RENAN ÉBOLI LOPES

**Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos
miRNAs 100 e 146a como fatores prognósticos do câncer de
próstata**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 novembro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Éboli-Lopes, Renan
Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único
(SNPs) dos miRNAs 100 e 146a como fatores
prognósticos do câncer de próstata / Renan Éboli-Lopes.
-- São Paulo, 2020.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Polimorfismo de
nucleotídeo único 3.Neoplasias da próstata
4.Prognóstico 5.Biologia molecular 6.Sequência de
bases

USP/FM/DEB- 296/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus filhos: Ricardo e
Maria Fernanda que são minha principal
inspiração na busca incessante pelo crescimento
pessoal e profissional.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelas bênçãos e saúde da minha família, amigos e pacientes.

Aos meus pais: Roberto de Assis Lopes (*in memoriam*) e Kátia Carmen Éboli Lopes, que sempre me inspiraram a partir do exemplo e dedicação ao trabalho e estudos. Vocês não mediram esforços pela minha felicidade. Obrigado pelas oportunidades para atingir e almejar grandes objetivos. Vocês sempre serão o meu maior exemplo.

À minha Esposa, Lígia Carvalho Éboli, pela constante dedicação, amor e parceria nesses 16 anos de união. Você me deu os nossos maiores presentes e um grande sentido para seguir desafiando meus limites. Você nunca deixou de acreditar em mim e foi minha maior incentivadora neste projeto. Obrigado pelo apoio nos momentos mais difíceis, pela sua abdicação em cuidar da nossa família e também pela companhia nos melhores momentos da minha vida. Te Amo!

À minha irmã, Karine Éboli, que não mediu esforços em me ajudar na confecção dessa tese e que sempre foi uma grande incentivadora do meu trabalho. Você cresceu e hoje é um grande exemplo para todos nós.

Ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, meu orientador e amigo, por ter sempre acreditado e confiado em meu trabalho, sobretudo nos momentos de revezes e incertezas que percorremos nessa jornada. Obrigado pelo acolhimento, respeito e atenção a mim e toda minha família. Você será sempre um grande exemplo.

À Prof^a. Dr^a. Sabrina T. Reis, minha coorientadora e amiga, que sempre a se mostrou disponível, atenciosa e comprometida com a realização desta tese. Obrigado por ser a idealizadora e maetrina dessa tese. Você é fonte de inspiração para todos que te cercam.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, por através do exemplo, nos trazer ensinamentos de humildade, dedicação e cuidado aos pacientes, assim como a importância da absoluta busca da verdade através da ciência. Seus ensinamentos não serão esquecidos.

À Dra. Nayara Viana, que com seu jeito meigo e acolhedor, sempre se mostrou solícita às minhas preocupações e foi fundamental para que essa tese fosse realizada e entregue.

À Me. Juliana Camargo, que se dedicou a este estudo com atividades de bancada assim como na produção e elaboração do manuscrito, deixo minha sincera gratidão.

À Prof.^a. Dr^a. Katia Ramos Moreira Leite, pela oportunidade de realizar a pesquisa no LIM55 e pelos valorosos ensinamentos.

A todos amigos do LIM: Iran Amorim Silva, Vanessa Guimarães e ao Ruan Pimenta, que sempre foram tão solícitos e atenciosos com minhas demandas e preocupações.

Aos meus mestres e mentores: Dr Adriano Calado e Dr Miguel Zerati, fontes de inspiração, dedicação e responsabilidade. Sempre me espelharei em vocês.

Aos meus amigos de Recife e São Paulo que constantemente me dão força, segurança e inspiração para seguir com meus objetivos e sonhos.

À minha família, tios, primos e agregados, que sempre demonstraram respeito e consideração pelo meu trabalho. Que me trouxeram amizade, conforto e segurança nos momentos difíceis assim como alegria e boas risadas nos momentos de descontração.

Aos meus pacientes que todos os dias me motivam com sua confiança, respeito e carinho, permitindo meu desenvolvimento profissional e sobretudo como ser humano.

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 tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
<i>Abstract</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O Câncer de Próstata.....	14
1.2 Diagnóstico do CaP.....	15
1.3 Prognóstico e tratamento.....	17
1.4 O microRNA.....	20
1.5 O microRNA e o Câncer de Próstata.....	24
1.6 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).....	27
1.7 Justificativa.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
3. MÉTODOS.....	33
3.1 Pacientes.....	34
3.2 Extração de DNA.....	35
3.3 Análise dos genótipos por PCR em tempo real quantitativo.....	36
3.4 Isolamento do microRNA.....	38
3.5 Síntese do DNA complementar.....	39
3.6 Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real quantitativo.	40
3.7 Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Análise dos SNPs – miR100 e miR146a.....	43
4.2 Análise da expressão do miR100.....	53
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	64
7. ANEXO.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	69

Lista de abreviaturas

AJJC – American Joint Committee on Cancer

CaP – Câncer de Próstata

CAPESURE – Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor

FDA – Food and Drug Administration

FMUSP – Faculdade de Medicina da USP

GWAS – Estudos de associação do genoma

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

IC – Intervalo de Confiança

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISUP – International Society of Urothology

LIM55 – Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia

miR- micro RNA

MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

OR – Odds Ratio

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PHI – Prostate Health Index

PHS – Pontuação de risco poligênico

PSA – Antígeno Prostático Específico

RISK complex – RNA-induced silencing complex

RNA_m – RNA mensageiro

SARS-CoV2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SNPs – Polimorfismos de Nucleotídeo Único

svRNAs – RNAs virais

VA – Vigilância ativa

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Estratificação de Risco do CaP – NCCN v2.2020.....	18
Tabela 2 -	Polimorfismos selecionados para análise.....	35
Tabela 3 -	Distribuição dos genótipos dos 2 polimorfismos nos pacientes diagnosticados com CaP e nos indivíduos do grupo controle.....	43
Tabela 4 -	Distribuição dos alelos dos dois polimorfismos entre os pacientes com CaP e grupo controle.....	44
Tabela 5 -	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos em relação ao nível de PSA pré-operatório.....	45
Tabela 6 -	Distribuição dos alelos em relação ao nível de PSA pré- operatório.....	45
Tabela 7 -	Distribuição dos genótipos em relação ao escore de Gleason na peça.....	46
Tabela 8 -	Distribuição dos alelos em relação ao escore de Gleason na peça.....	46
Tabela 9 -	Distribuição dos genótipos em relação ao estadiamento patológico.....	47
Tabela 10 -	Distribuição dos alelos em relação ao estadiamento patológico.....	47
Tabela 11 -	Distribuição dos genótipos em relação a recidiva bioquímica.....	48
Tabela 12 -	Distribuição dos alelos em relação a recidiva bioquímica.....	48
Tabela 13 -	Distribuição dos genótipos e tempo médio de sobrevida livre de recidiva.....	49
Tabela 14 -	Distribuição dos alelos e tempo médio de sobrevida livre de recidiva.....	51

Lista de Figuras

Figura 1 -	Biogênese do miR.....	21
Figura 2 -	Número de publicações anuais no PubMed com os seguintes termos: <i>liquid biopsy</i> , <i>circulating tumor cells</i> , <i>cell free DNA</i> , <i>circulating tumor DNA</i> , <i>exomes</i> e <i>microRNA</i>	23
Figura 3 -	Sistema <i>TaqMan</i> [®] : Identificação de base com uso de sondas marcadas com fluoróforos.....	38
Figura 4 -	Curva de Kaplan-Meier de acordo com os genótipos para o SNP rs1834306 – miR100.....	50
Figura 5 -	Curva de Kaplan-Meier de acordo com os genótipos para o SNP rs2910164 – miR146a.....	51
Figura 6 -	Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença do alelo polimórfico do SNP rs1834306 – miR100.....	52
Figura 7 -	Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença do alelo polimórfico do SNP rs2910164 – miR146a.....	53
Figura 8 -	Expressão do miR100 em homens portadores de CaP e em homens saudáveis.....	54
Figura 9 -	Expressão do miR100 em homens portadores de CaP e sua correlação com fatores prognósticos clássicos.....	54
Figura 10 -	Expressão do miR100 categorizada por genótipos.....	55

Resumo

Eboli-Lopes R. *Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos miRNAs 100 e 146a como fatores prognósticos do câncer de próstata* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: O câncer de próstata (CaP) é o de maior incidência entre os homens, entre os não cutâneos, e o segundo em causa de morte. Entretanto os fatores prognósticos clássicos ainda se mostram limitados na categorização de risco dos pacientes portadores de CaP. O micro RNA (miRNA) é uma cadeia pequena de RNA não codificante com cerca de 18 - 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores ou promotores de genes alvo, sendo, portanto, um potencial novo fator prognóstico para o CaP. Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) são os polimorfismos mais comuns na natureza e caracterizados por uma troca única de base nitrogenada no DNA. Este polimorfismo pode estar presente nos miRNAs alterando sua função. **OBJETIVO:** avaliar o papel do polimorfismo de nucleotídeo único rs1834306 no miR100 e rs2910164 no miR146a no desenvolvimento e prognóstico do CaP e avaliar a expressão do miR100 nas amostras de pacientes com CaP e em homens saudáveis e sua correlação com os fatores prognósticos. **MÉTODOS:** Em um estudo caso-controle, foram selecionados 100 pacientes diagnosticados com CaP e 68 controles composto por pacientes saudáveis e sem câncer de próstata. A identificação do SNP foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR) a partir do sangue da amostra e realizada a análise entre a presença do SNP e variáveis prognósticas. **RESULTADOS:** Não foi identificada diferença estatística significativa entre os grupos para nenhum dos dois SNPs dos miRNAs estudados. No SNP rs1834306 (miR100) foi identificada menor presença do genótipo homozigoto polimórfico em pacientes com PSA >10ng/ml, (OR=0,12; IC: 0,01-1,04; p=0,03) e ao avaliar apenas a presença do alelo polimórfico G (OR=0,21; IC: 0,60-0,73 ; p=0,09) quando comparado com a presença do alelo selvagem A. Dentre os pacientes com CaP o SNP rs2910164 (miR146A), o alelo polimórfico foi mais frequente em pacientes com Gleason ≥ 7 em relação a pacientes com escore de Gleason <7, (OR: 3,19 IC: [1,00 – 10,15]; p= 0,043). Os genótipos homozigotos polimórficos dos dois SNPs estudados mostraram uma tendência a menor tempo de sobrevida livre de recidiva bioquímica da doença, apesar da ausência de significância estatística. Dentre homens com CaP, o miR100 mostrou-se superexpresso naqueles com estadiamento pT3 em comparação aos pT2 e entre os que apresentaram recidiva bioquímica (p=0,004 e p=0,011 respectivamente). **CONCLUSÕES:** A presença do SNP rs2910164 no miR146a atua como um polimorfismo de mau prognóstico (Gleason ≥ 7). O rs1834306 no miR100 está associado a dados de melhor prognóstico (PSA<10). O miR100 foi superexpresso naqueles pacientes portadores de CaP com piores fatores prognósticos.

