoplar as imagens de BLI a topografia do corpo ou associarem-se à tomógrafos para produzir imagens com reconstrução tridimensional ¹¹⁵.

Tanto a indução do tumor quanto os tratamentos foram executados por via sistêmica, sendo que as células tumorais são inoculadas no sistema arterial via ventrículo esquerdo e o tratamento no sistema venoso por injeção na veia da cauda do camundongo. Logo, nosso objetivo foi simular os tratamentos com quimioterapia

em pacientes em um modelo altamente manipulável que simula com alta equivalência a doença em humanos.

Os resultados obtidos nos vários estudos previamente realizados pelo nosso grupo no LIM55 mostraram que diversos miRNAs tem papel na oncogênese do CaP, na transição epitélio-mesênquimal ¹⁰⁹, na recidiva bioquímica e na transição para o tumor resistente à castração ¹⁰³

Em estudos prévios o miR-100 se mostrou como um miRNA que exibe um efeito contexto dependente e talvez até tecido-dependente. Em alguns estudos foi considerado oncomiR e em outros supressor tumoral ^{104, 106}. O miR-145 destaca-se entre os miRNAs supressores tumorais em diversos tumores e com resultados prévios mostrando seu papel supressor em linhagens de CaP e modelos animais de tumores localizados, entretanto ainda não tinha sido estudado em modelos *in vivo* de doença metastática para osso ^{120, 126}. O miR-373 é um oncomiR pouco estudado até o momento que mostrou ação oncogênica em fibrossarcomas e está superexpresso em tumores de próstata de alto grau ^{121, 127}.

5.1 O papel dos miRNAs na maquinaria celular: o que os estudos *in vitro* mostraram

Nossos resultados de apoptose reforçam nossos achados prévios que miR-100 apresenta um papel contexto-dependente no CaP. Mostramos anteriormente que há uma perda de expressão de miR-100 na transição do câncer localizado para o câncer metastático o que o classificaria como supressor tumoral, resultados também encontrados em linhagens celulares ^{104, 128}.

Entretanto, em estudo com espécimes clínicos de pacientes com doença localizada, a superexpressão do miR-100 correlacionou-se com maiores taxas de recidiva bioquímica o que o classificaria como oncomiR ¹⁰⁶.

Nos ensaios de transfecção utilizando LNCaP, uma linhagem andrógeno dependente e de menor agressividade, o miR100 se comportou como supressor

tumoral, aumentando a apoptose, e na DU145, linhagem andrógeno-independente e agressiva, se comportou como oncomiR reduzindo apoptose.

Porém, analisando o ciclo celular observamos que o miR-100 inibiu a proliferação na linhagem DU145 aumentando o número de células em fase hipodiplóide e nos ensaios de invasão utilizando a linhagem PC-3M-luc-C6 o anti-miR-100 aumentou a invasão de células comparada ao controle e ao miR-100. Nesse contexto podemos considerar que miR-100 atuou como supressor tumoral.

Em resumo, analisando globalmente os estudos *in vitro* podemos considerar que o miR-100 se comprovou como contexto-dependente, se comportando como oncomiR na DU145 e como supressor tumoral na LNCaP e na PC3.

Nos estudos de expressão gênica pós-transfecção de miR-100 observamos nas três linhagens de câncer de próstata estudadas que o miR-100 inibiu mTOR (sem significância estatística) e SMARCA5, este último de forma mais pronunciada e estatisticamente significativa. O mTOR controla o crescimento e a sobrevivência celular, garantindo a oferta de nutrientes e fatores de crescimento. Está envolvido na angiogênese e frequentemente desregulado em neoplasias ¹²⁹. Uma maior expressão do mTOR está associada ao desenvolvimento e progressão de tumores incluindo o CaP ¹³⁰. O SMARCA5 está envolvido na regulação do ciclo celular, sinalização intracelular e transdução de sinais. Ele atua também na estabilidade cromossômica e sua desregulação pode levar a instabilidade e dano ao DNA ¹⁰⁵.

O miR-145, *in vitro*, apresentou um comportamento típico de supressor tumoral, inibindo os genes KRAS e CMYC nas três linhagens estudadas e induzindo a apoptose na linhagem DU145. O miR-145 está localizado no cromossomo 5, sendo induzido pelo p53, principalmente em situações de estresse celular. É descrito classicamente como um supressor em diversos tumores, como cólon, mama, pâncreas e próstata. Regula diversos genes como CMYC, KRAS, IRS-1 e ERK5 e está subexpresso em tecidos e linhagens de CaP ^{104, 120, 131, 132}

A proteína cMYC é um fator de transcrição envolvido na ativação de diversos genes e regulação de diversas funções celulares, entre elas aumento da proliferação celular, crescimento, diferenciação e apoptose ¹³³. A expressão de proteína cMYC está desregulada em aproximadamente um terço dos tumores

humanos. Sua superexpressão é especialmente evidente em adenocarcinomas de próstata resistentes à castração e em carcinomas de mama independentes do estrógeno, sendo um fator de pior prognóstico nessas neoplasias ^{134, 135}.

A proteína *KRAS* é uma GTPase, transformando GTP em GDP. O aumento nos níveis de GDP induz a inativação do *KRAS*, regulando a sua atividade. Mutações no *KRAS* reduzem sua capacidade de hidrolisar GTP em GDP, como consequência, promovem uma menor auto-inibição de sua atividade. Quando ativado, promove proliferação celular através de diversas vias, entre elas a do Cc-Raf ¹³⁶ e PI3-kinase ¹³⁷,

Em 1982 foi publicada a primeira indicação de que o *KRAS* poderia atuar como um oncogene ¹³⁸. Sabe-se que o *KRAS* é um dos oncogenes mais frequentemente ativados, apresentando-se mutado em 17 a 25% dos tumores humanos. Está mais frequentemente mutado em carcinomas de pâncreas (95%), tireóide (55%), colorretal (35%) e pulmão (35%) ¹³⁹, sendo sua ativação no CaP um evento tardio ⁸⁰.

Na citometria de fluxo, o miR-145 estimulou a apoptose na DU145 não havendo alteração nas linhagens LNCaP e PC3. Considerando DU145 como uma linhagem mais agressiva, é provável que em 96hs vejamos alterações nas linhagens com maiores taxas de proliferação, pois na LNCaP e PC3 em 96h há uma grande quantidade de células em necrose, o que pode ser um viés na avaliação da apoptose.

Também demonstramos que o miR-145 inibe a proliferação e o anti-miR-145 aumenta a invasão celular. Os dados *in vitro* são coerentes e consistentes ao demonstrar o papel supressor tumoral de miR-145 no CaP. Nossos dados são compatíveis com os da literatura que mostra que esse miRNA encontra-se sub-expresso em neoplasias da próstata e que sua reativação induz apoptose em linhagens de CaP ¹²⁰. Estudos recentes mostraram que o miR-145 sensibiliza células de câncer de próstata à radiação ^{140, 141}.

O miR-373, aumentou a expressão gênica da *MMP9* em 5 vezes na DU145 e em 2 vezes na LNCaP, embora sem significância estatística devido à heterogeneidade das amostras. O gene *MMP9* codifica uma enzima responsável

pela degradação da matriz extracelular, podendo assim ser um facilitador da invasão tumoral e do desenvolvimento de metástases. Sua expressão encontra-se aumentada em carcinomas de próstata ¹⁴². Relaciona-se com maior escore de Gleason e pior prognóstico no câncer de próstata ^{143, 144}.

Células tumorais PC3 expostas ao miR-373 tiveram uma redução significativa na expressão do gene *CD44*. O gene *CD44* codifica glicoproteínas da superfície celular relacionadas a migração celular. É importante para interações entre células e entre célula e matriz extracelular. A sua expressão está relacionada com a supressão de metástases e a sua menor expressão tem relação com metástases de cânceres de próstata mais agressivos, de pior prognóstico e com maior chance de progressão ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸.

Estudos de apoptose com o miR-373 indicaram uma redução significativa de apoptose também em células DU145, denotando o potencial oncogênico desse miRNA. Na linhagem PC3 o miR-373 reduziu a proliferação significativamente, embora o anti-miR-373 também, porém em menor escala. Ainda nessa linhagem celular o miR-373 aumentou o número de células em fase hipodiplóide e substancialmente o potencial invasivo como visto no ensaio de matrigel. O anti-miR-373 poderia suprimir a ação oncogênica do miR-373, os resultados obtidos nos estudos de expressão gênica e de apoptose apontam nessa direção.

5.2 O tratamento de animais com CaP metastático utilizando miRNAs

Após os estudos *in vitro*, iniciamos o tratamento dos animais com CaP metastático utilizando os miRNAs conjugados com o atelocolágeno conforme o protocolo de Takeshita e colaboradores ^{110, 119, 123 149}. O atelocolágeno é um colágeno modificado de derme bovina, (Koken, Tokyo, Japan) e suas extremidades antigênicas são retiradas após tratamento com pepsina. Esse processo possibilita seu uso sistêmico sem desencadear reações imunogênicas, como as mediadas pelos lipopolissacarídeos (LPS), que induzem inflamação sistêmica. O atelocolágeno possui uma estrutura linear de 300 nm de comprimento, 1,5 nm de

diâmetro e pesa 300 kDa. Quando o atelocolágeno está a baixa concentração (0.05–0.1%) seu coeficiente de viscosidade se aproxima do coeficiente sanguíneo. Essa propriedade contribui para o transporte e liberação do miRNA no tumor de disseminação hematogênica¹⁵⁰. Além disso, o atelocolágeno forma uma micela ao redor do miRNA protegendo-o da degradação no plasma sanguíneo e alguns estudos têm demonstrado uma predileção do atelocolágeno pelas células tumorais^{110, 151, 152}.

