RUAN CÉSAR APARECIDO PIMENTA

**O papel dos microRNAs -221/-222 e -23b/-27b no câncer de próstata
resistente à castração**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sabrina Thalita dos Reis Faria

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pimenta, Ruan César Aparecido

O papel dos microRNAs -221/-222 e -23b/-27b no
câncer de próstata resistente à castração / Ruan César
Aparecido Pimenta. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Neoplasias da próstata
3.Apoptose 4.Ciclo celular 5.Flutamida

USP/FM/DBD-429/17

Dedicatória

Aos meus pais Luzia e José, com todo carinho e amor, agradeço por tudo que fazem para a realização dos meus sonhos. A minha amiga Grace Elli Borges (*in memorian*) que não pode terminar sua jornada, saudades eternas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, e não somente nestes anos, mas em todos os momentos esteve presente em minha vida.

A minha família, principalmente aos meus pais Luzia e José, minha tia Edna, minha prima Eduarda e meu irmão Evandro, que sempre me apoiaram nos estudos e nas horas mais difíceis.

A minha querida orientadora Prof.^a. Dr.^a. Sabrina Reis, por acreditar na minha capacidade no desenvolvimento deste trabalho, por ser um grande anjo na minha vida e também ser este grande exemplo de profissional, mulher e mãe para todos ao seu redor.

A Prof.^a. Kátia Leite pela oportunidade de estar com todos os amigos no LIM-55 e também trabalhar na Genoa Biotecnologia.

Ao Prof.^o. Miguel Srougi por sempre estimular e apoiar os trabalhos desenvolvidos no LIM-55 e ser um grande exemplo de humildade.

A todos os funcionários da Urologia, Elisa Cruz, pela grande ajuda durante todo o período e também às secretárias Inisabete, Tereza e Aparecida, sempre dispostas e ajudar.

Ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, pelo empenho em conduzir da melhor forma o programa de pós-graduação do Programa de Urologia.

As minhas amigas Nayara e Vanessa, que sempre estão comigo e me apoiando em todas minhas decisões, vocês se tornaram pessoas extremamente importantes na minha vida.

Aos amigos do LIM-55 que me ajudaram durante todo o trabalho, Denis Moraes, Isis Paloppi, Caio Martins, Renato Fidélis, Rubens Park, Gabriela Amaral e Juliana Camargo. Ao Dr. José Pontes e Dr. Nelson Dip pelo conhecimento e disponibilidade por terem participado da minha banca de qualificação e enriquecido nosso trabalho.

Aos amigos da Genoa Biotecnologia que sempre apoiaram Gabriela Garcia, Rodrigo Horas, Dr.^a. Ísida, Márcia Oliveira, Marlene Manzan, Elaine Siqueira, Adriana Oliveira, Eva Santos, Keith Takano e Hector Todisquine, também a Dra.^a. Juliana Canavez e ao Dr. Flávio Canavez por terem me recebido e me incorporado a equipe Genoa Humana.

As minhas amigas de faculdade que sempre me apoiaram e me fizeram acreditar que eu era capaz, Thalita Silva, Patrícia Rodrigues, Rafaela Garcia, Marcília Sousa e

também as minhas professoras da graduação que me transmitiram todo conhecimento de que necessitava para poder alçar voos maiores, Dr^a. Camila Piantino, Me. Alessandra Cheraim, Me. Nicole Bernardes e Me. Karina Maciel.

Aos amigos que São Paulo me trouxe, Allan Kribowl, Danilo Molina, Fernando Sulczewski, Guilherme Duque, João Cirqueira, João Romero e Itallo Santos, obrigado por me suportarem todo esse tempo. E claro não podendo esquecer do meu amigo Paulo Ricardo, por me suportar em todas as minhas crises e ter se tornado praticamente um irmão para mim.

Agradeço também aos amigos que vieram e se tornaram parte da minha família, Carlos Eduardo, Denis Roberto, Leandro Faria, Antônio Viana, Geraldo Reis e minhas amigas Neuza Reis, Rozi Viana, Elizabete Ribeiro e Alessandra Reis e também ao nosso pequeno Lucas e a pequena Laura que está por vir, estamos ansiosos.

À FAPESP, pelo apoio concedido para realização deste trabalho (2015/03582-6).