Descritores: MicroRNAs; Polimorfismo de nucleotídeo único; Neoplasias da próstata; Prognóstico; Biologia molecular; Sequência de bases.

Abstract

Eboli-Lopes R. *The role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of MiRNAs 100 and 146a as prognostic factors for prostate cancer* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: Prostate cancer (PCa) is the highest incidence tumor among men and the second cause of death. However, the classical prognostic factors are still limited in the risk categorization of patients with PCa. The micro RNA (miRNA) is a small chain of the non-coding RNA with about 18-22 nucleotides, which its main function is to act as silencers or promoters of the target genes, becoming a potential new prognostic factor for PCa. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are the most common polymorphisms in nature and characterized by a single exchange of nitrogen based in the DNA. This polymorphism may be present in the miRNAs altering its function. **OBJECTIVE:** To evaluate the role of single nucleotide polymorphism rs1834306 in the miR100 and rs2910164 in the miR146a in the development and prognosis of PCa. **METHODS:** In a case-control study, 100 patients diagnosed with PCa and 68 controls were selected. The identification of SNP was carried out by real time quantitative polymerase chain reaction (PCR) from blood samples and the analysis was performed among the presence of SNP and the prognostic variables. **RESULTS:** No significant statistical difference was identified among the groups for either of the two miRNAs studied. In SNP rs1834306 (miR100), a smaller presence of the polymorphic homozygous genotype was identified in patients with PSA>10ng / ml, (OR=0.12; CI: 0.01-1.04; p=0.03) and when evaluating only the presence of the polymorphic allele G (OR=0.21, CI: 0.60-0.73, p=0.09) it was compared to the presence of the wild type allele A. Among the patients with PCa, SNP rs2910164 (miR146A), the polymorphic allele was more frequent in patients with Gleason ≥ 7 than in patients with Gleason score < 7 , (OR:3.19 CI: [1.00-10.15], p=0.043). The polymorphic homozygous genotypes of the two SNPs studied were related to a shorter survival time free of biochemical recurrence of the disease. Among men with PCa, miR100 was overexpressed in those with pT3 staging compared to pT2 and among those who had biochemical recurrence (p = 0.004 and p = 0.011 respectively). **CONCLUSIONS:** The presence of SNP rs2910164 in miR146a acts as a poor prognostic polymorphism (Gleason ≥ 7). The rs1834306 in miR100 is linked to better prognostic data (PSA<10). MiR100 was overexpressed in PCa patients with worse prognostic factors.

Descriptors: MicroRNAs; Single nucleotide polymorphism; Prostatic neoplasms; Prognosis; Molecular biology; Base sequence.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é o tumor não cutâneo mais comum no homem. Estima-se que só nos EUA, em 2020, surgiram aproximadamente 191.930 novos casos diagnosticados e 33.330 mortes por essa patologia.¹ De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), este tumor apresentou incidência de 65.840 homens apenas em 2020 no Brasil.²

Alguns fatores de risco dessa patologia já estão bem estabelecidos, como idade, história familiar e raça negra. O CaP raramente é diagnosticado antes dos 50 anos, apenas 2% dos casos, e a média de idade ao diagnóstico é 68 anos com 63% diagnosticados após 65 anos.³ A presença do pai afetado pela doença aumenta em duas vezes a chance de CaP e o diagnóstico de 2 familiares de primeiro grau aumenta em cinco vezes esta probabilidade.⁴ Homens negros possuem maior risco de desenvolver CaP, e possuem piores desfechos oncológicos e doença mais agressiva quando comparados a homens brancos.⁵

Atualmente alguns estudos têm evidenciado associação da síndrome metabólica com aumento da incidência de CaP, inclusive com os de alto grau.^{6,7}

O antígeno prostático específico (PSA) é uma glicoproteína secretada por células prostáticas epiteliais e atua na liquefação do líquido seminal. Originalmente, foi descrito em estudos forenses que o utilizavam como marcador do sêmen humano.⁸ Posteriormente, foi descoberta sua presença na Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e no tecido prostático maligno,⁹ e na década de 1980 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado na monitorização do CaP.¹⁰

A partir do uso rotineiro do PSA houve, na primeira década, um aumento expressivo no diagnóstico do CaP. Atualmente a incidência está com números próximos da era pré-PSA, entretanto com diminuição em 80% do número de pacientes com metástase ao diagnóstico.¹¹

1.2 Diagnóstico do CaP

Classicamente as variáveis mais utilizadas para avaliar diagnóstico do paciente com CaP são o PSA e o toque retal. Entretanto o PSA não é um marcador específico do câncer, podendo elevar-se em situações diversas como prostatite, retenção urinária e manipulações cirúrgicas. Além disso sabemos que cerca de 1/5 dos pacientes com câncer não apresenta elevações dos seus níveis séricos.³ Portanto o uso isolado dessas duas variáveis possuem severas limitações no diagnóstico e em especial na definição do prognóstico.

A despeito dos avanços trazidos com a larga utilização do PSA, o super diagnóstico e principalmente o super tratamento tornaram-se um desafio à comunidade urológica. Logo, nos últimos anos, vem crescendo o número de ferramentas na investigação dos pacientes com o objetivo de aumentar a acurácia do diagnóstico de tumores clinicamente relevantes.

O PCA3 é um RNA não codificado, localizado no cromossomo 9q21-22 que apresenta níveis de expressão 10-100x maiores no tecido tumoral em relação ao tecido não-tumoral, além de maiores níveis de expressão nos tumores menos diferenciados. O PCA3 é aprovado para uso no Brasil e é extraído a partir da urina após massagem prostática. Possui grande utilidade na avaliação de re-biópsias.¹²

O *4K score* é um teste sanguíneo que combina em uma fórmula diferentes formas de PSA (total, livre e intacto), calicreína humana 2, idade, toque retal e biópsia prévia (se presente). Esse teste determina a chance do diagnóstico de tumor com Gleason ≥ 7 na biópsia. Um estudo multicêntrico com 1012 pacientes mostrou que os resultados do 4K score tinha uma alta acurácia (AUC- 0,82), usando-se o ponto de corte $\geq 15\%$ evita-se 58% das biópsias e deixa-se de detectar apenas 4,7% dos tumores de alto grau¹³

O *PHI (prostate health index)* é uma fórmula matemática que utiliza em suas variáveis PSA, pro-PSA, fração livre do PSA e isoforma p2PSA, estudos mostram aumento da sensibilidade no diagnóstico do CaP e redução do número de biópsias desnecessárias.^{14 15}

No que diz respeito aos exames de imagem, a ressonância multiparamétrica da próstata é, entre os novos métodos, o que vem recebendo maior aceitação no meio urológico. Consiste em uma ressonância magnética que utiliza um software capaz de medir velocidade de perfusão do contraste e capacidade de difusão da água nos tecidos. A partir destes dados é gerada uma escala numérica classificada como PI-RADS que permite a estratificação do risco de CaP (anexo 1).

Diversos estudos tem mostrado maior acurácia do exame em tumores mais indiferenciados, o que reforça seu importante papel contra o superdiagnóstico^{16 17} além do seu uso durante a biópsia prostática (biópsia de fusão) trazendo aumento do diagnóstico de tumores clinicamente significantes

1.3 Prognóstico e tratamento

As alterações nos exames de diagnóstico indicam a realização da biópsia da próstata guiada por ultrassom. O tipo histológico mais frequente é o adenocarcinoma prostático, encontrado em 95% dos casos.

O adenocarcinoma da próstata foi originalmente graduado por Gleason¹⁹ na década de 1960. Foi proposto definir 5 níveis de diferenciação histológica, graduando do 1 – mais bem diferenciado até o 5 – mais indiferenciado. A partir desta graduação a classificação se dá pela soma do grau mais prevalente na amostra com o segundo mais prevalente. Tem-se então, uma escala que varia de 2-10. Classicamente considera-se câncer o valor de Gleason ≥ 6 , sendo o escore 6 para tumores de baixo grau, escore 7 para grau intermediário (sendo 4+3 mais grave do que 3+4) e escore 8,9,10 para tumores de alto grau.³

Mais recentemente a *International Society of Urology* (ISUP), propôs uma mudança na classificação histológica. Passando o escore Gleason 3+3 para grau 1, Gleason 3+4 grau 2, Gleason 4+3 para grau 3, Gleason 4+4 para grau 4 e presença do padrão 5 para grau 5, baseado em estudos que mostram curvas de sobrevida diferentes para cada grau.²⁰

Atualmente prognóstico do CaP depende fundamentalmente do escore de Gleason e do estadiamento patológico. Este segue a classificação TNM recomendada pela AJCC (American Joint Committee on Cancer - 2017) (anexo 2).

O tratamento é realizado levando em consideração o estadiamento clínico patológico do paciente, comorbidades e expectativa de vida. Pacientes são estratificados de acordo com o risco de evolução da doença. Os tumores de

baixo e muito baixo risco possuem como principal indicação a vigilância ativa, estratégia que visa postergar o tratamento local evitando assim as morbidades associadas a essas terapêuticas. Os pacientes de grau intermediário (favorável e desfavorável) e os de alto risco possuem indicação de tratamento local com cirurgia ou radioterapia ou ambas as técnicas em algumas situações. Aqueles com tumores que acometem linfonodos costumam ser tratados com bloqueio hormonal e os pacientes metastáticos agregam a quimioterapia ou novas drogas antiandrogênicas a essa estratégia. A classificação de risco é descrita na tabela 1 conforme o *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* v 2.2020.²¹

Tabela 1 – Estratificação de Risco do CaP – NCCN v2.2020

Estratificação de Risco	Achados Clínico-patológicos
Muito baixo	T1c + Gleason 6/ ISUP 1 + <3 fragmentos positivos na biópsia com 50% dos fragmentos acometidos + PSA<10 + PSAd < 0,15ng/ml/g
Baixo	T1c -T2a + PSA <10 + Gleason 6/ ISUP 1
Intermediário Favorável	T2b-T2c ou PSA 10-20 ou Gleason 3+4/ ISUP 2 + < 50% dos fragmentos positivos
Intermediário Desfavorável	T2b-T2c ou PSA 10-20 ou Gleason 4+3/ ISUP 3
Alto	T3a ou PSA>20 ou Gleason 8/ISUP 4 ou Gleason 4+5/ ISUP 5
Muito Alto	T3b-T4 ou > 4 fragmentos Gleason 8-10/ISUP 4-5 ou padrão primário 5
Regional (linfonodos)	Qualquer T, N1, M0
Metastático	Qualquer T, qualquer N0, M1

* PSAd – Densidade de PSA (é calculado pela divisão do PSA Total pelo volume da próstata em gramas).