Iniciamos a padronização do modelo experimental de CaP metastático com injeção intra-cardíaca no ventrículo esquerdo da PC-3M-luc-C6. Esse foi um modelo inicialmente difícil de ser reproduzido, pois a injeção deve alcançar apenas o ventrículo esquerdo do animal, sem promover lesões que possam levar a morte do mesmo. Dentre as técnicas descritas, iniciamos pela técnica cranial de Arguello e não obtivemos sucesso pelo alto índice de perfuração miocárdica e injeções no ventrículo direito. Pela técnica subdiafragmática de Drake obtivemos sucesso parcial com 2 de 5 animais apresentando distribuição correta das células detectada pelo sistema IVIS 5 minutos após a injeção^{153, 154}.

A dificuldade do método intra-cardíaco pode ser demonstrada pelo artigo de Springer ML e colaboradores que avaliaram a relação entre o ventrículo esquerdo e a espessura das agulhas de 27 e 30G, propondo a utilização de ecocardiograma para melhor eficácia do método (Figura 25)¹⁵⁵.

Figura 25. Corte transversal de miocárdio de ratos de 6-8 semanas mostrando a relação entre a espessura do bisel das agulhas e do ventrículo esquerdo.

Considerando as dificuldades técnicas, para melhor planejamento e treinamento, iniciamos um estudo de acesso ventricular de forma aberta que foi

realizado no laboratório de fisiopatologia cardíaca da Unicamp (Universidade Estadual de Campinas), devido a experiência do grupo para procedimentos cardíacos *in vivo*.

Definimos então pelo acesso em 3º/4º espaço intercostal esquerdo, logo abaixo da prega inferior do membro anterior, com inclinação de 15º em relação ao plano horizontal, na borda do esterno direcionado para o ombro esquerdo do animal. Com esse acesso conseguimos sucesso de aproximadamente 90% no acesso ao ventrículo esquerdo de forma fechada e no momento praticamente 100% de sucesso no estabelecimento do modelo quando a injeção é feita corretamente.

O índice de óbito imediato foi de 20%, devido principalmente à indução anestésica, arritmia, edema agudo de pulmão, perfuração miocárdica, tamponamento cardíaco, pneumotórax e hemorragia torácica. Os dados de mortalidade e eficácia no início do projeto estão na tabela 15, abaixo.

Tabela 15. Taxas de sucesso e mortalidade nos diferentes tipos de acesso, durante a padronização da técnica.

Método	N	Acesso VE	Mortalidade imediata	Disseminação imediata	Sucesso (met. óssea)
Cranial (Arguello)	5	0%	20%	0%	0%
Subdiafragmatico (Drake)	5	40%	20%	20%	20%
Inter-costal esquerda	17	88%	29,5%	76,5%	59%

Em todos os trabalhos publicados que utilizam miRNAs e outras drogas nesse modelo de câncer, os tratamentos se iniciam imediatamente após a indução do tumor, e nenhum deles se inicia após o tumor ter se instalado, como no nosso modelo. Acreditamos que quando o tratamento é realizado antes das lesões surgirem configura uma terapia profilática e não terapêutica. Takeshita e colaboradores injetaram as células tumorais no dia 0 e realizam o tratamento com miRNA na veia da cauda nos dias 4, 7 e 10. Garcia e colaboradores em um estudo sobre o efeito dos inibidores da COX2 no tratamento do CaP utilizando o mesmo modelo iniciou o uso da droga uma semana antes da injeção das células tumorais, e avaliou a resposta semanalmente por meio de BLI ¹²⁵. Nesses dois estudos não é

possível estabelecer de modo seguro a eficiência de qualquer agente terapêutico, pois não se pode comprovar o sucesso da indução da neoplasia metastática. Nossa experiência com esse modelo é que só é possível avaliar o sucesso da indução da neoplasia a partir do dia 14 e desse modo analisar a real efetividade das diversas modalidades terapêuticas. Por esse motivo optamos por aguardar a visualização da doença metastática para confirmarmos a atividade do agente de tratamento ^{110, 119, 125}. A partir desse momento, que ocorre em 100% dos animais no dia 21, pudemos iniciar os tratamentos tendo a certeza de que as alterações tumorais são devidas à intervenção. Porém, essa atitude faz com que qualquer agente terapêutico tenha uma atividade limitada devido ao maior volume tumoral, mas por outro lado reproduz a doença que acomete o homem com doença metastática estabelecida, que era o nosso objetivo. Uma alternativa seria realizar exames de imagem diários ou a cada dois dias e iniciar o tratamento quando os primeiros sinais de metástase se manifestassem aumentando assim a eficácia do tratamento.

Assim, no nosso estudo, diferentemente do que observado nos trabalhos de Takeshita com CaP e miR-16¹¹⁰, encontramos resposta tumoral aos miRNAs de forma clara, porém mais discreta. O miRNA com efeito mais consistente no tratamento dos animais foi o miR-145, que no grupo tratado reduziu a velocidade de progressão da doença, afastando a curva de bioluminescência do controle, com efeito significativo no dia 34, sete dias após a realização da terceira dose de tratamento, reduzindo a atividade tumoral em 6 vezes. Nesse grupo a perda de peso é menor e as lesões tumorais apresentaram menor agressividade. Porém esse efeito foi transitório com volta do crescimento tumoral após a suspensão do tratamento que atingiu velocidade semelhante ao controle. Esse comportamento, entretanto, não nos surpreendeu, pois é típico de outras terapias alvo moleculares, em que o efeito só é sustentado se a droga for mantida. ^{64, 156-158}

No nosso estudo realizamos apenas três doses, com intervalos de três dias, visto a fragilidade das veias da cauda do animal, da morbidade do procedimento e do custo dos insumos utilizados. Não há na literatura doses e tempo padrão de tratamento devido à escassez de estudos, não havendo nenhuma análise farmacodinâmica ou farmacocinética. Utilizamos a mesma dose de miRNA

altamente purificado específico para uso *in vivo*, proposta por Takeshita, de 3mg/Kg. Acreditamos que doses maiores e mantidas subsequentemente poderiam manter o tumor com crescimento lento e até mesmo promover uma regressão parcial da neoplasia a exemplo das demais terapias alvo.

No grupo tratado com miR-100, quando feita a análise normalizada, houve resposta favorável, porém sem diferença estatística. O efeito do tratamento foi um pouco mais precoce e menos pronunciado que com o miR-145, mas ainda no período imediatamente após o tratamento. Com o miR-100 o efeito também foi transitório e após o dia 27 houve progressão agressiva do tumor. Analisando as imagens dos animais, observamos que os animais tratados com anti-miR-100 apresentaram progressão pior, com maior número de metástases e perda de peso. É interessante comentar que *in vivo* o miR-100 se comportou como supressor tumoral compatível com os resultados *in vitro* na linhagem PC-3M-luc-C6.

O grupo tratado com anti-miR-373 foi o último a ser realizado no desenvolvimento do projeto e nesse grupo o tumor apresentou alta agressividade mesmo antes de iniciarmos os tratamentos. Em 2 animais tratados observamos a regressão do tumor e em 4 nenhuma alteração relevante. É interessante notar que os animais que não apresentaram resposta possuíam grandes tumores na mandíbula. Na análise final desse grupo anti-miR-373 parece haver uma tendência a estabilização do tumor e maior sobrevida no grupo tratado, porém não encontramos diferença estatística nas análises desse grupo.

O modelo utilizado reproduz com fidelidade o CaP metastático acometendo epífise dos ossos longos, osso ilíaco, arcos costais e região mandibular. Essa localização específica na mandíbula, afetou de modo importante nossos animais que apresentaram grande perda ponderal, principalmente no final do estudo, pela incapacidade de se alimentarem. Observamos que essas metástases craniais são as que menos responderam aos tratamentos pois se instalaram rapidamente de forma agressiva levando os animais a óbito. Entretanto, tivemos animais com essas características em todos os grupos, o que os iguala. Esse tipo de metástase é extremamente rara em humanos com poucos descritos na literatura¹⁵⁹.

De todos os animais, os que perderam menos peso foram aqueles tratados com miR-145. O grupo com maior perda de peso foi o tratado com anti-miR-100, onde houve perda de 27% de peso nesse grupo. Essas diferenças podem demonstrar efeito benéfico de uma terapia com um miRNA supressor tumoral como o miR-145.

Como já referido acima, a resposta tumoral à terapia com miRNA não é homogênea entre os grupos e mesmo entre animais de um mesmo grupo, corrigimos esse viés pela normalização com o dia de início do tratamento. O mais interessante é que essa diferença na resposta pode ser observada no mesmo animal, onde frequentemente as metástases encontram-se em quatro sítios ósseos: crânio-face, coluna, fêmur e tórax. Nelas, as melhores respostas foram vistas no fêmur, tórax e coluna, com pior resposta na face (mandíbula).

Outros estudos de modelos de CaP metastático com injeção intra-cardíaca também observaram distribuição heterogênea dos órgãos, com predominância na mandíbula, coluna vertebral e bacia. Metástases ósseas foram as mais observadas, porém outros órgãos foram afetados como pulmão, fígado, cérebro e glândulas adrenais, o que também foi visto em nosso modelo. Também observamos, como em outros modelos, que a metástase craniofacial é a primeira a ser detectada, com crescimento agressivo nessa região e resposta pobre comparada à observada em ossos longos ^{154, 160}.

Para avaliar a toxicidade do miRNA e do atelocolágeno avaliamos a histologia do fígado, rim, pulmão e cérebro e não observamos nenhuma alteração que denotasse lesões tóxicas. Como o câncer é introduzido diretamente na circulação, pula dois importantes passos da formação de metástases: invasão do sítio primário e intravascular.