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviações

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer de Próstata	2
1.2.1 Terapia para o Câncer de Próstata Resistente à Castração (CPRC).....	6
1.2 Biologia Molecular do Câncer de Próstata	7
1.3 MicroRNAs.....	9
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGIA	16
3.1 Pacientes	17
3.2 Extração do RNA e microRNA total	18
3.3 Transcrição reversa (RT)	19
3.4 Análise de expressão de genes (p27-kip-1, CCNG1 e RA) e microRNAs (miR-221, miR-222, miR-23b e miR-27b) por PCR em tempo real quantitativo.....	20
3.5 Experimentos <i>in vitro</i>.....	22
3.5.1 Grupos de tratamento	23
3.5.2 Transfecção celular com microRNA e antimir-RNA.....	23
3.5.3 Exposição das células PC-3 à Flutamida	25
3.5.4 Ensaio de Apoptose por citometria de Fluxo	26
3.5.5 Ensaio de Ciclo Celular por citometria de Fluxo.....	27
3.6 Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Expressão dos genes e microRNAs nos espécimes cirúrgicos	31
4.1.1 Expressão dos genes e microRNAs de acordo com características clínico-patológicas.....	34
4.2 Estudos <i>in vitro</i>	36
4.2.1 Transfecção celular	36
4.2.1.1 Apoptose.....	38
4.2.1.2 Ciclo Celular	41
4.2.1.3 Ensaio de Proliferação.....	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	55
8. APÊNDICE	64

LISTA DE ABREVIACÕES

CaP- Câncer De Próstata

PSA- Antígeno Prostático Específico

INCA- Instituto Nacional do Câncer

TNM- Estádio Tumoral

ng- Nano gramas

mL- Mililitros

PR- Prostatectomia Radical

RT- Radioterapia

RA- Receptor Androgênico

LHRH- Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante

CPRC- Câncer de Próstata Resistente à Castração

LIM-55- Laboratório de Investigação Médica-55

miRs- microRNAs

RNA- Ácido ribonucleico

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

RNA_m- Ácido ribonucleico mensageiro

pri-microRNA- microRNA primário

DHT- Di-hidrotestosterona

HPB- Hiperplasia Prostática Benigna

DP- Desvio Padrão

cDNA- DNA complementar

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

RT- Transcriptase Reversa

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

qRT-PCR- Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

β 2M- Beta 2 mioglobulina

SFB- Soro Fetal Bovino

nM- nano molar

μ M- micro molar

rpm- rotação por minuto

FLU- Flutamida

CPHS- Câncer de Próstata Hormônio Sensível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematização da nova graduação proposta pela ISUP para o CaP e as curvas de sobrevida livre de recidiva de acordo com a nova graduação ⁽¹³⁾	5
Figura 2. Biogênese do microRNAs ⁽⁵⁸⁾	10
Figura 3. Perfil de expressão dos microRNAs e genes nas amostras teciduais de CaP.....	32
Figura 4. Resultado da transfecção com microRNAs anti-miR-221, anti-miR-222 e seu respectivo gene alvo p27Kip-1 para ambos os microRNAs em linhagem PC-3.....	36
Figura 6. Expressão gênica, CCNG1, após transfecções e tratamentos na linha celular PC-3. A) Superexpressão do gene CCNG1 após tratamento usando os microRNAs -23b/-27b. B) Superexpressão do gene, CNG1, após tratamento com FLU. C) Subexpressão do gene CCNG1 após o tratamento com microRNAs -23b/-27b e FLU.....	37
Figura 5. Expressão do gene RA em linhagem celular PC-3.	38
Figura 7. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de apoptose após marcação com Anexina V. A) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com Anti-miR-221; B) Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com Anti-miR-221; C) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com Anti-miR-222; D) Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com Anti-miR-222.	40
Figura 8. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de apoptose após marcação com Anexina V. A) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com miR-23b+FLU; B) Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com miR-23b+FLU; C) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com miR-27b+FLU; D) Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com miR-27b+FLU.	41
Figura 9. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de ciclo celular após marcação com IP e RNase A. A) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com anti-miR-221 B) Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com anti-miR-221; C) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com anti-miR-222+FLU; D) Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com anti-miR-222.	43
Figura 10. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de ciclo celular após marcação com IP e RNase A. A) População celular da linhagem PC-3, transfectada com miR-23b+FLU; B) Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com miR-23b+FLU; C) População celular da linhagem PC-3, transfectada com miR-27b+FLU; D) Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com miR-27b+FLU.	44
Figura 11. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de proliferação celular marcadas com Muse® Hu Ki67 e Muse Hu IgG1. A) População celular da linhagem PC-3, controle; B) Perfil de proliferação celular PC-3 tratado, controle; C) População celular da linhagem PC-3, tratada com FLU; D) Perfil de proliferação celular PC-3 tratada com FLU.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento patológico TNM.....	3
Tabela 2. Dados clínicos-patológicos dos pacientes estudados.....	18
Tabela 3. Primers utilizados para quantificação da expressão dos microRNAs e genes pelo método de qRT-PCR.	21
Tabela 4. Tabela de reagentes utilizados para transfecção do pré-miR e anti-miR.....	24
Tabela 5. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com a resistência androgênica.....	34
Tabela 6. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com o PSA.	34
Tabela 7. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com o Estadiamento Patológico.....	35
Tabela 8. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com Escore de Gleason.....	35
Tabela 9. Médias da porcentagem de apoptose dos grupos tratados com miR vs miR+FLU.	39
Tabela 10. Médias da porcentagem do ensaio de ciclo celular dos grupos tratados com miR, miR+FLU e FLU.	42
Tabela 11. Ensaio de proliferação em linhagem celular PC-3.....	45