A vigilância ativa (VA) é uma estratégia que vem ganhando grande aceitação na prática clínica, principalmente entre os tumores de baixo e muito baixo risco. Segundo Coopeberg²², a partir do levantamento do banco de dados

do *Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor* (CAPESURE), 40% dos pacientes portadores de CaP de baixo risco já realizam essa estratégia nos Estados Unidos e, que entre aqueles com 75 anos ou mais, este índice sobe para 76%. O protocolo mais utilizado é o do grupo de Baltimore – EUA, no Hospital Johns Hopkins. Levantamentos recentes mostraram que em um seguimento de 15 anos, os pacientes apresentaram uma incidência de metástase de apenas 0,6% e uma mortalidade câncer específica de 0,1%, confirmando a eficácia da estratégia.²³

Atualmente tem-se incorporado à prática clínica o uso de nomogramas, que são modelos matemáticos que auxiliam a tomada de decisões em diferentes cenários da doença desde indicação da biópsia até escolha do tratamento adjuvante. Apesar de diferentes fórmulas matemáticas esses nomogramas possuem variáveis comuns entre eles: idade, PSA, estágio clínico, número e percentual de fragmentos acometidos e grau histológico.^{24,25}

Recente estudo retrospectivo com 387 homens submetidos à prostatectomia radical robótica avaliou a partir de um modelo de regressão logística multivariado a presença de achados adversos cirúrgicos e sua associação com variáveis clínicas pré-operatórias utilizadas nos nomogramas do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) e *Partin Tables* e em seguida adicionou a esses nomogramas achados adversos da ressonância magnética multiparamétrica. Foi observado aumento da acurácia (AUC 0,71 para 0,78) no MSKCC (AUC 0,62 para 0,73) no *Partin Tables* após adição destas informações.²⁶

Mesmo com a utilização de novas ferramentas, como os nomogramas, para inclusão nos protocolos de VA, cerca de 31% dos pacientes são

reclassificados e até 57% foram encaminhados para tratamento curativo²³, fato que reforça a dificuldade em encontrar critérios suficientemente bons para selecioná-los. Adicionalmente, dentre os doentes portadores de CaP considerados elegíveis para tratamento localizado, cerca de 1/3 possuem elevação no grau histológico na peça cirúrgica e cerca de 27% apresentam recidiva da doença após terapêutica primária²⁷.

Estes dados mostram que a estratificação de risco a partir da idade, do estadiamento clínico, do escore de Gleason/ISUP e dos níveis de PSA não são suficientes para distinguir com precisão tumores indolentes de tumores agressivos.

Por este motivo faz-se a necessidade de estudos voltados para reconhecimento de novos marcadores prognósticos que permitam selecionar melhor o perfil de pacientes para cada tipo de estratégia terapêutica. Neste sentido cresce o número de investigações na área de biologia molecular, como análises de polimorfismos e fatores epigenéticos, que possam elucidar este problema.

1.4 O micro RNA

O Micro RNA (miR) é uma cadeia pequena de RNA não codificante com aproximadamente 18 - 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores ou promotores de genes alvo ligados ao diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de diversas patologias. A desregulação do miR está relacionada à alteração de vários processos moleculares nos tecidos que levam à complexidade e heterogeneidade de diversos cânceres. Os miRs podem ser

isolados e estudados tanto nos tecidos, como nos fluidos biológicos (soro, plasma e urina), permitindo utilização de teste não invasivos.²⁸

Até o momento foram catalogados mais de 38000 miRs de várias espécies animais e vegetais no miRBase, banco de dados mantido pela universidade de Manchester (www.mirbase.org).

Os miRs são codificados inicialmente no núcleo, em uma grande cadeia de dupla fita chamada de Pri-miR a partir da enzima RNA polimerase II e III. Posteriormente, ainda no núcleo, é convertido em pre-miR com cerca de 19-25 nucleotídeos através da enzima Drosha. Já fora do núcleo, a enzima Dicer realiza a quebra dos Hairpin permitindo a clivagem da dupla cadeia chegando ao miR maduro. O miR é então ligado ao *RNA-induced silencing complex* (RISC Complex) por onde será levado ao RNA mensageiro (RNAm) alvo reprimindo a tradução proteica ou promovendo a degradação do RNAm ²⁹ (figura 1).

Figura 1 – Biogênese do miR. (Extraído de Bertoli et al – 2016).

Atualmente os miRs têm sido estudados em diversas patologias oncológicas e não oncológicas. Destacamos estudo recente sobre o seu papel na indução da síndrome metabólica através de seu impacto na produção e secreção de insulina, assim como na resistência insulínica, adipogênese e metabolismo lipídico.³⁰ Outros estudos identificam a associação dos MiRs com doença de Alzheimer³¹ e depressão.³²

Mais recentemente, os MiRs foram relacionados com a síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV2), responsável por uma das mais graves pandemias da história da humanidade, a COVID19. Os coronavírus pertencem a classe dos RNA Vírus e por anos a produção de miRs a partir deste tipo de vírus era controversa, especialmente pelo não acesso à enzima nuclear Drosha.³³ Porém recentemente, Morales et al.³⁴ encontraram em pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV, três tipos de pequenos RNAs virais (svRNAs), como miRNAs, sendo produzidos. Esses svRNAs foram identificados na modulação a resposta do hospedeiro à infecção viral, regulando a produção de certas citocinas pró-inflamatórias. Essas informações podem ser o alicerce para busca de novos entendimentos e conseqüente proposições terapêuticas para essa doença que mudou o curso da nossa história.³⁵

No campo da oncologia, estudos para desenvolvimento de técnicas de biópsia líquida (termo para testes feitos a partir de amostra de sangue a procura de células tumorais ou fragmentos de DNA/RNA circulantes) vêm crescendo por tratar-se de métodos pouco invasivos. Neste cenário, os miRs tem ganhado cada vez mais destaque, principalmente nos últimos 10 anos³⁶ (figura 2)

Figura 2 – Número de publicações anuais no PubMed com os seguintes termos: *liquid biopsy*, *circulating tumor cells*, *cell free DNA*, *circulating tumor DNA*, *exomes* e *micro RNA*. (Extraído de Domínguez-Vigil IG et al – 2018).

Os miRs tem mostrado interferir nas principais funções celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose que são propriedades intimamente ligadas à oncogênese sugerindo esta relação.³⁷

É sabido que o miR pode possuir diferentes RNAm alvo, portanto a sua expressão pode ter efeitos biológicos variáveis a depender do contexto celular. Diferentes conjuntos de miR são descritos como reguladores negativos, também denominados miR supressores, ou positivos, miR oncogênicos (oncomiR), para câncer em diferentes sítios celulares.^{38 39}

1.5 O micro RNA e o Câncer de Próstata

Os primeiros estudos associando CaP e miR foram publicados em 2007 e tiveram como objetivo determinar novos instrumentos de avaliação diagnóstica da doença.⁴⁰ Desde então diversos estudos tem pesquisado a relação de miR com CaP em diferentes momentos da doença, não apenas como marcador diagnóstico, como também prognóstico e até agente terapêutico.²⁸

Em 2011, Leite e Cols, compararam a expressão de 14 miRs entre 49 pacientes com CaP de alto grau não metastático (28 sem recidiva bioquímica e 21 com recidiva) e 10 pacientes com HPB como controle. Esses autores identificaram que 4 miRNAs foram relacionados à recorrência do tumor (miR-100, miR-145, miR-191 e miR-let7c) e que a partir da análise multivariada o miR-100 > 39,4 (vs < 39,4) era fator de risco independente para recidiva bioquímica. (p=0,009)⁴¹

No mesmo ano este grupo já havia demonstrado que o miR 100 é superexpresso em tumores localizados de alto risco e sub expresso em CaP metastático.⁴² Essa ambiguidade de comportamento foi alvo de estudo, no qual se identificou comportamento contexto dependente do miR100 as vezes como oncomiR prejudicando o controle do ciclo celular e promovendo instabilidade genômica pela queda na regulação dos genes SMARCA5, BAZ2A e THAP2, enquanto em outro contexto atua como miR supressor com a queda na regulação da via mTOR/PI3K/AKT.⁴³

O gene SMARCA5 é um membro da família ISWI das proteínas remodeladoras de cromatina que estão implicadas na replicação do DNA, facilitando a síntese de DNA de heterocromatina. O gene BAZ2A, também

conhecida como proteína 5 de interação TTF1 (TIP5), tem um efeito repressor sobre a transcrição do DNA e o gene THAP2 regula a proliferação celular através da modulação do gene alvo do ciclo celular pRb / E2F.⁴² O SMARCA5 e BAZ2A são importantes genes ligados a manutenção da estabilidade cromossômica e o gene THAP2 possui atividade pró apoptótica sendo assim, sua desregulação através do miR100 explicaria a atuação como oncomiR. Já o alvo mTOR é um proto-oncogene envolvido na proliferação e sobrevivência celular e sua desregulação consequentemente traria um contexto miR supressor⁴³

Outros miRs também vem sendo associados a pior prognóstico no CaP, o miR-let7c, por exemplo, possui sua superexpressão em pacientes com tumor localizado de alto grau e recidiva bioquímica.^{41,43} O miR-let7c possui como alvos c-myc e BUB1: o c-myc, presente no cromossomo 8q24 atua inativando os supressores tumorais como p15 e p27 promovendo a transição G1 - S, dando impulso a ciclagem celular^{44,45}; o BUB1 desempenha um papel específico no checkpoint mitótico, e seus defeitos podem causar instabilidade cromossômica ou aneuploidia em fibroblastos de camundongo e linhas de células de câncer humano.⁴²

A presença de miRs pode ser identificada em diversos fluidos corporais. Segundo Bryant et al, miRs foram detectados na urina em sua forma livre e em células prostáticas. Em seu estudo houve uma superexpressão dos miR-107 e miR-574-3p de 70 pacientes com tumor de próstata localizado e 48 com CaP avançado em comparação com os 17 controles. A área abaixo da curva (AUC) do miR-107 em detecção do CaP foi 0,74 e do miR-574-3p foi 0,66, mostrando-se com maior acurácia que o PCa3 (AUC-0,61).⁴⁶

O miR-146a está envolvido na regulação da inflamação e sua expressão

parece ser regulado por fatores inflamatórios como interleucina 1 e fator de necrose tumoral alfa. Expressão de miR146a regula para baixo alguns genes-alvo que estão envolvidos nas vias dos receptores do tipo *toll-like*. Sun et al., em 2014, relataram que o miR-146a desempenha um papel no CaP através da regulação negativa de Rac1⁴⁷. Estudos anteriores por Lin et al, em 2008, relataram que o miR-146a poderiam funcionar como gene supressor tumoral (miR supressor) durante a modulação da via tumoral HA/ROCK1⁴⁸.