5.3 O significado clínico dos nossos resultados e perspectivas futuras

O estudo realizado é pioneiro em nosso meio, avaliamos o papel de moléculas (miRNAs) como tratamento em células em um sistema controlado e em um organismo vivo com tumor disseminado, cumprindo todas etapas de um ensaio pré-clínico, obtendo sucesso com a molécula miR-145. Essa etapa é fundamental para o início de estudos de fase 1 em humanos. Esse modelo tem um impacto importante no nosso meio, ávido pela descoberta de tratamentos eficazes para a doença metastática, podendo validar drogas e encurtar o tempo de fases pré-clínicas. Apesar das dificuldades em relação ao estabelecimento do tumor e padronização de técnicas de tratamento, conseguimos reproduzir um modelo de CaP metastático que estará à disposição da comunidade científica para testes de múltiplas plataformas terapêuticas. Nossa experiência com modelos iniciou-se avaliando o papel do miR 371 no controle do receptor de andrógeno *in vitro* e a resposta do tratamento com esse miRNA em um modelo de CaP localizado no subcutâneo com a PC-3M-luc-C6. Os animais foram tratados com injeções peritumorais de miR-371 e atelocolágeno e observamos uma redução no crescimento tumoral nos animais tratados comparados aos controles ¹⁶¹.

O nosso modelo de CaP metastático já foi utilizado para estudo de nanopartículas radioativas desenhadas para atingirem apenas células neoplásicas, servindo como vetores de drogas específicas ao ambiente tumoral, evitando efeitos colaterais. Esse estudo foi uma colaboração entre nosso grupo, o laboratório de nanoradiofarmácia do Instituto de Engenharia Nuclear da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo da FMUSP ¹⁶².

Os resultados obtidos no nosso estudo foram bastante consistentes e promissores e nos empolga na continuação dessa linha. Nossa proposta futura é utilizar mais de um miRNA em conjunto e até mesmo associar miRNAs supressores tumorais com anti-miRNAs de oncomiRs, tanto como terapêutica isolada ou como sensibilizante para hormonioterapias, quimioterapias ou radioterapia, promovendo maior sensibilidade e menores efeitos colaterais a esses tratamentos. Além disso

pretendemos aumentar o número de animais e tratá-los em fases mais precoces da evolução da doença, quando os primeiros sinais de bioluminescência surgirem. Essas medidas, associadas à manutenção das doses de tratamento e com intervalos menores pode permitir uma resposta ainda mais efetiva e persistente, com estabilização da doença a exemplo das drogas alvo-moleculares que mudaram o paradigma nas doenças oncológicas.

O objetivo do nosso grupo é seguir nessa linha de pesquisa translacional, com ampla divulgação e disseminação dos métodos, associando abordagens terapêuticas nesse modelo que é etapa fundamental na transição para os estudos com miRNA para o tratamento do câncer de próstata em humanos.

6. CONCLUSÕES

O modelo de CaP metastático com células bioluminescentes é factível e reprodutível para avaliar novas terapêuticas no câncer de próstata.

O tratamento com miR-145 reduz o crescimento tumoral *in vivo* de forma efetiva e sem toxicidade. O tratamento com miR-100 resultou em tumores com menor agressividade e no grupo anti-miR-100 houve maior agressividade tumoral *in vivo*, ambos sem significância estatística. O miR-145 tem papel supressor tumoral *in vitro* e o miR-100 é contexto dependente *in vitro*. O miR-373 tem papel oncogênico *in vitro* e o tratamento *in vivo* com o anti-miR-373 não apresentou resultados significativos.

Dentre os miRNAs estudados o miR-145 é o que melhor apresenta resposta terapêutica *in vitro* e *in vivo*, podendo ser utilizado no arsenal terapêutico contra o CaP. Estudos futuros podem permitir o uso dos miRNAs de forma isolada ou adjuvante a terapias consagradas, promovendo maior eficácia e menores efeitos colaterais no tratamento da doença.

7. ANEXOS

Sumário de resultados

miR 100			miR 145			miR373		
Linhagem	miR	anti-miR	miR	anti-miR	miR	anti-miR		
Gene alvo	DU145	↓ SMARCA *	-	-	↓ RAS, cMYC	↑ cMYC, RAS	↑ MMP9	
	PC3	↓ SMARCA *	-	-	↓ cMYC, RAS *	↑ RAS *	↓ CD44 *	
	LnCAP	↓ mTOR *	↑ mTOR, SMARCA *	-	↓ cMYC, RAS *	↑ RAS *	↑ MMP9	
Apoptose	DU145	↓ *	-	-	↑ *	-	↓ *	
	PC3	-	↑ *	-	-	-	-	
	LnCAP	↑ *	-	-	-	-	-	
Proliferação	DU145	↓ *	-	-	-	-	-	
	PC3	-	-	-	↓ *	↓ *	↓ *	
Ploidia	DU145	-	-	-	-	-	-	
	PC3	Hipodiploides *	-	-	-	-	Hipodiploides *	
Matrigel	DU145	-	-	-	-	-	-	
	PC3	-	↑ *	-	↑ *	↑ *	-	
Tratamento in vivo	PC-3M-luc-C6	↓	↑	↓ *			↓	
Classificação	contexto-dependente		supressor		oncomiR			

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol*. 2012 Apr;30(2):195-200.
2. Brasil MdS-. Epidemiologia do Câncer 2013. Available from: www.inca.gov.br.
3. U.S. Department of Health and Human Services NIOH, National Cancer Institute. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute USA2015 [cited 2014 11/03/2015]. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
4. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*. 1999 May 5;281(17):1591-7.
5. Reddy S, Shapiro M, Morton R, Jr., Brawley OW. Prostate cancer in black and white Americans. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Mar;22(1):83-6.
6. Stocks T, Bjorge T, Ulmer H, Manjer J, Haggstrom C, Nagel G, et al. Metabolic risk score and cancer risk: pooled analysis of seven cohorts. *Int J Epidemiol*. 2015 Feb 3.
7. Vickers A, Cronin A, Roobol M, Savage C, Peltola M, Pettersson K, et al. Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-kallikrein panel: an independent replication. *J Clin Oncol*. 2010 May 20;28(15):2493-8.
8. Parekh DJ, Punnen S, Sjoberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, et al. A Multi-institutional Prospective Trial in the USA Confirms that the 4Kscore Accurately Identifies Men with High-grade Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2015 Sep;68(3):464-70.
9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
10. 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 Jan 18;104(2):125-32.
11. 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.
12. Moyer VA, Force USPST. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2012 Jul 17;157(2):120-34.
13. Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol*. 2013 Aug;190(2):419-26.
14. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 1992 Mar;23(3):273-9.
15. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2005 May(216):34-63.
16. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998 Sep 16;280(11):969-74.
17. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*. 2015 Jul 9.
18. Berman DM, Epstein JI. When is prostate cancer really cancer? *Urol Clin North Am*. 2014 May;41(2):339-46.
19. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int*. 2013 May;111(5):753-60.

20. www.nccn.org. The National Comprehensive Cancer Network 2015. Available from: www.nccn.org.
21. Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, et al. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J Urol*. 2007 Jun;177(6):2106-31.
22. www.cancer.gov. 2015.
23. Dahabreh IJ, Chung M, Balk EM, Yu WW, Mathew P, Lau J, et al. Active surveillance in men with localized prostate cancer: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2012 Apr 17;156(8):582-90.
24. Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 1;28(1):126-31.
25. Critz FA, Benton JB, Shrake P, Merlin ML. 25-Year disease-free survival rate after irradiation for prostate cancer calculated with the prostate specific antigen definition of recurrence used for radical prostatectomy. *J Urol*. 2013 Mar;189(3):878-83.
26. Ragde H, Korb LJ, Elgamal AA, Grado GL, Nadir BS. Modern prostate brachytherapy. Prostate specific antigen results in 219 patients with up to 12 years of observed follow-up. *Cancer*. 2000 Jul 1;89(1):135-41.
27. Bolla M, Maingon P, Carrie C, Villa S, Kitsios P, Poortmans PM, et al. Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *J Clin Oncol*. 2016 Mar 14.
28. Varkarakis MJ, Winterberger AR, Gaeta J, Moore RH, Murphy GP. Lung metastases in prostatic carcinoma. Clinical significance. *Urology*. 1974 Apr;3(4):447-52.
29. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jul;15(7):409-25.
30. Bienz M, Saad F. Management of bone metastases in prostate cancer: a review. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2015 Sep;9(3):261-7.
31. 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. *Eur Urol*. 2015 Mar;67(3):470-9.
32. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*. 1972 Jul-Aug;22(4):232-40.
33. Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials. Prostate Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 2000 Apr 29;355(9214):1491-8.
34. American Cancer S. 2013 [updated 02/03/201402/17/2014]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-key-statistics>.
35. Walsh PC. Immediate versus deferred hormonal treatment for patients with prostate cancer who are not suitable for curative local treatment: results of the randomized trial SAKK 08/88. *J Urol*. 2005 Sep;174(3):929.
36. Alifrangis C, O'Hanlon-Brown C, Tuthill M, Waxman J. New drugs for prostate cancer. *BJU Int*. 2012 Jun;109(12):1801-6.
37. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 28;107(39):16759-65.
38. Antonarakis ES. Predicting treatment response in castration-resistant prostate cancer: could androgen receptor variant-7 hold the key? *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015 Feb;15(2):143-5.