RESUMO

Pimenta RCA. *O papel de microRNAs -221/-222 e -23b/-27b no câncer de próstata resistente à castração* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: Com comportamento biológico heterogêneo e alta incidência, o Câncer de Próstata (CaP), apresenta uma grande variabilidade na agressividade da neoplasia. O CaP primário possuiu altas taxas de cura quando diagnosticado na sua forma inicial. Aproximadamente 35% dos pacientes acometidos pela neoplasia evoluem para a doença metastática. A aquisição de um fenótipo independente de andrógeno pelas células cancerosas da próstata é a alteração que apresenta o pior prognóstico para os pacientes. Uma investigação a respeito dos mecanismos de resistência ao tratamento hormonal bem como sobre possíveis mecanismos proporcionados por moléculas reguladoras, como os microRNAs, podem nos auxiliar na compreensão desse fenótipo resistente. **Objetivos:** Avaliar o perfil de expressão dos miR-221, miR-222, miR-23b e miR-27b e dos genes p27 Kip-1, CCNG1 e RA em amostras teciduais de pacientes com CaP primário que responderam ou não a terapia hormonal e correlacionar com os fatores prognósticos clássicos do CaP, além de avaliar o papel dos microRNAs anti-miR-221, anti-miR-222, miR-23 e miR-27b em experimentos *in vitro* utilizando ensaios de apoptose, ciclo e proliferação celular em ambientes exposto e não exposto a Flutamida (FLU) em linhagem celular sabidamente resistente à castração (PC-3). **Materiais e Métodos:** Selecionamos retrospectivamente 44 amostras de tumores primários de pacientes com CaP clinicamente localizado e que foram submetidos à prostatectomia radical. Dos 44 pacientes apenas nove continuaram a responder a hormônio terapia e 35 se mostraram resistente em menos de um ano de tratamento. O grupo controle foi constituído de dez espécimes cirúrgicos de pacientes que possuíam Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). Para análise de expressão gênica e dos microRNAs os materiais genéticos foram obtidos utilizando protocolos convencionais de extração e técnica de qRT-PCR utilizando primers específicos para cada tipo de microRNA e gene. Os ensaios celulares de avaliação da apoptose, ciclo e proliferação celular foram realizados no citômetro MUSE utilizando linhagem celular PC-3 seguindo as recomendações do fabricante. Os grupos nos três ensaios eram constituídos das seguintes formas: controle, microRNA, FLU e microRNA+FLU. **Resultados:** Encontramos subexpressão dos miR-221, miR-222, miR-23b e miR-27b no CaP em comparação com o HPB, em relação aos genes, foi observada superexpressão dos três genes analisados, p27 Kip-1, CCNG1 e RA. Encontramos correlação significativa entre a maior expressão do miR-23b e o grupo de pacientes que possuíam PSA>10ng/mL. No ensaio de apoptose encontramos relações significativas entre as taxas de apoptose total nos grupos tratados com miR-23b+FLU e miR-27b+FLU em relação ao controle ($p=0,0006$ e $p=0,003$ respectivamente). No ensaio de ciclo celular, demonstramos que dentre os grupos já mencionados anteriormente, o que melhor demonstrou resultado foi o grupo tratado apenas com FLU, reduzindo o número de células na fase final, G2-M ($p>0,0001$). Igualmente ao ciclo celular, o ensaio de proliferação demonstrou melhores resultados quando as células foram tratadas com FLU, ocorrendo uma diminuição discreta quando comparadas ao grupo controle ($p<0,05$). **Conclusão:** Nossos resultados demonstram subexpressão dos 4 microRNAs estudados nas amostras dos pacientes com CaP e superexpressão dos três genes analisados nestes mesmos casos. Postulamos que exista um efeito sinérgico entre os microRNAs 23b/27b juntamente com a FLU no ensaio de apoptose, e demonstramos que apenas a FLU obteve resultado significativo no controle do ciclo celular e de células em proliferação em linhagem PC-3.