O uso do miRs como biomarcador antes e após prostatectomia radical ainda não é bem estabelecido. Em recente estudo com 29 homens não foi identificada diferença entre a expressão dos principais 17 miRs mais associados ao CaP ao avaliar pacientes com tumores localizados no pré-operatório e em até 2 meses do pós-operatório. Entretanto houve diferença estatisticamente significativa na superexpressão do miR-34a, miR-378 e miR-450b-5p nos homens com estágio pT3 em comparação com pT2 ($p=0,01$). Devido a associação observada entre a expressão de miRs e o estadio patológico mais elevado, o estudo sugere que os miRs circulantes podem ter o potencial de servir como biomarcadores diagnóstico de doenças mais agressivas em pacientes com CaP.⁴⁹

O conceito de associação de biomarcadores com nomogramas tem ganhado bastante destaque nos últimos anos. Em 2019, Zhao et al demonstrou que a inclusão de um painel com 5 miRs aumenta a acurácia de modelos clínicos já conhecidos (CAPRA score e D'Amico) na predição de pacientes que vão evoluir com recidiva bioquímica.⁵⁰ Em outro estudo publicado ano passado foi demonstrado o potencial da utilização dos miRs associados ao *PHI* aumentando

sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de próstata.⁵¹

A utilização dos miRs no contexto terapêutico foi demonstrada em estudo experimental. Iscaife et al⁵² mostrou o uso do miR145 em CaP metastático em modelo *in vitro* e em camundongos *nude*. No estudo *in vitro* houve resposta com diminuição estatisticamente significativa da expressão do RAS em 56% (p=0,012) e 31% (p=0,013) nas linhas celulares metastáticas LNCaP e PC3 respectivamente. No braço do estudo com camundongos foi identificada redução significativa do crescimento tumoral em necropsias.

Apesar destes achados, constantemente encontramos resultados destoantes sobre o papel dos MiRs em diferentes cenários. Esse comportamento errático pode estar relacionado tanto a mutações no DNA em diferentes vias não estudadas, como também a mutações no próprio MiRs o que modificaria seu comportamento.

1.6 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs):

Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (em inglês, *single nucleotide polymorphism*, SNP) são os polimorfismos mais comuns na natureza. Caracterizados por uma troca única de base nitrogenada no DNA, mais frequentemente envolvem bases de mesmas características estruturais, ou seja, entre duas purinas (A/G – G/A) ou entre duas pirimidinas (C/T – T/C). As substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa são menos comuns.⁵³ Para que uma alteração de única base seja considerado um SNP, deve ocorrer em uma frequência de pelo menos 1% em uma população.⁵⁴

Os SNPs podem ocorrer tanto em regiões codificadoras como não codificadoras. Aqueles que ocorrem em regiões codificadoras são divididos entre os denominados sinônimos (o SNP não leva a alteração do aminoácido da proteína traduzida) e não sinônimos (quando há substituição de um aminoácido podendo haver modificações estruturais e funcionais na proteína), portanto com maior potencial de reflexo biológico.⁵⁵

Este ano, Lu et al⁵⁶ demonstraram a associação do SNP rs4143815 C>G no gene PD-L1 com melhor taxa de resposta completa, sobrevida livre de doença e eventos adversos em pacientes com câncer de mama recebendo terapia neoadjuvante.

Fatores ambientais e genéticos são responsáveis pelo surgimento e evolução do CaP. Estima-se que fatores genéticos sejam responsáveis por mais de 40% deste risco.⁵⁷ Os estudos de associação do genoma (GWAS) identificaram mais de 100 SNPs encontrados em regiões regulatórias da próstata associados ao tecido prostático, risco de CaP e secreções prostáticas.⁵⁸

59

Um estudo italiano recentemente publicado mostrou associação do SNP rs2486758 (c.-362T>C) no gene CYP17A1 com menor média de sobrevida livre de progressão entre os pacientes CaP metastáticos castração resistentes em uso de abiraterona.⁶⁰

O *PRACTICAL consortium*, envolveu pesquisadores de 3 continentes com objetivo de avaliar o impacto de 54 SNPs no diagnóstico de CaP clinicamente significativo. Para isto desenvolveram uma pontuação de risco poligênico (PHS) validado como preditor significativo para o surgimento do CaP clinicamente significativo. Ao comparar-se com o risco médio para idade, homens com uma

pontuação alta (percentil >98) possuíam risco 2,9x mais elevado. (HR: 2,9 [IC:2.4 - 3.4])⁶¹ e idade esperada para o diagnóstico de câncer de próstata clinicamente significativo difere por 19 anos entre o 1º e 99º percentis de PHS, ou seja, homens com PHS no 1º e 99º percentis atingiriam o nível de risco padrão de 50 anos aos 60 e 41 anos, respectivamente⁶². Os autores concluíram que esta seria uma nova importante ferramenta de uso individualizado no rastreamento do CaP.⁶¹

Alguns estudos têm demonstrado presença de SNPs não apenas no DNA como também em miRs modificando seu comportamento e efeito biológicos. Em uma revisão sistemática, foi observado que o SNP (rs2910164) no miR146a está relacionado ao risco de cânceres ginecológicos, no entanto o SNP miR-100 (rs1834306) não foi associado ao risco de neoplasias femininas.⁶³

Hashemi M. et al⁵⁷ identificaram que a presença do polimorfismo homozigoto do miR 499 (rs3746444) aumentava o risco de CaP em 76% (OR=1,76; IC=1,12-2,79). Outra recente revisão com 66 casos controle, foi observado que a presença do homozigoto polimórfico no SNP (rs2910164) no miR146a aumentou o risco de incidência de tumores de bexiga, próstata, câncer de colo do útero e colo retal⁶⁴.

1.7 Justificativa

Atualmente estamos em um cenário em que possuímos limitações em categorizar ou prognosticar nossos pacientes portadores de CaP. Os principais parâmetros clínicos utilizados apresentam falhas e achados inesperados em cerca de 30% dos pacientes nas diferentes etapas da doença (diagnóstico, recidiva bioquímica, resistência à castração), sendo então necessário a

ampliação das ferramentas utilizadas. A biologia molecular, em específico os miRs, têm sido identificados como uma possível solução para esta limitação.

Considerando o notório papel dos miRs sobre a biologia do CaP, a avaliação do impacto dos polimorfismos nos miRs relacionados com a doença poderia ajudar a esclarecer etapas da carcinogênese deste tumor. Da mesma forma, seu esclarecimento poderia permitir o desenvolvimento de marcadores para diagnóstico e prognóstico tumoral, como também sugerir novas terapias alvo.

2. OBJETIVOS

Objetivo Primário

Análise do polimorfismo de nucleotídeo único rs1834306 localizado no miR100 e rs2910164 localizado no miR146a em amostras de pacientes com CaP e em homens saudáveis.

Objetivos Secundários

Correlação da genotipagem com fatores prognósticos clássicos do câncer de próstata (PSA pré-operatório, graduação histológica de Gleason e estadiamento patológico) e recidiva bioquímica.

Análise da expressão do miR100 nas amostras de pacientes com CaP e em homens saudáveis e a correlação da expressão com os fatores prognósticos.

3. MÉTODOS

3.1 Pacientes:

De maneira retrospectiva, foram selecionados 100 pacientes diagnosticados com CaP, que são acompanhados na clínica particular do Prof. Dr. Miguel Srougi. O grupo controle foi composto por 68 homens que possivelmente não possuíam CaP e nem histórico familiar da doença. Estes homens são acompanhados no ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), pelo grupo da próstata, onde fazem acompanhamento periódico com intuito preventivo. Os critérios de inclusão deste grupo foram: PSA abaixo de 2,5 ng/ml, toque retal sem alterações, não possuir histórico familiar de CaP e ter idade superior a 60 anos.

A amostra de sangue dos pacientes com CaP foi coletado por uma técnica de enfermagem na clínica particular e enviado para o LIM 55 da FMUSP. O sangue do grupo controle foi coletado no Ambulatório de Urologia do HCFMUSP e também encaminhado para o LIM55. As amostras de sangue coletadas foram estocadas em freezer a -80°C até o processamento. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 1.912.899.

Foram selecionados 2 polimorfismos (Tabela 2) e avaliados através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR). Comparamos a frequência dos genótipos para cada um dos polimorfismos entre os 100 pacientes com CaP e os 68 pacientes do grupo controle. Os SNPs foram selecionados através de busca na base PubMed utilizando os termos de

interesse: *MicroRNAs, Single Nucleotide Polymorphism, Prostatic Neoplasms, Prognosis.*

Tabela 2 - Polimorfismos selecionados para análise.

microRNA	Id SNP	Alelo Selvagem	Alelo Polimórfico
miR100	rs1834306	A	G
miR146a	rs2910164	G	C

3.2 Extração de DNA

Para análise dos polimorfismos, primeiramente foi feita a extração de DNA das amostras enviadas, utilizando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®). Para execução deste método, as amostras foram equilibradas a temperatura ambiente e a quantidade de 200 µl foi retirada de cada uma delas para extração. A esse volume foram adicionados 20 µl de protease, e posteriormente 200 µl de solução de lise (Buffer AL). As amostras foram então incubadas a 56°C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados e foram adicionados 200 µl de etanol (96 – 100%) e as amostras foram agitadas e centrifugadas. A mistura desse passo foi então transferida para um novo tubo contendo uma coluna fornecida pelo kit e as amostras foram centrifugadas para passagem da mistura pela coluna. O filtrado foi então descartado e foram realizadas etapas de lavagem da coluna com 500 µl das soluções Buffer AW1 e Buffer AW2, respectivamente. Após as lavagens, as colunas foram transferidas para um novo tubo, onde foram adicionados 200 µl da solução de eluição (Buffer AE), incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas. A pureza e concentração do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280nM).

3.3 Análise dos genótipos por PCR em tempo real quantitativo

Realizamos a análise da detecção dos polimorfismos por qPCR de 168 amostras (pacientes), sendo 100 diagnosticados com CaP e 68 controles. Utilizamos a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos (Taqman®) (figura 3), amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise em tempo real.

Nessa abordagem foram utilizados *primers* flanqueando a região polimórfica para amplificação dos produtos por qPCR, além de duas sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos. Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*.

Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada. Cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente e através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. É importante citar que além do *dye reporter* e da molécula *quencher*, uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) também está afixada à sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo uma ligação mais específica, e evitando que ela se ligue inespecificamente à sequência correspondente ao outro alelo.

A detecção da fluorescência emitida na reação é feita por uma câmera CCD localizada no aparelho ABI7500 (Applied Biosystems), capaz de detectar diferentes comprimentos de onda e os genótipos são determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Os oligos e sondas foram adquiridos da empresa Applied Biosystems.

Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 5,0 µl do Master Mix TaqMan, 0,25 µl de primer específico de cada polimorfismo, 2,75 µl de água destilada e 2,0 µl de DNA, totalizando um total de 10 µl para cada reação. Para amplificação as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15" e 60°C por 1', precedidos por 2' a 50°C, e 10' a 95°C. O produto foi então analisado por PCR em tempo real, que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em um comprimento de onda característico.