39. Reebye V, Bevan CL, Nohadani M, Hajitou A, Habib NA, Mintz PJ. Interaction between AR signalling and CRKL bypasses casodex inhibition in prostate cancer. *Cell Signal*. 2010 Dec;22(12):1874-81.
40. Yap TA, Carden CP, Attard G, de Bono JS. Targeting CYP17: established and novel approaches in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Aug;8(4):449-57.
41. Attard G, Reid AH, Olmos D, de Bono JS. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):4937-40.
42. Attard G, Reid AH, Yap TA, Raynaud F, Dowsett M, Settatre S, et al. Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4563-71.
43. Sternberg CN, Castellano D, Daugaard G, Geczi L, Hotte SJ, Mainwaring PN, et al. Abiraterone acetate for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after chemotherapy: final analysis of a multicentre, open-label, early-access protocol trial. *Lancet Oncol*. 2014 Oct;15(11):1263-8.
44. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol*. 1996 Jun;14(6):1756-64.
45. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*. 2010 Oct 2;376(9747):1147-54.
46. Sternberg CN, Petrylak DP, Sartor O, Witjes JA, Demkow T, Ferrero JM, et al. Multinational, double-blind, phase III study of prednisone and either satraplatin or placebo in patients with castrate-refractory prostate cancer progressing after prior chemotherapy: the SPARC trial. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5431-8.
47. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Aug 20;373(8):737-46.
48. Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Dec;53(12):1111-8.
49. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29;363(5):411-22.
50. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031-7.
51. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002 Aug 15;347(7):472-80.
52. Pezaro C, Rosenthal MA, Gurney H, Davis ID, Underhill C, Boyer MJ, et al. An open-label, single-arm phase two trial of gefitinib in patients with advanced or metastatic castration-resistant prostate cancer. *Am J Clin Oncol*. 2009 Aug;32(4):338-41.
53. Medicine USNLo. <http://www.clinicaltrials.gov> 2015. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>.
54. Neshat MS, Mellinshoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10314-9.

55. Grunwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6141-5.
56. Nelson JB. Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 2):S65-7; discussion S7-8.
57. Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, et al. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):10954-9.
58. Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, et al. Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 15;21(4):679-89.
59. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med.* 2012 Sep 27;367(13):1187-97.
60. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller MD, et al. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2012 Aug 15.
61. Welsbie DS, Xu J, Chen Y, Borsu L, Scher HI, Rosen N, et al. Histone deacetylases are required for androgen receptor function in hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):958-66.
62. Bradley DA, Hussain M. Promising novel cytotoxic agents and combinations in metastatic prostate cancer. *Cancer J.* 2008 Jan-Feb;14(1):15-9.
63. Rathkopf D, Carducci MA, Morris MJ, Slovin SF, Eisenberger MA, Pili R, et al. Phase II trial of docetaxel with rapid androgen cycling for progressive noncastrate prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 20;26(18):2959-65.
64. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Oct 29;373(18):1697-708.
65. Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemiol Rev.* 2001;23(1):3-13.
66. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):78-85.
67. Matsuda T, Saika K. Comparison of time trends in prostate cancer incidence (1973-2002) in Asia, from cancer incidence in five continents, Vols IV-IX. *Jpn J Clin Oncol.* 2009 Jul;39(7):468-9.
68. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science.* 1996 Nov 22;274(5291):1371-4.
69. Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet.* 2002 Feb;30(2):181-4.
70. Eeles RA, Durocher F, Edwards S, Teare D, Badzioch M, Hamoudi R, et al. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group U.K. Familial Prostate Cancer Study Collaborators. *Am J Hum Genet.* 1998 Mar;62(3):653-8.
71. Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, et al. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet.* 1998 Jun;62(6):1416-24.

72. Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, et al. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet.* 2003 Jan;72(1):1-12.
73. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med.* 2012 Jan 12;366(2):141-9.
74. Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Al Olama AA, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol.* 2014 Jan;11(1):18-31.
75. Liu H, Wang B, Han C. Meta-analysis of genome-wide and replication association studies on prostate cancer. *Prostate.* 2011 Feb 1;71(2):209-24.
76. Jeronimo C, Varzim G, Henrique R, Oliveira J, Bento MJ, Silva C, et al. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 May;11(5):445-50.
77. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar;144(5):646-74.
78. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* 2008 Feb;10(2):177-88.
79. Krajewska M, Kitada S, Winter JN, Variakojis D, Lichtenstein A, Zhai D, et al. Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clin Cancer Res.* 2008 May 15;14(10):3011-21.
80. Gumerlock PH, Poonamallee UR, Meyers FJ, deVere White RW. Activated ras alleles in human carcinoma of the prostate are rare. *Cancer Res.* 1991 Mar 15;51(6):1632-7.
81. Leite KR, Franco MF, Srougi M, Nesrallah LJ, Nesrallah A, Bevilacqua RG, et al. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. *Mod Pathol.* 2001 May;14(5):428-36.
82. Visakorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. *Urology.* 2003 Nov;62(5 Suppl 1):3-10.
83. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Oct 20;85(20):1657-69.
84. Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer.* 2005 Apr;41(6):858-87.
85. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5246-50.
86. Hyytinen ER, Frierson HF, Jr., Boyd JC, Chung LW, Dong JT. Three distinct regions of allelic loss at 13q14, 13q21-22, and 13q33 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999 Jun;25(2):108-14.
87. Ornstein DK, Cinquanta M, Weiler S, Duray PH, Emmert-Buck MR, Vocke CD, et al. Expression studies and mutational analysis of the androgen regulated homeobox gene NKX3.1 in benign and malignant prostate epithelium. *J Urol.* 2001 Apr;165(4):1329-34.
88. Bonfil RD, Chinni S, Fridman R, Kim HR, Cher ML. Proteases, growth factors, chemokines, and the microenvironment in prostate cancer bone metastasis. *Urol Oncol.* 2007 Sep-Oct;25(5):407-11.
89. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 15;12(20 Pt 2):6213s-6s.
90. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JM, Papaemmanuil E, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature.* 2015 Apr 16;520(7547):353-7.

91. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb;10(2):126-39.
92. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One.* 2011;6(6):e20769.
93. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
94. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
95. Melo SA, Kalluri R. Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2012 Aug 15;18(16):4234-9.
96. Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther.* 2011 Aug;10(8):1470-80.
97. van der Ree MH, van der Meer AJ, de Bruijne J, Maan R, van Vliet A, Welzel TM, et al. Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res.* 2014 Nov;111:53-9.
98. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6130-5.
99. Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M, et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 11;104(50):19983-8.
100. Ambros S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6162-70.
101. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008 Nov;14(11):1271-7.
102. Sun T, Wang Q, Balk S, Brown M, Lee GS, Kantoff P. The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3356-63.
103. 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. *Urol Oncol.* 2011 Aug 29.
104. Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Camara-Lopes LH, Sanudo A, et al. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol.* 2011 May-Jun;29(3):265-9.
105. Leite KR, Morais DR, Reis ST, Viana N, Moura C, Florez MG, et al. MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo).* 2013 Jun;68(6):797-802.
106. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Dall'Oglio MF, et al. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *J Urol.* 2011 Mar;185(3):1118-22.
107. Leite KR, Reis ST, Viana N, Morais DR, Moura CM, Silva IA, et al. Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *J Cancer.* 2015;6(3):292-301.

108. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC Urol.* 2012;12:14.
109. 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.
110. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, et al. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther.* 2010 Jan;18(1):181-7.
111. Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, et al. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 5;377(1):114-9.
112. 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.
113. Fogh JG, B.C. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research.* Fogh JG, B.C, editor: Academic Press; 1982.
114. <http://www.animalresearch.info/>. <http://animalresearch.info/en/designing-research/249/mouse-immunodeficient/> 2015.
115. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal models of bone metastasis. *Cancer.* 2003 Feb 1;97(3 Suppl):748-57.
116. Pollard M, Luckert PH, Snyder DL. The promotional effect of testosterone on induction of prostate-cancer in MNU-sensitized L-W rats. *Cancer Lett.* 1989 Jun;45(3):209-12.
117. Dai J, Hensel J, Wang N, Kruithof-de Julio M, Shiozawa Y. Mouse models for studying prostate cancer bone metastasis. *Bonekey Rep.* 2016;5:777.
118. Inaba S, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Ishimoto T, Matsuo S, et al. Atelocollagen-mediated systemic delivery prevents immunostimulatory adverse effects of siRNA in mammals. *Mol Ther.* 2012 Feb;20(2):356-66.
119. Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, et al. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 23;102(34):12177-82.
120. Zaman MS, Chen Y, Deng G, Shahryari V, Suh SO, Saini S, et al. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2010 Jul;103(2):256-64.
121. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D920-4.
122. 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 Dec;25(4):402-8.
123. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, et al. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(13):e109.
124. Moriyama-Gonda N, Shiina H, Terashima M, Satoh K, Igawa M. Rationale and clinical implication of combined chemotherapy with cisplatin and oestrogen in prostate cancer: primary evidence based on methylation analysis of oestrogen receptor-alpha. *BJU Int.* 2008 Feb;101(4):485-91.