Descritores: microRNAs; neoplasias da próstata; apoptose; ciclo celular; flutamida.

SUMMARY

Pimenta RCA. *The role of microRNAs -221/-222 and -23b/-27b in castration-resistant prostate cancer* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Introduction: Prostate Cancer (PCa) is a heterogeneous disease heterogeneous with high incidence, presents a great variability in the aggressiveness of the neoplasia. Primary PCa has high cure rates when diagnosed in its initial form. Approximately 35% of the patients affected by the neoplasia evolve to metastatic disease. The acquisition of an androgen-independent phenotype by prostate cancer cells is the change that presents the worst prognosis for patients. An investigation about mechanisms of resistance to hormone treatment as well as possible mechanisms provided by regulatory molecules, such as microRNAs, may help us to understand this resistant phenotype. **Objectives:** To evaluate the expression profile of miR-221, miR-222, miR-23b and miR-27b and p27 Kip-1, CCNG1 and AR genes in tissue samples from patients with primary PCa who have or have not responded to hormone therapy and to evaluate the role of anti-miR-221, anti-miR-222, miR-23 and miR-27b microRNAs in *in vitro* experiments using apoptosis, cycling and cell proliferation assays in environments exposed and not exposed to Flutamide (FLU) in cell line known to be resistant to castration (PC-3). **Materials and Methods:** We retrospectively selected 44 primary tumor samples from patients with clinically localized PCa and who underwent radical prostatectomy. Of the 44 patients, only nine continued to respond to hormone therapy and 35 were resistant in less than one year of treatment. The control group consisted of ten surgical specimens from patients who had Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). For gene expression analysis and microRNAs the genetic materials were obtained using conventional extraction protocols and qRT-PCR technique using primers specific for each type of microRNA and gene. Cell assays of apoptosis, cycle and cell proliferation were performed on the MUSE cytometer using PC-3 cell line following the manufacturer's recommendations. The groups in the three trials were composed of the following forms: control, microRNA, FLU and microRNA+FLU. **Results:** We found subexpression of the miR-221, miR-222, miR-23b and miR-27b in PCa compared to BPH, in relation to the genes, overexpression of the three genes analyzed, p27 Kip-1, CCNG1 and AR was observed. We found a significant correlation between the greater expression of miR-23b and the group of patients who had PSA>10ng/mL. In the apoptosis assay we found significant relationships between total apoptosis rates in the groups treated with miR-23b+FLU and miR-27b+FLU in relation to the control ($p=0.0006$ and $p=0.003$ respectively). Similarly to the cell cycle, the proliferation assay showed better results when the cells were treated with FLU, in this case a discrete decrease occurring when compared to the control group ($p<0.05$). **Conclusion:** Our results demonstrate subexpression of the 4 microRNAs studied in the samples of patients with PCa. An anarchic expression of the p27 Kip-1 gene, overexpression of CCNG1 and AR genes in cases. We postulated that there is a synergistic effect between -23b/-27b microRNAs along with FLU in the apoptosis assay, and we demonstrated that only FLU had a significant effect on cell cycle control and proliferating in PC-3 cell line.