Figura 3 - Sistema TaqMan®: Identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos. Nesta abordagem além do primer são desenhadas um par de sondas que se anelam sobre uma pequena seqüência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*. Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq DNA polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye repórter* e a emissão de fluorescência (Fonte: Reis ST).

3.4 Isolamento do microRNA

Para a análise de expressão gênica, O microRNA foi extraído pelo método do kit mirVana (*Ambion, Austin, TX, EUA*), seguindo as recomendações do fabricante. Aos tubos com as amostras, foram adicionados 500µl do tampão de lise e 50µl do aditivo. Após homogeneizar, as amostras foram deixadas por 4 min no gelo. Em seguida, foram adicionados 500µl da solução fenol-clorofórmio,

e posteriormente as amostras foram vortexadas e centrifugadas a 10 000 RPM por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi passado para outro tubo, e foi adicionado um terço do volume de etanol 64%. Esta solução foi transferida para uma coluna e centrifugada a 10 000 RPM por 30 segundos. Na coluna está a amostra de microRNA e o líquido passado por ela foi descartado. Logo após, foram feitas as etapas de lavagens do microRNA, com 700µl de *wash solution*, e duas lavagens com 500µl da solução dois terços *wash solution*, centrifugadas por 30 segundos a 10 000 RPM. Após esse processo, o filtrado foi descartado e na coluna foram adicionados 50µl de água livre de *RNAse* a 95°C, para a eluição do microRNA. As amostras foram quantificadas em um espectofotômetro (*Nanodrop DN-1000, wilmington, EUA*) (260/280 nM). E armazenadas a -20°C.

3.5 Síntese do DNA complementar

Após a quantificação do microRNA total, a amostra foi diluída em água livre de nucleasse, em volume final de 20µl na concentração de 50ng por µl. Foi feita a síntese do DNA complementar (cDNA), e realizada a transcriptase reversa com a enzima *MultiScribe® Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems, Fostercity, CA, EUA). Na reação foi utilizado 5ul da amostra diluída; 1,5 ul do 10X *RT buffer*; 0,15ul do mix de dNTP w/dTTP (100M total); 0,19ul do RNase inibitor (20U/µL); 1ul do *primer* Tm para miR-100; 1ul da enzima *MultiScribe™* RT (50U/µL) e 1,16ul de água miliq.

. As soluções foram submetidas a ciclos de temperaturas: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C e 5 min a 85°C. Após o término dos ciclos o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.6 Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real quantitativo

As reações de expressão do miR-100 foram realizadas de acordo com o kit (*Applied Biosystems® TaqMan® Universal PCR Master Mix*). O termociclador utilizado foi ABI 7500 *fast* (*Applied Biosystems, CA, EUA*) no modo *standard*. O *primer* TM miR-100 foi com a sonda TaqMan® (*Applied Biosystems, CA, EUA*).

Foram utilizados reagentes nas seguintes concentrações: 1ul do primer específico; 5µl de *TaqMan® master mix*; 2,0µl de água livre de nuclease e 2,0µl de cDNA (concentrado em 15ng de RNA).

O nível de expressão dos genes foi obtido pelo método $2^{-\Delta CT}$, adquirido do *Applied Biosystems DataAssist Software*.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e o RNU48 (*Applied Biosystems, CA, EUA*) foi utilizado como controle endógeno para microRNA.

3.7 Análise estatística

A verificação do grau de significância da comparação entre as frequências observada e esperada nos grupos controle e de pacientes com CaP foi feita pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

Foram analisados 100 pacientes com CaP e 68 pacientes controle sem CaP. A frequência dos 2 polimorfismos foi avaliada entre estes dois grupos, e além

disso foram feitas análises dentro do grupo de pacientes com CaP, levando em consideração os fatores prognósticos (PSA pré-operatório, estadiamento patológico, Gleason da peça cirúrgica). Realizamos também uma análise dos polimorfismos com a recidiva bioquímica dos pacientes. Foi avaliada a força de associação entre cada um dos polimorfismos e o grupo através do cálculo de *odds ratio* (OR) e seu respectivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%).

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS 19.0 para Windows, e em toda a análise o p foi considerado significativo quando menor ou igual a 0,05.

Para as análises de expressão e correlações, foi feito um teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*, e posteriormente o teste estatístico *Mann Whitney*, no *software* *GraphPad Prism 8.0.1*

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos SNPs - miR100 e miR146a

O polimorfismo rs1834306 (miR100) foi identificado em 70,6% e 75% do grupo CaP e controle respectivamente, o SNP rs2910164 (miR146a) foi identificado em 52% do grupo CaP e 57,4% do controle.

Realizamos uma análise através de um teste Qui-quadrado para elucidar se algum dos genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto ou homozigoto polimórfico) dos polimorfismos estudados têm maior prevalência no grupo dos pacientes com CaP ou no grupo dos pacientes controle.

O teste foi feito com os SNPs rs1834306 (miR100) e rs2910164 (miR146a), respectivamente, e os resultados estão na Tabela 3. Como podemos observar a diferença estatística não foi significativa em nenhum dos dois microRNAs estudados ($p=0,463$; $p=0,782$).

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos dos 2 polimorfismos nos pacientes diagnosticados com CaP e nos indivíduos do grupo controle.

Alteração (ensaio)	Genótipo	Controle (n)	CaP (n)	Odds Ratio	p
rs1834306 (miR100)	AA*	25,0%(17)	29,5%(28)	1	0,463
	AG	45,6%(31)	49,5%(47)	0,92 [0,43 – 1,95]	
	GG	29,4%(20)	21,1% (20)	0,60 [0,25 – 1,44]	
rs2910164 (miR146a)	GG*	42,6%(29)	48,0%(4)	1	0,782
	GC	47,1%(32)	42,0%(42)	0,79 [0,41 – 1,52]	
	CC	10,3%(7)	10,0%(10)	0,86 [0,29 – 2,51]	

*Genótipo Homozigoto Selvagem

Ao avaliar apenas a presença do alelo polimórfico nas amostras nos dois grupos, os resultados se mantêm sem diferença estatística significativa conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos alelos dos dois polimorfismos entre pacientes com CaP e grupo controle

Alteração (ensaio)	Alelos	Controle (n)	CaP (n)	Odds Ratio	p
rs1834306 (miR100)	A*	37,8%(17)	62,2%(28)	1	0,529
	G	43,2%(51)	56,8%(67)	0,79 [0,39 – 1,61]	
rs2910164 (miR146a)	G*	37,7%(29)	62,3%(48)	1	0,494
	C	42,9%(39)	57,1%(52)	0,81 [0,43 – 1,49]	

*Alelo Selvagem

Ao analisar os pacientes de acordo com os fatores prognósticos clássicos do CaP alguns achados foram identificados. Primeiramente subdividimos os pacientes de acordo com os níveis de PSA pré-operatório em dois grupos: PSA < 10 ng/ml e pacientes com PSA ≥ 10 ng/ml (Tabela 5). Nesta comparação encontramos significância estatística para o SNP rs1834306 (miR100). O genótipo homozigoto polimórfico esteve menos presente no grupo de pacientes com PSA ≥ 10 ng/ml, (OR=0,12; IC: 0,01-1,04; p=0,03), o que determinaria melhor prognóstico. Quando consideramos apenas a presença do alelo polimórfico G no mesmo SNP (Tabela 6), encontramos que o alelo polimórfico foi cinco vezes menos frequente nos pacientes com valor de PSA ≥ 10 ng/ml (OR=0,21; IC: 0,06-0,73; p=0,09) quando comparado com a presença do alelo selvagem A.

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos dos polimorfismos em relação ao nível de PSA pré-operatório.

Alteração (ensaio)	Genótipo	PSA <10ng/ml (n)	PSA ≥10ng/ml (n)	Odds ratio	p
rs1834306 (miR100)					
	AA*	25,4% (18)	61,5% (8)	1	0,03
	AG	47,9% (34)	30,8% (4)	0,26[0,07 – 1,10]	
	GG	26,8% (19)	7,7% (1)	0,12 [0,01 – 1,04]	
rs2910164 (miR146a)					
	GG*	46,7% (35)	50,0% (7)	1	0,868
	GC	41,3% (31)	42,9% (6)	0,97 [0,29 – 3,19]	
	CC	12,0% (9)	7,1% (1)	0,56 [0,06 – 5,11]	

* Genótipo Homozigoto Selvagem

Tabela 6 - Distribuição dos alelos em relação ao nível de PSA pré-operatório

Alteração (ensaio)	Genótipo	PSA <10ng/ml (n)	PSA ≥10ng/ml (n)	Odds Ratio	p
rs1834306 (miR100)					
	A*	25,4% (18)	61,5% (8)	1	0,009
	G	74,6% (53)	38,5% (5)	0,21 [0,06-0,73]	
rs2910164 (miR146a)					
	G*	46,7% (35)	50,0% (7)	1	0,819
	C	53,3% (40)	50,0% (7)	0,87 [0,28 – 2,74]	

*Alelo Selvagem

Levando-se em consideração apenas os pacientes com câncer, foi analisado o anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos. Utilizando o escore de Gleason, os pacientes foram categorizados em Gleason < 7 e ≥ 7 e comparados quanto a sua variação genotípica em ambos os SNPs. Não foi identificada significância estatística entre estas variáveis conforme demonstradas na tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição dos genótipos em relação ao escore de Gleason na peça

Alteração (ensaio)	Gleason Peça		OR	p
	<7	≥7		
rs1834306 (miR100)	AA*	26,7% (4)	31,3% (21)	1
	AG	40,0% (6)	46,3% (31)	0,98 [0,24 – 3,91]
	GG	33,3% (5)	22,4% (15)	0,57 [0,13 – 2,49]
rs2910164 (miR146a)	GG*	68,8% (11)	40,8% (29)	1
	CG	25,0% (4)	46,5% (33)	3,12 [0,89 – 10,90]
	CC	6,3% (1)	12,7% (9)	3,41 [0,38 – 30,18]

* Genótipo Homozigoto Selvagem

Por sua vez, quando consideramos como fator apenas a presença do alelo polimórfico nos SNPs, encontramos que para o SNP rs2910164 G>C (Tabela 8), localizado no miR146A, o alelo polimórfico C foi mais frequente em pacientes com escore de Gleason ≥7 em relação a pacientes com escore de Gleason <7, mostrando-se 3 vezes mais prevalente neste grupo (OR: 3,19 IC: [1,00 – 10,15]; p= 0,043).