125. Garcia M, Velez R, Romagosa C, Majem B, Pedrola N, Olivan M, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumour progression of prostate cancer bone metastases in nude mice. *BJU Int.* 2014 May;113(5b):E164-77.
126. Zhang T, Xue X, He D, Hsieh JT. A prostate cancer-targeted polyarginine-disulfide linked PEI nanocarrier for delivery of microRNA. *Cancer Lett.* 2015 Sep 1;365(2):156-65.
127. Liu P, Wilson MJ. miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF-kappaB factor in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol.* 2012 Feb;227(2):867-76.
128. Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C, et al. miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 2011 Feb 15;71(4):1313-24.
129. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature.* 2013 May 9;497(7448):217-23.
130. Li Q, Gu C, Zhu Y, Wang M, Yang Y, Wang J, et al. Polymorphisms in the mTOR Gene and Risk of Sporadic Prostate Cancer in an Eastern Chinese Population. *PLoS One.* 2013;8(8):e71968.
131. Fang Z, Rajewsky N. The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One.* 2011;6(3):e18067.
132. Sachdeva M, Liu Q, Cao J, Lu Z, Mo YY. Negative regulation of miR-145 by C/EBP-beta through the Akt pathway in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(14):6683-92.
133. Dang CV. Enigmatic MYC Conducts an Unfolding Systems Biology Symphony. *Genes Cancer.* 2010 Jun 1;1(6):526-31.
134. Wong WJ, Qiu B, Nakazawa MS, Qing G, Simon MC. MYC degradation under low O2 tension promotes survival by evading hypoxia-induced cell death. *Mol Cell Biol.* 2013 Sep;33(17):3494-504.
135. Wolfer A, Wittner BS, Irimia D, Flavin RJ, Lupien M, Gunawardane RN, et al. MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 23;107(8):3698-703.
136. Kiyono M, Kato J, Kataoka T, Kaziro Y, Satoh T. Stimulation of Ras guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) upon tyrosine phosphorylation by the Cdc42-regulated kinase ACK1. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29788-93.
137. Rubio I, Wittig U, Meyer C, Heinze R, Kadereit D, Waldmann H, et al. Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Eur J Biochem.* 1999 Nov;266(1):70-82.
138. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jun;79(11):3637-40.
139. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Nov 25;1756(2):81-2.
140. Xue G, Ren Z, Chen Y, Zhu J, Du Y, Pan D, et al. A feedback regulation between miR-145 and DNA methyltransferase 3b in prostate cancer cell and their responses to irradiation. *Cancer Lett.* 2015 Mar 5.
141. Gong P, Zhang T, He D, Hsieh JT. MicroRNA-145 Modulates Tumor Sensitivity to Radiation in Prostate Cancer. *Radiat Res.* 2015 Dec;184(6):630-8.
142. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2010 Mar 2;102(5):922-9.

143. Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Res.* 2006 Mar-Apr;26(2A):973-82.
144. Ozden F, Saygin C, Uzunaslani D, Onal B, Durak H, Aki H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 Aug;139(8):1373-82.
145. Lou W, Krill D, Dhir R, Becich MJ, Dong JT, Frierson HF, Jr., et al. Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1999 May 15;59(10):2329-31.
146. Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.* 1997 Mar 1;57(5):846-9.
147. Noordzij MA, van Steenbrugge GJ, Verkaik NS, Schroder FH, van der Kwast TH. The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 1997 May;3(5):805-15.
148. Nagabhushan M, Pretlow TG, Guo YJ, Amini SB, Pretlow TP, Sy MS. Altered expression of CD44 in human prostate cancer during progression. *Am J Clin Pathol.* 1996 Nov;106(5):647-51.
149. Hao Z, Fan W, Hao J, Wu X, Zeng GQ, Zhang LJ, et al. Efficient delivery of micro RNA to bone-metastatic prostate tumors by using aptamer-conjugated atelocollagen in vitro and in vivo. *Drug Deliv.* 2014 Jun 3:1-8.
150. Mu P, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Kadomatsu K, Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer.* 2009 Dec 15;125(12):2978-90.
151. Fujita T, Yanagihara K, Takeshita F, Aoyagi K, Nishimura T, Takigahira M, et al. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhus gastric cancer model mice. *Cancer Sci.* 2013 Feb;104(2):214-22.
152. Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Machida S, Takei Y, Fujiwara H, et al. In vivo delivery of siRNA targeting vasohibin-2 decreases tumor angiogenesis and suppresses tumor growth in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2013 Dec;104(12):1705-10.
153. Arguello F, Furlanetto RW, Baggs RB, Graves BT, Harwell SE, Cohen HJ, et al. Incidence and distribution of experimental metastases in mutant mice with defective organ microenvironments (genotypes Sl/Sl and W/Wv). *Cancer Res.* 1992 Apr 15;52(8):2304-9.
154. Drake JM, Gabriel CL, Henry MD. Assessing tumor growth and distribution in a model of prostate cancer metastasis using bioluminescence imaging. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(8):674-84.
155. Springer ML, Sievers RE, Viswanathan MN, Yee MS, Foster E, Grossman W, et al. Closed-chest cell injections into mouse myocardium guided by high-resolution echocardiography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Sep;289(3):H1307-14.
156. Oudard S, Vano Y. The role of rechallenging with targeted therapies in metastatic renal-cell carcinoma. *Curr Opin Urol.* 2015 Sep;25(5):402-10.
157. Wei EY, Hsieh JJ. A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. *Nat Rev Urol.* 2015 Dec;12(12):706-12.
158. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007 May 31;356(22):2271-81.
159. Menezes JD, Cappellari PF, Capelari MM, Goncalves PZ, Toledo GL, Toledo Filho JL, et al. Mandibular metastasis of adenocarcinoma from prostate cancer: case report according to epidemiology and current therapeutical trends of the advanced prostate cancer. *J Appl Oral Sci.* 2013 Sep-Oct;21(5):490-5.

160. Schneider A, Kalikin LM, Mattos AC, Keller ET, Allen MJ, Pienta KJ, et al. Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1727-36.
161. Leite KR, Morais DR, Florez MG, Reis ST, Iscaife A, Viana N, et al. The role of microRNAs 371 and 34a in androgen receptor control influencing prostate cancer behavior. *Urol Oncol*. 2015 Jun;33(6):267 e15-22.
162. Coelho BF, de Souza Albernaz M, Iscaife A, Moreira Leite KR, de Souza Junqueira M, Bernardes ES, et al. Nanoradiopharmaceuticals for Bone Cancer Metastasis Imaging. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015;15(5):445-9.

APÊNDICES

Artigo científico submetido

Nature Molecular Therapy

The Use of MicroRNA-145 for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer

Participação em eventos científicos

1. Congresso Brasileiro de Patologia 2013
2. XXXIV Congresso Brasileiro de Urologia 2013
3. World Health Summit 2014
4. 34th Congress of *The Societe Internationale D' Urologie* 2014
5. Congresso Brasileiro de Urologia 2015
6. International Conference on Prostate Cancer 2015
7. Congresso Brasileiro de Patologia 2015

1.

Mensagem original

De: Atendimento <atendimento@sbp.org.br >

Para: katiaramos@uol.com.br

Assunto: Trabalho indicado para apresentação como pôster

Enviada: 27/08/2013 08:36

Prezado(a) Dr(a) Katia Ramos Moreira Leite.

Em nome da Comissão Científica do XXIX Congresso Brasileiro de Patologia, temos o prazer de informar que seu trabalho "MICRO RNA E APOPTOSE NO CÂNCER DE PRÓSTATA" foi aceito para apresentação como Pôster.

Tamanho do pôster: **0,90 L x 1,20 A.**

A partir de 15 de outubro ficará disponível no site do congresso a data da apresentação do pôster.

Para mais informações, envie mensagem para sbp@sbp.org.br ou ligue (11) 5080-5298.

Obrigada pela atenção.

Myriam Dumas Hahn

p/ Coordenação da Comissão Científica

XXIX Congresso Brasileiro de Patologia

Gianfranco Luigi Colombeli

Presidente do XXIX Congresso Brasileiro de Patologia

Coordenação da Comissão Científica do XXIX Congresso Brasileiro de Patologia

Adriana Marques Caroli de Freitas Bottino

Alexandre Cavalca Tavares

Carlos Renato Almeida Melo

Emílio Marcelo Pereira

Leonard Medeiros da Silva

Myriam Dumas Hahn

Sueli Aparecida Maeda Pereira

Vera Lucia Nunes Pannain

2.

De: patologia2015@interevent.com.br

Enviada: Quinta-feira, 15 de Outubro de 2015 15:18

Para: katiaramos@uol.com.br

Assunto: Carta - Apresentadores - Temas livres - 30º Congresso Brasileiro de Patologia
Prezado(a) Dr(a) **Katia Ramos Moreira Leite,**

Em nome da Coordenação Comissão Científica do **30º Congresso Brasileiro de Patologia**, temos o prazer de informar que seu trabalho **“EXPERIMENTAL THERAPY FOR BONE METASTATIC PROSTATE CANCER WITH MICRO RNA145 INHIBITS TUMOR GROWTH IN VIVO”**, candidato ao Prêmio SBP / apresentação oral, deverá ser apresentado no dia **30/10/2015, das 12:15:00 às 12:30:00, na sala 3 - PARQUE DO IBIRAPUERA.**

Os CDs ou pen-drives deverão ser entregues na mídia desk com antecedência mínima de 02 horas do início da sessão.

Estas informações estarão disponíveis no site do congresso a partir do dia 30 de setembro.

Em caso de dúvida, estamos à disposição pelos e-mails patologia2015@interevent.com.br e congressodepatologia@sbp.org.br

Atenciosamente,

Myriam Dumas Hahn

p/ Coordenação da Comissão Científica do 30º Congresso Brasileiro de Patologia

Sueli Aparecida Maeda Pereira

Presidente do 30º Congresso Brasileiro de Patologia

Secretaria Executiva do Congresso

Interevent

(55 21) 3326-3320

patologia2015@interevent.com.br

3.

Ao (a)

Doutor (a) **ALEXANDRE ISCAIFE**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Prezado (a) Doutor (a)

A Comissão Científica do **XXXV Congresso Brasileiro de Urologia** tem o prazer de comunicar que o seu trabalho científico intitulado **“TARGET THERAPY FOR BONE METASTATIC PROSTATE CANCER WITH MICRO RNA INHIBITS TUMOR GROWTH IN VIVO”**, nº 860, foi **APROVADO** para inclusão nos anais e apresentação no Congresso.

Por favor, aguarde uma próxima comunicação onde informaremos o formato de apresentação, data e horário.