Descriptors: microRNAs; prostatic neoplasms; apoptosis; cell cycle; flutamide

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é o tumor não cutâneo mais comum em homens e a segunda causa de óbito por câncer no Brasil. Mais do que qualquer outro tipo, o CaP é considerado o câncer da terceira idade, onde três quartos de casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O CaP é responsável por 13,8% das mortes decorrentes de câncer no sexo masculino, similar ao que ocorre com o câncer de mama no sexo feminino, que corresponde a 15,8% das mortes por câncer em mulheres ⁽¹⁾.

De acordo com as estatísticas apresentadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2016 aproximadamente 61.200 homens foram afetados por essa neoplasia no Brasil ⁽¹⁾. Para o ano de 2017 estão estimados 161.360 novos casos desta neoplasia e uma estimativa de morte de aproximadamente 26.730 homens nos EUA ⁽²⁾.

Dos fatores de risco para o CaP o que mais se destaca é a idade. A maioria dos diagnósticos são realizados em homens com idade igual ou superior a 65 anos. Achados incidentais desta neoplasia ocorrem em cerca de 80% dos homens com idade superior ou igual a 80 anos e de 10 a 15% por volta dos 50 anos. Nos EUA a média de idade do diagnóstico pode variar de acordo com a raça sendo de 71 anos em indivíduos pertencentes à raça branca e 69 anos em indivíduos da raça negra ^(3, 4).

O CaP hereditário é responsável por 5 a 10% dos casos. Histórico familiar de pai ou irmão (parentes de primeiro grau), com CaP antes dos 60 anos de idade é outra característica de risco importante, podendo elevar o risco de desenvolvimento desta neoplasia de 3 a 10 vezes. Isso pode ser resultado tanto de características herdadas, quanto de estilos de vida partilhados entre integrantes de uma mesma família ^(5, 6).

A detecção do CaP se dá pelo exame de toque retal (TR) e determinação da concentração sérica do antígeno prostático específico (PSA) ⁽⁷⁾. É importante à associação

da dosagem de PSA ao TR, já que o TR tem alta especificidade (94%), porém baixa sensibilidade (50%), assim como baixo valor preditivo positivo (21%-53%). O valor considerado normal do PSA é menor que 2,5 ng/mL e apesar de específico da glândula prostática, o nível de PSA no sangue se eleva não só no CaP, mas também na hiperplasia prostática benigna (HPB) e prostatite ⁽⁸⁾.

O método padrão-ouro para o diagnóstico definitivo é a biópsia prostática guiada pela ultrassonografia transretal (BTRUS). Elevados níveis séricos de PSA e TR alterado são indicativos de biópsia, único método diagnóstico da neoplasia ⁽⁹⁾.

O prognóstico depende fundamentalmente do estágio tumoral (TNM) e grau de diferenciação histológica (Gleason), além dos valores pré-operatórios do PSA. A progressão do CaP, entretanto, é variada, pois existem tumores de baixo grau com evolução indolente, enquanto outros possuem alta capacidade de progressão. Atualmente, não há nenhum marcador definitivo que permita a diferenciação entre essas formas de tumores. A classificação TNM no câncer de próstata segue a recomendação da AJCC (2010) conforme Tabela 1.

Tabela 1. Estadiamento patológico TNM.

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)

Um dos mais importantes fatores prognósticos é a graduação histológica, sendo a graduação de Gleason a mais utilizada. Existem cinco padrões na escala de graduação de Gleason para o CaP considerando o padrão glandular e a sua relação com o estroma prostático. O diagnóstico final é dado pela soma dos valores dos dois focos neoplásicos mais representativos do tumor, de forma que as neoplasias serão classificadas em um escore de 2 a 10 ^(10, 11). Tumores com escore de Gleason 2 a 6 são considerados bem diferenciados e têm um comportamento mais indolente enquanto os tumores com escore de 7 a 10 são mais agressivos ⁽¹⁰⁾.

As diversas revisões do sistema de graduação de Gleason mostraram que muito raramente se diagnostica um tumor com escore de 2 a 5, sendo que na biópsia a menor graduação é o Gleason 6 (3+3) ⁽¹¹⁾. Analisando os dados da literatura que demonstram um comportamento indolente da neoplasia Gleason 6 ⁽¹²⁾ a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) propôs um novo sistema de graduação que classifica os tumores de 1 a 5 como exposto na Figura 1, sendo grau 1 correspondente a Gleason 3+3, grau 2 ao Gleason 3+4, grau 3 Gleason 4+3, grau 4 Gleason 3+5, 5+3 e 4+4 e por fim o

grau 5 corresponde aos Gleason 4+5, 5+4 ou 5+5 ⁽¹³⁾. Essa nova graduação recomendada pela ISUP se mostra mais realista ao prognóstico dos pacientes acometidos pelo CaP e busca melhorar o desempenho de grau histológico (Figura 1).