Tabela 8 - Distribuição dos alelos em relação ao escore de Gleason da peça

Alteração (ensaio)	Gleason Peça		OR	p
	<7	≥7		
rs1834306 (miR100)	A*	26,7% (4)	31,3% (21)	1
	G	73,3% (11)	68,7% (46)	0,79 [0,23 – 2,80]
rs2910164 (miR146a)	G*	68,8% (11)	40,8% (29)	1
	C	31,3% (5)	59,2% (42)	3,19 [1,00-10,15]

*Alelo Selvagem

No que se refere ao estadiamento patológico os pacientes portadores de CaP foram categorizados entre T2a-c e T3a-b. Ao se comparar a frequência genotípica ou alélica não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre as variáveis (Tabela 9 e 10).

Tabela 9 - Distribuição dos Genótipos em relação ao estadiamento patológico

Alteração (ensaio)	Estadiamento patológico		OR	p	
rs1834306		pT2	pT3		
	AA*	28,8% (17)	27,8% (5)	1	0,698
	AG	47,5% (28)	38,9% (7)	0,85 [0,23 – 3,11]	
	GG	23,7% (14)	33,3% (6)	1,48 [0,36 – 5,80]	
rs2910164					
	GG*	44,4% (28)	57,9% (11)	1	0,531
	CG	44,4% (28)	36,8% (7)	0,64 [0,22 – 1,88]	
	CC	11,1% (7)	5,3% (1)	0,36 [0,04 – 3,31]	

* Genótipo Homozigoto Selvagem

Tabela 10 - Distribuição dos alelos em relação ao estadiamento patológico

Alteração (ensaio)	Estadiamento patológico			OR	p
rs1834306		pT2	pT3		
	A*	28,8% (17)	27,8% (5)	1	0,932
	G	71,2% (42)	72,2% (13)	1,05 [0,32 – 3,41]	
rs2910164	G*	44,4% (28)	57,9% (11)	1	0,303
	C	55,6% (35)	42,1% (8)	0,58 [0,21 – 1,64]	

*Alelo Selvagem

Ao analisar as mesmas variáveis (genótipo e presença de alelo polimórfico) versus a presença de recidiva bioquímica. Não foi encontrada

correlação estatisticamente significativa entre as variáveis conforme demonstrado nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Distribuição dos Genótipos em relação a recidiva bioquímica

Alteração (ensaio)	Recidiva Bioquímica		OR	p
	Não	Sim		
rs1834306	AA	26,7% (16)	39,1% (9)	1
	AG	48,3% (29)	39,1% (9)	0,55 [0,18 – 1,67]
	GG	25,0% (15)	21,7% (5)	0,59 [0,16 - 2,17]
rs2910164	GG	48,4% (30)	38,5% (10)	1
	CG	43,5% (27)	42,3% (11)	1,22 [0,45 – 3,33]
	CC	8,1% (5)	19,2% (5)	3,00 [0,72 – 12,55]

* Genótipo Homozigoto Selvagem

Tabela 12 - Distribuição dos alelos em relação a recidiva bioquímica

Alteração (ensaio)	Recidiva Bioquímica		OR	p
	Não	Sim		
rs1834306	A*	26,7%(16)	39,1%(9)	1
	G	73,3%(44)	60,9%(14)	0,57 [0,20 – 1,56]
rs2910164	G*	48,4%(30)	38,5%(10)	1
	C	51,6%(32)	61,5%(16)	1,50 [0,59 – 3,82]

*Alelo Selvagem

Avaliamos também o tempo médio de recidiva da bioquímica nos pacientes portadores de CaP, mesmo com as análises anteriores de recidiva bioquímica sendo negativas. Os genótipos homozigotos polimórficos (GG e CC) dos dois SNPs estudados (rs1834306 e rs2910164) foram associados com

menor tempo de sobrevida livre de recidiva bioquímica da doença, em comparação com os genótipos heterozigotos e homozigotos selvagens analisados (Tabela 13 e figura 4 e 5), entretanto sem significância estatística. Também não encontramos correlação significativa entre o tempo de sobrevida livre de recidiva e a presença ou ausências dos alelos polimórficos para os dois SNPs estudados (Tabela 14 e figura 6 e 7).

Tabela 13 - Distribuição dos genótipos e Tempo médio de sobrevida livre de recidiva

Alteração (ensaio)	Tempo recidiva em meses		p
rs1834306			
	AA	105,854	0,916
	AG	107,642	
	GG*	64,744	
rs2910164			
	GG	102,045	0,343
	CG	105,103	
	CC*	71,994	

*Genótipo homozigoto polimórfico

Figura 4 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com os genótipos para o SNP rs1834306 – miR100. Em azul temos pacientes com genótipo homozigoto selvagem, em verde pacientes heterozigotos e em amarelo pacientes com genótipo homozigoto polimórfico.

Figura 5 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com os genótipos do SNP rs2910164 – miR146a. Em azul temos pacientes com genótipo homozigoto selvagem, em verde pacientes heterozigotos e em amarelo pacientes com genótipo homozigoto polimórfico.

Tabela 14 - Distribuição dos alelos e Tempo médio de sobrevida livre de recidiva

Alteração (ensaio)	Tempo recidiva em meses		p
rs1834306			
	A	105,854	0,855
	G*	104,791	
rs2910164			
	G	102,045	0,655
	C*	100,000	

*Alelo polimórfico

Figura 6 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de alelo polimórfico do SNP rs1834306 – miR100. Em azul, pacientes sem o alelo polimórfico em verde pacientes com o alelo polimórfico presente.

Figura 7 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de alelo polimórfico do SNP rs2910164 – miR146a. Em azul, pacientes sem o alelo polimórfico em verde pacientes com o alelo polimórfico presente.

4.2 Análise da expressão do miR100

Identificamos também achados sobre a expressão miR100 na amostra. Homens portadores de CaP tiveram menor expressão do miR100 em comparação com homens saudáveis, porém sem significância estatística ($p=0,37$). Ao analisarmos apenas os homens com CaP, o miR100 mostrou-se superexpresso naqueles com piores fatores prognósticos clássicos, sendo estatisticamente significante nas variáveis estadiamento patológico e recidiva bioquímica ($p=0,004$ e $p=0,011$ respectivamente) conforme demonstrado na figura 8 e 9.

Figura 8 – Expressão do miR100 em homens portadores de CaP e em homens saudáveis.

Figura 9 - Expressão do miR100 em homens portadores de CaP e sua correlação com fatores prognósticos clássicos.

Ao compararmos a expressão do miR100 em relação a genotipagem do SNP rs1834306 – miR100, encontramos uma maior expressão do miR100 no homozigoto selvagem em homens com CaP versus controle. O achado inverso foi visto nos pacientes heterozigotos e homozigotos polimórficos. Figura 10

Figura 10 - Expressão do miR100 categorizada por genótipos.

5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo buscamos avaliar a prevalência dos SNPs rs2910164 e rs1834306 nos miR146a e miR100 respectivamente, e sua relação com as variáveis prognósticas, através da análise das amostras sanguíneas de pacientes com CaP e controles. Utilizamos a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos, amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise em tempo real para seu reconhecimento genotípico. Analisamos essa expressão com a presença do câncer, como também, com variáveis conhecidas de determinação prognóstica como padrão de Gleason, valor de PSA, estadiamento patológico e tempo para recidiva bioquímica.

Escolhemos o miR100 por possuímos uma linha de pesquisa voltada para seu estudo em nosso Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia (LIM 55) da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) com várias publicações e sobretudo em busca da resposta do seu intrigante comportamento cenário dependente, sendo talvez a presença do SNP a chave para essa pergunta. A escolha do miR146a vem de sua constante descrição na literatura com comportamento de miR supressor e consequente previsibilidade. Então a partir da análise de seu SNP poderemos avaliar efeitos adversos esperados em nossa amostra.

Não encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre o genótipo dos SNPs nos microRNAs e a presença de CaP, pois não foi observada diferença na frequência dos genótipos possíveis entre os pacientes portadores da doença e as amostras dos pacientes do grupo controle. Nossos achados são consonantes com os descritos na literatura sobre o rs2910164 miR146⁶⁵ como também sobre rs1834306 miR100⁶⁶. No entanto, observamos achados

relevantes correlacionando os genótipos dos pacientes com CaP e as variáveis de determinação prognóstica.

Na literatura, o miR146a possui comportamento descrito de miR supressor entre vários tipos de cânceres.⁶⁷ Em recente revisão o miR-146a mostrou possuir importante papel na regulação das funções dos linfócitos T, determinando queda em sua proliferação e ativação imune.⁶⁸ Como consequência desta quebra da resposta imune, ratos com deleção genética do miR-146a desenvolveram doenças inflamatórias crônicas assim como exacerbando a produção de células mielóides e desenvolvendo sarcomas e linfomas, por isto identificando o miR-146a como miR supressor ao menos no contexto do sistema imune.^{69,70}

O polimorfismo rs2910164 é localizado no cromossomo 5q33 na região do pre-miR146a⁷¹. A presença de um polimorfismo de cadeia única em um pri-miRNA ou em um pre-miRNA afeta a maturação em miRNA dificultando assim a sua ligação com seu alvo.⁷²

Em nosso estudo encontramos associações entre o SNP estudado no miR146a e pacientes com escore de Gleason ≥ 7 que é sabidamente um fator de pior prognóstico. Este achado nos permite sugerir que o polimorfismo rs2910164 possa estar afetando a ligação deste miRNA com o seu gene alvo ou inativando-o, assim inibindo sua função miR supressora. Em estudo publicado em 2018, Damodaran et al⁶⁵ investigaram a presença do rs2910164 entre 100 pacientes com CaP e 100 controles. Ao avaliar sua associação com Gleason ≥ 7 e PSA ao diagnóstico, não foi identificada significância estatística. Acreditamos que esta diferença de achados pode estar relacionada a uma maior prevalência do alelo

C (polimórfico) na população indiana em comparação a outras, como americana, africana e europeia. Em outro estudo semelhante, em uma população chinesa, foi identificado uma diminuição em 0,65 vezes a chance do surgimento do CaP naqueles que apresentavam genótipo CC (homozigoto polimórfico).⁷³

Mi et al demonstraram que polimorfismos de miR-196a2 rs11614913, miR-146a rs2910164 e miR-499 rs3746444 estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de CaP em descendentes de asiáticos. Porém indivíduos com superexpressão do rs2910164 apresentaram associação com Gleason <7 e CaP localizado.⁷⁴ Em diferente metanálise, não foi identificada associação significativa entre rs2910164 e risco de CaP, entretanto foi observado uma tendência de risco reduzido.⁷⁵

O mir100 está localizado no cromossomo 11q24.1 (gene ID:406892) e tem sido analisado por vários estudos nos últimos anos pela capacidade de influenciar diversos alvos moleculares importantes na carcinogênese, identificando sua função tanto de oncomiR quanto de miR supressor.⁷⁶ O miR100 possui importância como marcador diagnóstico⁷⁷ e prognóstico⁷⁸ de diversos tumores resultantes de sua desregulação ou expressão aberrante. Além disso novos estudos tem demonstrado sua capacidade em re-sensibilizar tumores a drogas quimioterápicas^{79,80} o que abre possibilidade de tornar-se um novo alvo na luta contra o câncer.