Qualquer dúvida, estamos à disposição através do e-mail coordenacao2@rvmais.com.br

Atenciosamente,

Secretaria Executiva

XXXV Congresso Brasileiro de Urologia

International Conference on Prostate Cancer

June 22-24, 2015 Florida, USA

Target therapy for bone metastatic prostate cancer with micro RNA145 inhibits tumor growth *in vivo*

Alexandre Iscaife, Denis Reis Morais, Sabrina Thalita Reis, Nayara Izabel Viana, Andre Bordini, Daniele Janolli, Nelson Dip, Miguel Srougi and Katia Ramos Moreira Leite
University of Sao Paulo, Brazil

Background: The metastatic prostate cancer presents unfavorable, without cure and with high comorbid and low quality of life. Micro RNA (miRNA) is a class of non-coding RNA responsible for the expression control of at least 30% of human genes. Here we present the effects of treatment with miRNAs 145 in a pre-clinical model of disseminated bone metastatic prostate cancer.

Methods: The pre-clinical model was created by the intra-cardiac injection of the cell line containing luciferase gene PC3-Luc-C6 in nude mice (Balb/c). Tumor growth was evaluated with *in vivo* bioluminescence (IVIS). After the full establishment of the bone metastasis at day 21 we treated the animals with three tail vein injections. They were analyzed weekly until day 48.

Results: The model of bone metastatic prostate cancer was well established with diffuse metastasis on day 21. We treated the animal intravenously with the microRNA conjugated with atelocollagen on days 21, 24 and 27. Immediately in a period of one week after the treatment the tumor stops to grow and reduces the activity. After this temporally tumor suppressor action, the tumors starts to grow again.

Conclusion: In animals with diffuse metastatic disease, the treatment with mir145 leads to a temporally response due to a fast degradation of these microRNAs and to cancer cells mechanisms of scape and resistance. Further studies with this purpose and design will permit the development of novel target drugs based on microRNAs for suppressing the metastatic prostate cancer growth.

Biography

Alexandre Iscaife graduated in medicine by Medical School of the State University of Campinas - FCM / UNICAMP, residency in General Surgery and Urology by the Paulista Medical School - EPM / UNIFESP. As an undergraduate the focus of research was experimental and angiogenesis surgery. He is currently attending physician of prostate sector of the Division of Urology, Faculty of Medicine, USP (USP) and researcher at the Urology Laboratory (LIM55) - USP where investigates molecular target treatment pathways and experimental models of prostate cancer. Has experience in the area of urology, with emphasis on Prostatic Hyperplasia, Oncology and Endourology.

iscaifeboni@yahoo.com.br

Notes:

WORLD
HEALTH
SUMMIT

REGIONAL MEETING
LATIN AMERICA
SÃO PAULO
APRIL 6-8, 2014

CERTIFICATE OF ACCEPTANCE AND PRESENTATION

We herewith confirm that

the abstract

Micro RNA 100, 145 and 373 in Prostate Cancer: From Gene Regulation to Apoptosis

Iscaife Alexandre¹, Reis Morais Denis¹, Thalita Reis Sabrina¹, Izabel Viana Nayara¹, Katz
Betina¹, Moura Caio¹, Dip Nelson¹, Srougi Miguel¹, Ramos Moreira Leite Katia¹

¹University of Sao Paulo - USP, Urology, Sao Paulo, Brazil

was accepted as paper poster to the

World Health Summit Regional Meeting – Latin America 2014 in São Paulo.

The abstract was presented during the poster viewings on Sunday April 6, 2014 at 08:00-10:00
in the Poster Area.

Yours sincerely,

Prof. Giovanni Guido Cerri

*President, WHS Regional Meeting – Latin America 2014
Dean, University of Sao Paulo Medical School*

Prof. José Otávio Costa Auler Júnior

*Chair, World Health Summit 2014
Vice-Dean
University of São Paulo Medical School*

SIU 2014 SCOTLAND
GLASGOW

34TH CONGRESS OF THE
SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'UROLOGIE

OCTOBER 12-15, 2014
SCOTTISH EXHIBITION AND CONFERENCE CENTRE

Local Organizing
Committee

Shiv Bhanot
Co-Chair

Hing Leung
Co-Chair

Mark Speakman
Co-Chair

Imran Ahmad
I. Graeme Conn
Prokar Dasgupta
Ian Dunn
Robert Pickard

Congress Organizing
Committee

Jean de la Rosette
The Netherlands
Chair

Peter Hammerer, Germany
Adjunct Chair

Shiv Bhanot, UK
Peter Black, Canada
Damien Bolton, Australia
Ben Chew, Canada
Margit Fisch, Germany
Mark Frydenberg, Australia
Inderbir S. Gill, USA
Michael Hehir, UK
Badrinath Konety, USA
Hing Leung, UK
Simon Tanguay, Canada
Luc Valiquette, Canada
Arnaud Villers, France

Scientific Committee

Inderbir S. Gill, USA
Chair

Margit Fisch, Germany
Adjunct Chair

Shiv Bhanot, UK
Andre Cavalcanti, Brazil
Shin Egawa, Japan
Peter Hammerer, Germany
Badrinath Konety, USA
Pilar Laguna, The Netherlands
Hing Leung, UK
William Lynch, Australia
Robert Pickard, UK
Pradeep Rao, India
Saeed Samnakay, Kenya
Richard Santucci, USA
John Seigne, USA

CERTIFICATE OF PRESENTATION

This document certifies that

Alexandre Iscaife

presented

Micro RNA 100, 145 and 373 in Prostate Cancer:
From Gene Regulation to Apoptosis

as an

Unmoderated ePoster Presentation

at the 34th Congress of the SIU in Glasgow, Scotland
held October 12-15, 2014.

We would like to thank all of our presenters for contributing to the success of this year's scientific programme.

Inderbir S. Gill, MD
Chair, Scientific Programme Committee
34th SIU Congress

Margit Fish, MD
Adjunct Chair, Scientific Programme Committee
34th SIU Congress

SIU CENTRAL OFFICE

1155 University Street, Suite 1012, Montreal, QC, Canada H3B 3A7 Tel: +1 514 875 5665 Fax: +1 514 875 0205 | congress@siu-urology.org | www.siucongress.org

CERTIFICADO

Certificate

**ALEXANDRE ISCAIFE; DENIS REIS MORAIS; NAYARA IZABEL VIANA; SABRINA THALITA DOS REIS;
MIGUEL SROUGI; KATIA RAMOS MOREIRA LEITE.**

Apresentaram o Trabalho com o Título:

MICRO RNA E APOPTOSE NO CÂNCER DE PRÓSTATA na Sessão **APRESENTAÇÃO PÓDIUM (ORAL)**
durante o **XXXIV Congresso Brasileiro de Urologia**, realizado no período de 16 a 20 de novembro de 2013,
no Centro de Convenções de Natal – RN.

Natal, 20 de Novembro de 2013.

Iniciativa e Realização
Initiative and Carried By

Aguinaldo Cesar Nardi
Presidente da SBU
President of SBU

Valdemar Ortiz
Presidente da Comissão Científica do XXXIV Congresso Brasileiro de Urologia
President of Cientific Committee of XXXIV Brazilian Congress of Urology

Detailed Status Information

Manuscript #	MT-I-16-213
Current Revision #	0
Submission Date	6th Apr 16 00:11:21
Current Stage	Under Consideration
Title	The Use of MicroRNA-145 for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer
Running Title	The microRNA 145 reduces prostate cancer growth
Manuscript Type	Original Article
Special Section	N/A
Corresponding Author	Alexandre Iscaife (iscaifeboni@yahoo.com.br) (University of Sao Paulo Medical School)
Contributing Authors	Sabrina Reis , Denis Moraes , Nayara Viana , Iran Silva , Andre Bordini , Nelson Dip , Miguel Srougi , Katia Leite
Abstract	<p>Prostate cancer is an incurable disease at the metastatic stage. Although there are different options of treatment, the results are limited. MicroRNAs (miRNAs) are a group of small, noncoding, regulatory RNAs with important roles in regulating gene expression. miR-145 is reported to be a key tumor suppressor miRNA that controls important oncogenes, such as MYC and RAS. In this study we evaluated the efficacy of miR-145 in treating metastatic prostate cancer in an animal model using nude mice injected with PC-3MLuc-C6 cells in the left ventricle. Tumor growth was evaluated using an in vivo bioluminescence system (IVIS). After the full establishment of metastases on day 21, six animals were treated with miR-145 and six were injected with scramble miRNA as the control. The injections were repeated on days 24 and 27. Compared to the controls, tumor growth was significantly reduced in animals treated with miR-145. After treatment with miR-145 was discontinued, tumor growth resumed. Thus, we demonstrated that miR-145 acts as a tumor suppressor in prostate cancer and has therapeutic efficacy in an in vivo model of metastatic disease. Therefore, miR-145 might be a promising therapeutic option for treating castration-resistant prostate cancer.</p>
Deputy Editor	Not Assigned

Title: The Use of MicroRNA-145 for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer

Authors: Alexandre Iscaife¹, Sabrina Thalita Reis¹, Denis Reis Moraes¹, Nayara Izabel Viana¹, Iran Amorim da Silva¹, Andre Bordini¹, Nelson Dip¹, Miguel Srougi¹, Katia Ramos Moreira Leite¹

Affiliations: ¹Laboratory of Medical Research – LIM 55, Urology, University of Sao Paulo Medical School – Sao Paulo - Brazil

Short title: The microRNA 145 reduces prostate cancer growth

Correspondence should be addressed to A.I.:

Alexandre Iscaife
Av. Dr Arnaldo, 455, sala 2145 - Sao Paulo – Brazil
55-11-30617183
iscaifeboni@yahoo.com.br

Abstract:

Prostate cancer (PCa) is an incurable disease at the metastatic stage. Although there are different options of treatment, the results are limited. MicroRNAs (miRNAs) are a group of small, noncoding, regulatory RNAs with important roles in regulating gene expression. miR-145 is reported to be a key tumor suppressor miRNA (tsmiR) that controls important oncogenes, such as MYC and RAS. In this study we evaluated the efficacy of miR-145 in treating metastatic PCa in an animal model using nude mice injected with PC-3MLuc-C6 cells in the left ventricle. Tumor growth was evaluated using an in vivo bioluminescence system (IVIS). After the full establishment of metastases on day 21, six animals were treated with miR-145 and six were injected with scramble miRNA as the control. The injections were repeated on days 24 and 27. Compared to the controls, tumor growth was significantly reduced in animals treated with miR-145. After treatment with miR-145 was discontinued, tumor growth resumed. Thus, we demonstrated that miR-145 acts as a tumor suppressor in PCa and has therapeutic efficacy in an in vivo model of metastatic disease. Therefore, miR-145 might be a promising therapeutic option for treating castration-resistant PCa.