Figura 1. Esquematização da nova graduação proposta pela ISUP para o CaP e as curvas de sobrevida livre de recidiva de acordo com a nova graduação ⁽¹³⁾.

De acordo com D'Amico e colaboradores no final da década de 90 foi proposto uma estratificação que tem como finalidade prever o risco de recidiva bioquímica posterior a prostatectomia radical ou até mesmo a radioterapia. Esta estratificação divide os pacientes com doença localizada em risco baixo, intermediário e alto. Pacientes que apresentam doença localizada de baixo risco possuem estágio clínico T1/T2a, PSA ≤ 10 ng/mL e Gleason ≤ 6 . O CaP de risco intermediário consiste de estadiamento T2b, PSA 10-20 ng/mL e ou Gleason 7. Já o grupo de alto risco é postulado como sendo tumores $\geq T2c$, PSA > 20 ng/mL ou Gleason 8-10 ⁽¹⁴⁾.

De acordo com o tratamento do CaP, destacamos para tumores de baixo grau a vigilância ativa que tem por finalidade acompanhar de perto um paciente com frequentes realizações de exames, como dosagem do PSA, exames de imagens e biópsias. Tal

tratamento busca oferecer uma forma de terapêutica que evite as comorbidades associadas a outros tratamentos, contudo, este tratamento é contínuo se nenhuma alteração for encontrada no seu decorrer ⁽¹⁵⁾.

As medidas tomadas para indicar à alternativa de vigilância ativa são diversas, entretanto a mais comum considera estágio clínico T1c ou T2a, Gleason ≤ 6 e PSA ≤ 10 ng/mL. Para pacientes não candidatos à vigilância ativa que necessitam ou querem tratamento curativo e imediato, a prostatectomia radical (PR) e a radioterapia (RT) apresentam taxas de cura de 95% e 75% em 10 anos ^(16, 17). Normalmente a PR e a RT são procedimentos mais utilizados para o tratamento de CaP localizado, enquanto a hormônioterapia é comumente usada como tratamento de primeira linha para o CaP metastático ⁽¹⁸⁾. Todavia, pacientes que recebem o mesmo diagnóstico podem apresentar diferentes taxas de progressão e diversas respostas ao mesmo tratamento ⁽¹⁹⁾. Esse acontecimento pode estar atrelado às diferentes condições populacionais, ambientais e genéticas.

1.2.1 Terapia para o Câncer de Próstata Resistente à Castração (CPRC)

Estudos publicados em 1941 por Charles Huggins e Clarence Hodges estabeleceram a relação entre o crescimento do adenocarcinoma prostático e hormônios androgênicos. No momento em que a testosterona foi suprimida farmacologicamente, ou cirurgicamente foram observadas melhorias nos níveis das fosfatases ácidas e alcalinas e efeitos benéficos foram notados em homens com CaP avançado e metastático ⁽²⁰⁾.

Em um período variável de 3 a 5 anos, um tumor previamente hormônio responsivo passa a adquirir mecanismos ainda não completamente compreendidos que diminuem sua dependência de níveis altos de testosterona ^(21, 22). Ativação e

superexpressão de alguns outros fatores pró-tumorais e anti-apoptóticos, bem como expressão de receptores do tipo tirosina quinase HER-2, AKT, FKBP5, estão sendo relacionados com o surgimento e crescimento do CPRC ⁽²³⁾.

A Flutamida (FLU) foi o primeiro antiandrógeno não esteroide amplamente utilizado para tratar pacientes com CaP avançado. Menores taxas de sobrevivência foram observadas quando a FLU foi utilizada como monoterapia ⁽²⁴⁾.