Em estudo retrospectivo com 143 homens a expressão do miR 100 urinário foi utilizado para aumento da sensibilidade da biópsia em identificar CaP clinicamente significantes, especialmente em pacientes com PSA entre 4-10.⁸¹

Nabavi et al⁸², em seu interessante estudo, demonstrou que a inibição do

miR 100 em linhagens celulares metastáticas (LNCaP e DU145) reduziu significativamente a proliferação celular. Levando a impressão que o miR-100 é necessário para a proliferação e para a sobrevivência de células dormentes de CaP expostas ao bloqueio androgênico.

Em nossos estudos, o miR100 foi superexpresso em pacientes com piores fatores prognóstico, com significância estatística para estadiamento patológico e recidiva bioquímica ($p=0,004$ e $p=0,011$ respectivamente). Esses dados demonstram um comportamento de oncomiR. Em consonância com nossos achados um estudo publicado em 2019 demonstrou que o miR100 foi subexpresso em pacientes com tumores de baixo grau em comparação com o grupo de alto grau, porém após análise multivariada não houve significância estatística.⁸³ Este comportamento de pior prognóstico também foi identificado por Samli et al⁸⁴, que mostraram uma superexpressão do miR100 em células VCaP-R e DU145-R resistentes ao paclitaxel.

O grupo do LIM 55 do HCFMUSP possui diversos estudos direcionados para análise do miR100 e demonstrou aumento da expressão do miR100 em três vezes nos pacientes que apresentaram recidiva bioquímica após prostatectomia versus aqueles que não apresentaram recidiva o que posicionaria o miR100 como oncomiR.⁴¹ Em nosso estudo identificamos a tendência a recidiva bioquímica mais precoce nos pacientes portadores de alelos homozigotos polimórficos em ambos SNPs apesar da ausência de significância estatística. Chen et al,⁸⁵ analisaram a relação do SNP rs2910164 miR146a e recidiva bioquímica após prostatectomia radical em 72 homens no sul da China com um seguimento médio de 2 anos; 33% ($n=24$) dos pacientes apresentaram recidiva bioquímica. Usando a curva de Kaplan-Meier, foi comparado o tempo

de ausência de recidiva bioquímica entre os genótipos polimórficos e selvagem para o miR-146a e não foi identificada diferença estatisticamente significativa ($p=0,925$).

O miR100 também já demonstrou sua capacidade em suprimir algumas proteínas da cascata IGF/mTOR e FGFR3 inclusive com potencial de uma abordagem com alvo terapêutico neste papel de supressão da proliferação celular e promotora de apoptose em tumores de bexiga não músculo invasivos e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.^{86,87}

O polimorfismo rs1834306 é localizado na região do pri-miR100 e em nossos achados identificamos associação com o PSA<10, em especial quando foi avaliado a presença do alelo polimórfico isolado (OR=0,21; IC: 0,60-0,73; $p=0,09$). Este achado sugere um melhor prognóstico na presença do polimorfismo. Em conformidade, Hu et al⁶⁶ a partir de uma metanálise sugere que este polimorfismo não possui relação com o aumento do risco para câncer. Estudos atuais demonstraram a ausência da associação deste polimorfismo com o aumento do risco do tumor de mama e associado a diminuição do tumor escamoso de esôfago.^{88,89}

O crescente interesse da comunidade científica no impacto e papel dos MicroRNAs tem influenciado estudos voltados para aspectos que possam influenciar sua ação. Por este motivo, a análise de polimorfismos em miRs tem aumentado. Recentemente Damodaran et al avaliaram a partir de um estudo caso controle 7 polimorfismos em 3 miRNAs (146a, 196a2 e 125a) e seus resultados mostraram que o SNP rs57095329 no miR-146a apresentou uma associação inversa com o risco de CaP e os polimorfismos nos miR-196a (rs11614913) e miR-125a (rs12976445) revelaram aumento do risco para CaP

(OD=2,55; IC: 1,15-4,65 ; p=0,03).⁶⁵

Uma metanálise, composta por 66 estudos, analisou os cinco SNPs em miRNA mais comuns (miR-146a rs2910164, miR-196a2 rs11614913, miR-499 rs3746444, miR-149 rs2292832 e miR-27a rs895919) e sua associação com risco de câncer. Os seus resultados mostraram que não foi observada associação entre rs2910164 (miR-146a) e risco de câncer em geral. Entretanto, na análise estratificada, identificou-se que tanto o alelo C rs2910164 quanto o genótipo CC foi protetor contra câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer cervical e câncer colorretal, enquanto foi fator de risco para carcinoma papilífero de tireoide e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. O SNP rs11614913 (miR-196a2) foi associado com a diminuição do risco de câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico e de bexiga. Ao analisar o miR-499, o seu polimorfismo rs3746444, estava associado ao risco de câncer, principalmente para o câncer de mama. Nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos rs2292832 e rs895919 e o risco de câncer no grupo geral e na análise estratificada.⁶⁴

Em outro estudo caso controle com 169 pacientes com CaP e 182 homens com hiperplasia benigna foi avaliada a relação dos mesmos 5 SNPs mais comuns e câncer de próstata. Apenas o polimorfismo rs3746444 miR-499 aumentou o risco de câncer (OR =1,76; IC:1,12–2,79, P =0.019).⁵⁷

Até o presente momento os dados na literatura ainda são escassos sobre os polimorfismos nos Micro-RNAs. Este é o primeiro estudo do rs1834306 no miR100 em CaP. A característica cenário dependente do miR100, já previamente descrita na literatura⁴³, pode estar ligada a presença polimorfismos que inativam seu comportamento. Nossos dados reforçam esta hipótese pela

associação do SNP rs1834306 com o PSA<10, em especial quando foi avaliado a presença do alelo polimórfico isolado.

Nossos dados mostraram impacto dos SNPs em fatores prognósticos da doença, mas são necessários novos estudos que possam esclarecer a prevalência desses SNPs em diferentes populações assim como a influência destes polimorfismos em genes alvo e consequentemente o impacto desta mutação na expressão proteica.

6. CONCLUSÕES

Com nossos dados concluímos que a presença do SNP rs2910164 no miR146a está associado a pacientes com escore de Gleason ≥ 7 , mostrando-se como um polimorfismo de mau prognóstico no CaP. O rs1834306 no miR100 está ligado a dados de melhor prognóstico (PSA <10) e, portanto, em nossa amostra mostra-se como um polimorfismo de bom prognóstico no CaP, sobretudo na presença do alelo polimórfico isolado.

O nosso estudo, mostrou superexpressão do miR100 naqueles pacientes portadores de CaP com piores fatores prognósticos (estadiamento patológico e recidiva bioquímica), comportando-se como oncomiR.

7. ANEXO

Anexo 1 – Classificação PI-RADS através da Ressonância Magnética

PIRADS	Definição	Conduta
1	Muito provavelmente benigno	Conservadora
2	Provavelmente Benigno	Conservadora
3	Indeterminado	Ativa (biópsia)
4	Provavelmente Maligno	Ativa (biópsia)
5	Muito provavelmente maligno	Ativa (biópsia)

Anexo 2 – Classificação TNM/AJCC (2017)

Tumor primário (T - Clínico)	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou não visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos do tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% do tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (por exemplo, devido a PSA elevado)
T2	Tumor palpável confinado à próstata
T2a	Tumor que envolve uma metade ou menos de um dos lobos
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 com extensão extra prostática, que não invade outras estruturas
T3a	Extensão extra prostática (unilateral ou bilateral)
T3b	Invasão das vesículas seminais
T4	Tumor invade estruturas adjacentes que não as vesículas seminais: reto, músculos elevadores do ânus, parede pélvica
Linfonodos regionais (N)	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
Metástase a distância (M)	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase a distância
M1a	Linfonodo (s) não regional (ais)
M1b	Osso (s)
M1c	Outra (s) localização (ões)

8. REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 2020; **70**: 7–30.
2. MS / SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade 2020: Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2020. 2020.
3. Kavoussi L: Campbell-Walsh. 10th ed. Elsevier Saunders; 2012.
4. Zeegers MPA, Jellema A and Ostrer H: Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2003; **97**: 1894–1903.
5. Mahal BA, Aizer AA, Ziehr DR, et al: Racial disparities in prostate cancer specific mortality in men with low-risk prostate cancer. *Clin. Genitourin. Cancer* 2014; **12**: e189–e195.
6. Romero FR, Romero AW, Almeida RMS De, et al: The prevalence of prostate cancer in Brazil is higher in Black men than in White men: systematic review and meta-analysis. *Int. Braz J Urol* 2012; **38**: 440–7.
7. Bhindi B, Locke J, Alibhai SMH, et al: Dissecting the Association Between Metabolic Syndrome and Prostate Cancer Risk: Analysis of a Large Clinical Cohort. *Eur. Urol.* 2014: 1–7.
8. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, et al: [Some physico-chemical characteristics of “-seminoprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII]. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1971; **25**: 322–4.
9. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, et al: Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* 1979; **17**: 159–63.
10. Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N. Engl. J. Med.* 1987; **317**: 909–16.
11. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* 2017; **67**: 7–30.
12. Vickers AJ: Markers for the early detection of prostate cancer: some principles for statistical reporting and interpretation. *J. Clin. Oncol.* 2014; **32**: 4033–4.
13. Bryant RJ, Sjoberg DD, Vickers AJ, et al: Predicting high-grade cancer at ten-core prostate biopsy using four kallikrein markers measured in blood in the ProtecT study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015; **107**: 1632.
14. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, et al: A multicenter study of [-2]prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J. Urol.* 2011; **185**: 1650–5.
15. Zhu Y, Han C-T, Zhang G-M, et al: Development and external validation of a prostate health index-based nomogram for predicting prostate cancer. *Sci. Rep.* 2015; **5**: 15341.
16. Hamoen EHJ, de Rooij M, Witjes JA, et al: Use of the Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS) for Prostate Cancer Detection with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging: A Diagnostic Meta-analysis. *Eur. Urol.* 2014; **67**: 1112–1121.
17. Thompson IM and Ankerst DP: The Role of Magnetic Resonance Imaging in Prostate Cancer: Focusing on What Really Matters. *Eur. Urol.* 2016; **70**: 574–575.
18. Mendhiratta N, Rosenkrantz AB, Meng X, et al: Magnetic Resonance