Introduction

Nearly 14% of men are diagnosed with prostate cancer (PCa) during their life time, and 3% will die of the disease. Although the 5-year overall survival of PCa is approximately 100%, the rate drops to 28% if PCa progresses to the metastatic stage (1).

The treatment for metastatic PCa is based on blocking androgen signaling, and this approach is typically effective for an average of 3 years. After this time, several mechanisms promote tumor growth, although serum testosterone levels remains low. This phase of PCa, referred to as castration-resistant disease, presents great challenges, and there is an unmet need for the development of new and effective treatments.

MicroRNAs (miRNAs) are a group of small noncoding regulatory RNAs 19 to 25 nucleotides in length that play fundamental roles in the regulation of gene expression (2). They are involved in the regulation of multiple cellular processes, including proliferation, differentiation, cellular stress responses and apoptosis. miRNAs can act as tumor suppressor genes or oncogenes depending on their targets, and changes in the biogenesis and expression of miRNAs is associated with tumor progression in several neoplasias.

The first description of the involvement of miRNAs in cancer was reported by Calin et al, who revealed that miR-15a and miR-16 expression is lost in B cell lymphomas and leukemias as a result of the deletion of the long arm of chromosome 13. miR-15a and miR-16 target BCL2, an important anti-apoptosis gene. Therefore, the loss of miR-15a and miR-16 expression contributes to the development and progression of cancer (3).

Few studies evaluating the use of miRNAs for the treatment of PCa in animal models have been reported. However, miRNA treatment by local or systemic injection has been shown to reduce tumor growth and invasion and to sensitize tumors to cytotoxic drugs or immunotherapy (4).

In 2008, Mercatelli et al. demonstrated that the subcutaneous injection of anti-miR-221/222 in a localized prostate cancer animal model reduced tumor growth (5). Takeshita et al. evaluated a model of prostate cancer with bone metastases using an in vivo image detection apparatus to analyze systemic treatment with miR-16, and the study demonstrated promising results (6, 7).

The expression of miR-145, which is located on chromosome 5, is induced by p53 mainly under conditions of cellular stress. miR-145 was previously described as a tumor suppressor miRNA in colon, breast, pancreatic and prostate cancers (8).

miR-145 acts as a tumor suppressor by inhibiting the critical oncogenes MYC, KRAS, IRS-1 and ERK5, and miR-145 is downregulated in PCa tissues and cell lines (9-12).

The aim of this study was to analyze the use of miR-145 as a therapeutic agent to treat metastatic PCa in an animal model.

Results

In vitro studies

Treatment with miR-145 increased apoptosis by 24% in DU145 cells ($p=0.008$) compared with the control, and no changes in apoptosis were observed in LNCaP or PC3 cells treated with miR-145. In PC3 cells, miR-145 inhibited proliferation by 18% compared with the control ($p=0.01$) (Table 1).

DU145 cells treated with miR-145 showed a 48% reduction in the expression of CMYC, and DU145 cells treated with anti-miR-145 treatment had an 82% increase in CMYC expression ($p=0.08$). In the LNCaP cells, miR-145 treatment reduced CMYC expression by 29%, whereas anti-miR-145 treatment increased CMYC expression by 15% ($p=0.056$). In PC3 cells, miR-145 reduced CMYC expression by 35% ($p=0.136$).

The expression of KRAS decreased by 49% in DU145 cells treated with miR-145 and increased by 82% in DU145 cells treated with anti-miR-145 ($p=0.105$). KRAS expression decreased by 57% in LNCaP cells treated with miR-145 and increased by 13% in LNCaP cells treated with anti-miR-145 ($p=0.012$). KRAS expression decreased by 32% in PC3 cells treated with miR-145 and increased by 18% in PC3 cells treated with anti-miR-145 ($p=0.013$) (Table 2).

In vivo studies

Animals injected with tumor cells developed multiple metastases, primarily in the mandible, ribs, ilium and femur bones. Metastases to solid organs were also identified in the lungs, adrenal and in the liver.

Treatment with miR-145 decreased the rate of tumor growth as seen in the bioluminescence emission curves (Figure 3). The reduction in the growth rate was first

observed after the initial dose, and maximal growth inhibition was observed on day 34, 7 days after the discontinuation of treatment. On day 34, bioluminescence in the treated group decreased nearly 6-fold compared with the control group, and this difference was statistically significant ($p=0.04$). However, the inhibitory effect on growth was transient, and, after day 34, tumor growth resumed at the same rate as the control group. Toward the end of the experiment, tumor growth in the miR-145-treated group surpassed the rate observed in the control group. The values plotted in the graph (Figure 3) are normalized to the intensity of bioluminescence on day 21 when treatment was initiated. Each value represents the number of times the tumor increased photon emission relative to day 21 (value= $Dx/D21$). This comparison revealed that metastases in the control animals spread substantially and that the size and location of the lesions in the miR-145-treated animals remained relatively stable.

Weight loss was observed in both groups, although greater weight loss was observed in the control group. There was mean loss of 20% of initial body weight in the control group versus 16% in animals treated with miR-145.

In both groups, the necropsy examination revealed diffuse metastases in the bones, lungs and, less frequently, in the liver, lung and adrenal gland. There were no signs of toxicity observed in histological examinations of the lung, liver and kidney.

Discussion

In previous studies, we evaluated the expression of miRNAs associated with various stages of prostate cancer progression, from high grade prostate intraepithelial neoplasia to metastatic disease. We observed a loss of expression of multiple miRNAs during tumor progression miR-145(8, 12). Similar results were observed using a microarray technique and genome-wide association analysis (GWA) in radical prostatectomy specimens. miR-145 was downregulated in patients who had experienced biochemical relapse after undergoing a prostatectomy (14).

These findings prompted us to further evaluate miR-145 in vitro and in vivo .The in vitro studies confirmed that miR-145 acts as a tumor suppressor miRNA (tsmiRNA) by inhibiting the expression of the CMyc and KRAS oncogenes in the three cell lines evaluated, inducing apoptosis in DU145 cells and inhibiting proliferation in PC3 cells.

The expression of miR-145, located on chromosome 5, is induced by p53 primarily in response to cellular stress. p53 is considered a key tumor suppressor in various tumors, including those in the colon, breast, pancreas, and prostate, and some studies have described p53 as a suppressor of metastasis. miR-145 targets several genes, including CMYC, KRAS, IRS-1, ERK5, and is downregulated in PCa tissues and PCa cell lines (9-12).

This is the first study to show therapeutic activity of miR-145 in PCa animal model. We showed a decrease in tumor growth during the miR-145 treatment and that tumor growth resumed when the treatment was discontinued. This pattern is similar to that observed with other target drugs, such as those associated with tyrosine kinase signaling and the mTOR pathway.

Some aspects related with the design of the study had the potential to influence the final results. A previous study published by Takeshita et al. (6) evaluated the efficacy of miR-16 in a metastatic PCa model. In this study, the animals were injected with the tumor on day 0 and miRNA treatment was administered via the tail vein on days 4, 7 and 10, before the metastatic spread. One potential drawback of this experiment was that it is not clear that metastasis was successfully induced. In our model, treatment was initiated after metastasis had developed, ensuring that any changes in tumor behavior were due to the miRNA treatment.

We believe that the model used in this study more closely resembles metastatic PCa in humans, and the results are similar to what was expected for a targeted therapy.

In a report published by Garcia et al., tumor prevention, rather than tumor treatment, was the focus of the study. Using the same model, they studied the effect of COX2 inhibitors in PCa by injecting the drug 1 week prior to injection of tumor cells and evaluating treatment response weekly using bioluminescence (15). However, verifying the successful induction of metastatic neoplasia is required to accurately evaluate the efficacy of a drug in treating metastasis.

Our experience with the model used in this study is that the successful induction of cancer cannot be accurately assessed until approximately 14 days after the injection of tumor cells; therefore, treatment efficacy cannot be accurately assessed until this time. As a result, we chose to verify the presence of metastatic disease prior to initiating the treatment.

Metastatic disease was observed in 100% of animals on day 21; therefore, we initiated treatment at this time to ensure that changes in tumor growth resulted from the therapeutic intervention. Although this model might be perceived as a faithful reproduction of human metastatic disease, clinical application of miR-145 is still limited at this time. An

alternative approach to miR-145 treatment that might enhance treatment efficacy would be to perform imaging exams every day and initiate treatment when metastases are first observed.

Although the effect of miR-145 was limited, it was similar to what has been observed with other targeted therapies used to treat metastatic PCa, namely that tumor growth is inhibited during treatment and that tumor growth resumes after treatment discontinuation (16-19).

The animals in this study were administered 3 doses of treatment at intervals of 3 days. Prolonged treatment might have continued to suppress tumor growth, but the fragility of the tail vein precludes the evaluation of the treatment over a prolonged period of time.