- Imaging-Ultrasound Fusion Targeted Prostate Biopsy in a Consecutive Cohort of Men with No Previous Biopsy: Reduction of Over Detection through Improved Risk Stratification. *J. Urol.* 2015; **194**: 1601–6.
19. Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. reports* 1966; **50**: 125–8.
 20. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al: A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur. Urol.* 2016; **69**: 428–435.
 21. Schaeffer E, Snirivas S, Antonarakis ES, et al: NCCN Guidelines - Prostate Cancer. *NCCN Clin. Pract. Guidel. Oncol.* 2020; **2**.
 22. Cooperberg MR and Carroll PR: Trends in Management for Patients With Localized Prostate Cancer, 1990-2013. *JAMA* 2015; **314**: 80–2.
 23. Tosoian JJ, Mamawala M, Epstein JI, et al: Intermediate and longer-term outcomes from a prospective active-surveillance program for favorable-risk prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015; **33**: 3379–3385.
 24. Eifler JB, Feng Z, Lin BM, et al: An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011. *BJU Int.* 2013; **111**: 22–29.
 25. Godoy G, Chong KT, Cronin A, et al: Extent of pelvic lymph node dissection and the impact of standard template dissection on nomogram prediction of lymph node involvement. *Eur. Urol.* 2011; **60**: 195–201.
 26. Sandeman K, Eineluoto JT, Pohjonen J, et al: Prostate MRI added to CAPRA, MSKCC and Partin cancer nomograms significantly enhances the prediction of adverse findings and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *PLoS One* 2020; **15**: 1–14.
 27. Pompe RS, Gild P, Karakiewicz PI, et al: Long-term cancer control outcomes in patients with biochemical recurrence and the impact of time from radical prostatectomy to biochemical recurrence. *Prostate* 2018.
 28. Bertoli G, Cava C and Castiglioni I: MicroRNAs as biomarkers for diagnosis, Prognosis and theranostics in prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; **17**.
 29. Lin S and Gregory RI: MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2015; **15**: 321–33.
 30. Das S, Mohamed IN, Teoh SL, et al: Micro-RNA and the Features of Metabolic Syndrome: A Narrative Review. *Mini Rev. Med. Chem.* 2020.
 31. Fransquet PD and Ryan J: Micro RNA as a potential blood-based epigenetic biomarker for Alzheimer's disease. *Clin. Biochem.* 2018; **58**: 5–14.
 32. Xu Y-Y, Xia Q-H, Xia Q-R, et al: MicroRNA-Based Biomarkers in the Diagnosis and Monitoring of Therapeutic Response in Patients with Depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019; **15**: 3583–3597.
 33. Varble A and tenOever BR: Implications of RNA virus-produced miRNAs. *RNA Biol.* 2011; **8**: 190–194.
 34. Morales L, Oliveros JC, Fernandez-Delgado R, et al: SARS-CoV-Encoded Small RNAs Contribute to Infection-Associated Lung Pathology. *Cell Host Microbe* 2017; **21**: 344–355.
 35. Bhattacharyya P and Biswas SC: Small Non-coding RNAs: Do They Encode Answers for Controlling SARS-CoV-2 in the Future? *Front. Microbiol.* 2020; **11**: 1–8.

36. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, et al: The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget* 2018; **9**: 2912–2922.
37. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; **101**: 2999–3004.
38. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, et al: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; **103**: 2257–2261.
39. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, et al: miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* 2020; **9**: 1–33.
40. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, et al: MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; **67**: 6130–6135.
41. Leite KRM, Tomiyama A, Reis ST, et al: MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *J. Urol.* 2011; **185**: 1118–1122.
42. Leite KRM, Sousa-Canavez JM, Reis ST, et al: Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 2011; **29**: 265–269.
43. Leite KRM, Morais DR, Reis ST, et al: MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo).* 2013; **68**: 797–802.
44. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, et al: Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am. J. Pathol.* 1998; **153**: 141–148.
45. Faria MHG and Rabenhorst SHB: Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Rev. Bras. Cancerol.* 2006; **52**: 165–171.
46. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, et al: Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2012; **106**: 768–774.
47. Sun Q, Zhao X, Liu X, et al: miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate* 2014; **74**: 1613–1621.
48. Lin S, Chiang A, Chang D, et al: Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *Rna* 2008; **14**: 417–424.
49. McDonald AC, Raman JD, Shen J, et al: Circulating microRNAs in plasma before and after radical prostatectomy. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 2019; **37**: 814.e1-814.e7.
50. Zhao Z, Weickmann S, Jung M, et al: A novel predictor tool of biochemical recurrence after radical prostatectomy based on a five-microRNA tissue signature. *Cancers (Basel).* 2019; **11**.
51. Ibrahim NH, Abdellateif MS, Thabet G, et al: Combining PHI and miRNAs as Biomarkers in Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis. *Clin. Lab.* 2019; **65**.
52. Iscaife A, Reis ST, Morais DR, et al: Treating metastatic prostate cancer with microRNA-145. *Apoptosis* 2018; **0**: 0.
53. Kwok PY and Gu Z: Single nucleotide polymorphism libraries: Why and

- how are we building them? Mol. Med. Today 1999; **5**: 538–543.
54. Brookes AJ: The essence of SNPs. Gene 1999; **234**: 177–186.
 55. Sauna ZE and Kimchi-Sarfaty C: Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. Nat. Rev. Genet. 2011; **12**: 683–691.
 56. Lu J, Wu Z, Peng J, et al: Programmed death-ligand 1 single nucleotide polymorphism affects breast cancer chemosensitivity and adverse events in the neoadjuvant setting. Int. J. Biol. Markers 2020: 1724600820926172.
 57. Hashemi M, Moradi N, Ziaee SAM, et al: Association between single nucleotide polymorphism in miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. J. Adv. Res. 2016; **7**: 491–8.
 58. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, et al: Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nat. Rev. Genet. 2009; **10**: 241–251.
 59. Wang X, Hayes JE, Xu X, et al: Validation of prostate cancer risk variants rs10993994 and rs7098889 by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. Elsevier B.V.; 2020.
 60. Crucitta S, Del Re M, Paolieri F, et al: CYP17A1 polymorphism c.-362T>C predicts clinical outcome in metastatic castration-resistance prostate cancer patients treated with abiraterone. Cancer Chemother. Pharmacol. 2020; **86**: 527–533.
 61. Seibert TM, Fan CC, Wang Y, et al: Polygenic hazard score to guide screening for aggressive prostate cancer: Development and validation in large scale cohorts. BMJ 2018; **360**: 1–7.
 62. Huynh-Le M-P, Fan CC, Karunamuni R, et al: A Genetic Risk Score to Personalize Prostate Cancer Screening, Applied to Population Data. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2020; **29**: 1731–1738.
 63. Bastami M, Choupani J, Saadatian Z, et al: Evidences from a systematic review and meta-analysis unveil the role of mirna polymorphisms in the predisposition to female neoplasms.; 2019.
 64. Ma XP, Zhang T, Peng B, et al: Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies. PLoS One 2013; **8**.
 65. Damodaran M, Paul SFD and Venkatesan V: Genetic Polymorphisms in miR-146a, miR-196a2 and miR-125a Genes and its Association in Prostate Cancer. Pathol. Oncol. Res. 2018: 1–8.
 66. Hu Y, Yu C-Y, Wang J-L, et al: MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. Sci. Rep. 2015; **4**: 3648.
 67. Chen G, Umelo IA, Lv S, et al: miR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. PLoS One 2013; **8**: 1–13.
 68. Emming S, Chirichella M and Monticelli S: MicroRNAs as modulators of T cell functions in cancer. Cancer Lett. 2018; **430**: 172–178.
 69. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, et al: *miR-146a* is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. J. Exp. Med. 2011; **208**: 1189–1201.
 70. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, et al: NF- B dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies.

- Proc. Natl. Acad. Sci. 2011; **108**: 9184–9189.
71. Zhang X, Gu Y, Liu X, et al: Association of Pre-miR-146a rs2910164 Polymorphism with Papillary Thyroid Cancer. *Int. J. Endocrinol.* 2015; **2015**.
 72. Lv M, Dong W, Li L, et al: Association between genetic variants in pre-miRNA and colorectal cancer risk in a Chinese population. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013; **139**: 1405–1410.
 73. Xu B, Feng N-H, Li P-C, et al: A functional polymorphism in *Pre-miR-146a* gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2009; **472**: n/a-n/a.
 74. Mi Y, Ren K, Zou J, et al: The Association between Three Genetic Variants in MicroRNAs (Rs11614913, Rs2910164, Rs3746444) and Prostate Cancer Risk. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018; **48**: 149–157.
 75. Huang S, Cui H, Lou Z, et al: Association of rs3787016 in long non-coding rnas polr2e and rs2910164 in mirna-146a with prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Iran. J. Public Health* 2018; **47**: 623–632.
 76. Qin C, Huang RY and Wang ZX: Potential role of miR-100 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Tumor Biol.* 2015; **36**: 1403–1409.
 77. Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, et al: microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2013; **8**: 1156–62.
 78. Leite KRM, Tomiyama A, Reis ST, et al: MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer-from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 2013; **31**: 796–801.
 79. Zhu Z, Wang C, Zhang Y, et al: MicroRNA-100 resensitizes resistant chondrosarcoma cells to cisplatin through direct targeting of mTOR. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014; **15**: 917–23.
 80. Feng B, Wang R and Chen LB: MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1. *Cancer Lett.* 2012; **317**: 184–191. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.024>.
 81. Salido-Guadarrama AI, Morales-Montor JG, Rangel-Escareño C, et al: Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone. *Mol. Med. Rep.* 2016; **13**: 4549–4560.
 82. Nabavi N, Nur Saidy NR, Venalainen E, et al: MiR-100-5p inhibition induces apoptosis in dormant prostate cancer cells and prevents the emergence of castration-resistant prostate cancer. *Sci. Rep.* 2017; **7**: 1–10.
 83. McDonald AC, Vira M, Walter V, et al: Circulating microRNAs in plasma among men with low-grade and high-grade prostate cancer at prostate biopsy. *Prostate* 2019; **79**: 961–968.
 84. Samli H, Samli M, Vatansever B, et al: Paclitaxel resistance and the role of miRNAs in prostate cancer cell lines. *World J. Urol.* 2019; **37**: 1117–1126.
 85. Chen M, Zhou ZY, Chen JG, et al: Effect of miR-146a polymorphism on biochemical recurrence risk after radical prostatectomy in southern

- Chinese population. *Genet. Mol. Res.* 2014; **13**: 10615–10621.
86. Chen Z, Jin Y, Yu D, et al: Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012; **48**: 686–91.
87. Blick C, Ramachandran A, Wigfield S, et al: Hypoxia regulates FGFR3 expression via HIF-1 α and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer. *Br. J. Cancer* 2013; **109**: 50–59.
88. Zhu J, Yang L, You W, et al: Genetic variation in miR-100 rs1834306 is associated with decreased risk for esophageal squamous cell carcinoma in Kazakh patients in northwest China. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; **8**: 7332–7340.
89. Danesh H, Hashemi M, Bizhani F, et al: Association study of miR-100, miR-124-1, miR-218-2, miR-301b, miR-605, and miR-4293 polymorphisms and the risk of breast cancer in a sample of Iranian population. *Gene* 2018; **647**: 73–78.