No standards for the appropriate dose or duration of treatment have been reported due to a lack of studies, and no pharmacodynamic or pharmacokinetic data have been reported to date. We used a dose of 3 mg/kg of highly purified miRNA in this study, which is the same used in the *in vivo* experiments reported by Takeshita (6). We believe that higher doses and prolonged treatment might inhibit tumor growth for a longer period of time and might even promote disease regression.

The evaluation of organs using microscopy did not reveal any hepatic, renal or lung lesions, which we inferred as an absence of treatment-associated toxicity. In future studies, biochemical exams should be performed to evaluate the safety parameters associated with systemic injections.

In conclusion, for the first time, we showed therapeutic activity of the tumor suppressor miR-145 in treating metastatic prostate cancer. In the future, it could be used as monotherapy or as a component of combination therapy to treat metastatic prostate cancer.

Materials and Methods

***In vitro* studies**

The metastatic prostate cancer cell lines DU145 (brain metastasis), PC3 (bone metastasis) and LNCaP (lymph node metastasis) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) and cultured in DMEM, RPMI and MEM medium, respectively. The cell line PC-3M-luc-C6 was acquired from Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA, USA) and cultured in MEM medium supplemented with glutamine.

The cell lines were transfected with miR-145, anti-miR-145 or the negative control (scramble miRNA) using the transfection agent Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, MA USA). The cell transfections of Pre-miRTM and Anti-miRTM were conducted according to the Pre-miRTM miRNA Precursor protocol (Ambion, Austin, TX, USA). We analyzed the expression of the KRAS (Hs00364284_g1) and CMYC (Hs00153408_m1) genes using qRT-PCR.

We used a flow cytometer (Attune Flow Cytometer) with the Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (BD PharmingenTM - 556547) and cell cycle distribution with propidium iodide (PI). Cell invasion potential was analyzed using a BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Becton Dickinson, Bedford, MA) coated with Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Tumor induction

The study was approved by the Ethics and Animal Research Committee of our institution.

Male athymic nude (Balb/c) mice 9 to 11 weeks of age were anesthetized with 50-70 μ l of ketamine and lidocaine. Tumor cells were administered via a left ventricular intra-cardiac injection of 100 μ l of a Dulbecco's PBS sterile solution containing 2×10^6 PC-3M-luc-C6 cells using a 1 cc syringe and a 30G/6 mm needle (BD®).

The puncture was performed In the 3rd/4th left intercostal space, 3 mm lateral to the sternum and 15 degrees from the horizontal plane with the needle directed towards the animal's left shoulder (Figure 1).

D-luciferin (Promega) (5 mg/kg) was injected into the peritoneum immediately after the intra-cardiac injection, and the dissemination of the cells was confirmed using the IVIS equipment (Xenogen - IVIS® Spectrum). The animals were used for further analysis if D-luciferin injections revealed that more than 90% of the body was bioluminescent. The animals were then examined weekly using the IVIS system, with day 0 (D0) designated as the day of the intra-ventricular injection. Metastases were detected at approximately week 3 (D21), and animals presenting with diffuse metastasis were subjected to the experimental treatments.

miR-145 treatment

Atelocollagen (Koken®, Tokyo, Japan) was used to stabilize the miRNA as previously described (7). The treatment solution comprised equal volumes of miR-145 and atelocollagen (0.1% in PBS, pH 7.4) at a final concentration of 0.05% (13). On days 21, 24 and 27 following the injection of the tumor cells, 200 μ l solution containing 3 mg/kg of miRNA plus atelocollagen was injected into the tail veins of the animals. Six animals were injected with miR-145, and six were injected with the scramble miRNA negative control.

The animals were examined weekly using IVIS and the photons were counted as previously described (7). On day 48, the animals were euthanized and their organs were analyzed using microscopy. The study design is illustrated in Figure 2.

Statistical analysis

A statistical analysis was performed using SPSS 19.0 software (IBM Corp. Armonk, NY). Differences between transfected cells and controls related to gene expression (calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$), proliferation and apoptosis were analyzed by Student's *t* test for parametric data and the Mann-Whitney U test for non-parametric data. The tumor growth was analyzed by Student's *t* test for each day comparing treated and controls. For all statistical analyzes, we considered a level of significance of 5% ($P < 0.05$).

References

1. U.S. Department of Health and Human Services, NIOH, National Cancer Institute (2015). U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute. vol. 2014: USA.
2. Kim, VN, Han, J, and Siomi, MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 126-139.
3. Calin, GA, Dumitru, CD, Shimizu, M, Bichi, R, Zupo, S, Noch, E, *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15524-15529.
4. Melo, SA, and Kalluri, R (2012). Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 4234-4239.
5. Mercatelli, N, Coppola, V, Bonci, D, Miele, F, Costantini, A, Guadagnoli, M, *et al.* (2008). The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One* **3**: e4029.
6. Takeshita, F, Patrawala, L, Osaki, M, Takahashi, RU, Yamamoto, Y, Kosaka, N, *et al.* (2010). Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* **18**: 181-187.
7. Takeshita, F, Minakuchi, Y, Nagahara, S, Honma, K, Sasaki, H, Hirai, K, *et al.* (2005). Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12177-12182.
8. Leite, KR, Tomiyama, A, Reis, ST, Sousa-Canavez, JM, Sanudo, A, Camara-Lopes, LH, *et al.* (2011). MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer-from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. *Urologic oncology*.
9. Fang, Z, and Rajewsky, N (2011). The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One* **6**: e18067.
10. Zaman, MS, Chen, Y, Deng, G, Shahryari, V, Suh, SO, Saini, S, *et al.* (2010). The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer* **103**: 256-264.
11. Sachdeva, M, Liu, Q, Cao, J, Lu, Z, and Mo, YY (2012). Negative regulation of miR-145 by C/EBP-beta through the Akt pathway in cancer cells. *Nucleic Acids Res* **40**: 6683-6692.
12. Leite, KR, Sousa-Canavez, JM, Reis, ST, Tomiyama, AH, Camara-Lopes, LH, Sanudo, A, *et al.* (2011). Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol* **29**: 265-269.
13. Minakuchi, Y, Takeshita, F, Kosaka, N, Sasaki, H, Yamamoto, Y, Kouno, M, *et al.* (2004). Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**: e109.
14. Leite, KR, Reis, ST, Viana, N, Morais, DR, Moura, CM, Silva, IA, *et al.* (2015). Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *J Cancer* **6**: 292-301.
15. Garcia, M, Velez, R, Romagosa, C, Majem, B, Pedrola, N, Olivan, M, *et al.* (2014). Cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumour progression of prostate cancer bone metastases in nude mice. *BJU Int* **113**: E164-177.

16. Tiacci, E, Park, JH, De Carolis, L, Chung, SS, Broccoli, A, Scott, S, *et al.* (2015). Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med* **373**: 1733-1747.
17. Oudard, S, and Vano, Y (2015). The role of rechallenge with targeted therapies in metastatic renal-cell carcinoma. *Curr Opin Urol* **25**: 402-410.
18. Wei, EY, and Hsieh, JJ (2015). A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. *Nat Rev Urol* **12**: 706-712.
19. Hudes, G, Carducci, M, Tomczak, P, Dutcher, J, Figlin, R, Kapoor, A, *et al.* (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**: 2271-2281.

Acknowledgments: We thank Mara Sa Junqueira for the support with the animals. We thank Cristina Massocco Sales Gomes and Rodrigo Tannura for technical support with cell cycle. We thank Hernandes Faustino Carvalho for important reagents. We thank Jose Pontes Junior and Marcia Kubrusly for the critical reading of the manuscript. This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants #2012/21966-8 and #2013/07350-7. A.I.: Designed and performed experiments, analyzed data, performed statistical analysis and writing the manuscript. S.T.R.: Designed experiments and participated in writing the manuscript. D.R.M.: Performed experiments. N.I.V.: Performed experiments. I.A.S.: Performed experiments. A.B.: Participating in writing the manuscript. N.D.: Designed experiments. M.S.: Designed experiments, analyzed data and writing the manuscript. K.R.M.L.: Designed experiments, analyzed data and writing the manuscript.

Competing interests: There is no competing interests. **Data and materials availability:** All animals, images of bioluminescence and complete protocols are in the archives of the laboratory LIM55 at the University of Sao Paulo and will be available to academic researchers.

Figure legends

Figure 1. Intra-cardiac injections. **(a)** We injected 2×10^6 cells under the third left rib 45° using a 30G needle pointed towards the right shoulder. **(b)** Axial view of the injection. **(c)** The angle was held at 15° with respect to the horizontal plane. RV: Right ventricle, LV: Left ventricle.

Figure 2. Study design. On Day 0 animals received 2.10^6 PC3-luc-C6 cells in the left ventricle under general anesthesia. The animals were analyzed every week and the treatment begins on day 21. After 3 injections on days 21, 24 and 27 the animals were followed up with weekly images until day 48.

Figure 3. **(a)** Temporal analysis of the relative bioluminescence for the groups treated with miR-145 (N=6) and the negative control (N=6). Normalized data (post-treatment/pre-treatment) are presented. **(b)** An example of 2 nude mice (Balb/c) representative of the miR-145-treated animals and the control animals. * $p < 0.05$.

Table 1. Flow cytometer analysis of treated cells with miR-145

	Apoptosis	p	Proliferation	p
PC3	-	-	- 17%	0.01
DU145	+24%	0.01	+6%	0.44
LNCaP	+5%	0.65	-	-

- no variation

Table 2. Gene expression of target genes in the treated cells with miR-145

Relative Gene expression	cMYC	p	kRAS	p
PC3	0.67	0.13	0.68	0.013
DU145	0.62	0.81	0.51	0.10
LNCaP	0.71	0.05	0.43	0.012

a

b

c