No passado o docetaxel era o único agente farmacológico que mostrava benefício comprovado no tratamento CPRC ⁽²⁵⁾. A partir de então, novos agentes como o cabazitaxel, abiraterona, enzalutamida, sipuleucel-T, e o radiofarmaco rádio-223 têm demonstrado prolongar a sobrevida de pacientes acometidos pelo CPRC e com isso o arsenal terapêutico contra esta doença vem aumentando gradativamente ⁽²⁶⁻³⁰⁾.

1.2 Biologia Molecular do Câncer de Próstata

Com biologia peculiar e alta incidência o CaP apresenta uma grande variabilidade de agressividade, podendo se iniciar com comportamento indolente e se estendendo até uma patologia incurável, quando a terapêutica é bem limitada ⁽³¹⁾.

Na próstata normal, bem como no câncer em geral, existe um equilíbrio entre vários processos celulares, tais como, atividade de proliferação e apoptótica ⁽³²⁾. Várias teorias têm sido sugeridas na tentativa de esclarecer e compreender os diversos mecanismos envolvidos no processo neoplásico da próstata.

A perda do cromossomo 8p21 é um fato precoce na carcinogênese prostática ⁽³³⁾. O oncogene MYC está localizado no braço longo do cromossomo 8, região 2, banda 4, regiões que apresentam múltiplos genes que estão associados ao CaP ⁽³⁴⁾. O gene P53 (17q31) possui um papel importantíssimo na transcrição de genes envolvidos na apoptose,

ciclo celular e na reparação de danos de DNA, e alterações nesse gene estão associadas à recorrência do tumor após radioterapia e terapia de supressão androgênica no CaP ⁽³⁵⁾.

Alguns estudos têm demonstrado que deleções no gene E-caderina e deleção do gene PTEN no CaP aumenta a capacidade invasiva das linhagens celulares desta neoplasia ^(36, 37). Amostras de CaP que possuem E-caderina subexpressa tendem a ter altas frequências de rearranjos intracromossômicos e podem apresentar um pior prognóstico ⁽³⁸⁾.

Inúmeros mecanismos são responsáveis pela progressão para resistência à castração. Amplificações genômicas ocorrem em cerca de 60% das metástases do CPRC ⁽³⁹⁾. Alguns mecanismos já foram propostos na tentativa de explicar a resistência à castração, tais como, modificação de expressão de cofator, andrógenos convertidos a partir de precursores adrenais e ativação constitutiva por variantes do gene receptor de andrógeno (RA) ⁽³⁸⁾.

Estudos moleculares têm identificado alterações genômicas potencialmente relevantes no CaP, tais como, microdeleções, inserções e rearranjos cromossômicos, além de inibição e superexpressão gênica ⁽³⁴⁾. Embora as taxas de mutação no CPRC sejam baixas, várias destas também estão ligadas às mutações do RA ^(39, 41).

Alterações citogenéticas como deleções, inserções e rearranjos cromossômicos são observadas no CPRC especialmente na linhagem celular PC-3. Muitas destas estão relacionadas à transição do CaP sensível para o CPRC ⁽⁴²⁾.

A caracterização molecular de CPHS e do CaP metastático incluindo a sua evolução para resistente a castração tem sido a razão de várias pesquisas inclusive em nosso laboratório (LIM55). A investigação profunda acerca dos mecanismos de resistência ao tratamento hormonal bem como sobre possíveis mecanismos

proporcionados por moléculas reguladoras, como os microRNAs (miRs), podem auxiliar na compreensão da biologia molecular do CPRC ^(43, 44).

1.3 MicroRNAs

Os microRNAs compreendem um grupo de pequenas moléculas de RNA que possuem entre 19 e 25 nucleotídeos, com ação fundamental na regulação da expressão gênica de animais e vegetais ⁽⁴⁵⁾. Tais moléculas foram descobertas há mais de 20 anos ⁽⁴⁶⁾ e são reconhecidas como moléculas que atuam de modo importante no controle pós-transcricional da maior parte dos genomas eucariotos.

Já foram descritos aproximadamente 2.600 microRNAs relacionados com a regulação de mais de 30% dos genes humanos ^(47, 48). Estas pequenas moléculas estão envolvidas em uma série de processos celulares, como sobrevivência, apoptose, diferenciação, desenvolvimento e proliferação celular ⁽⁴⁹⁾. Podem atuar também como supressores ou até mesmo estimuladores de uma atividade celular específica. Contudo, a expressão irregular dessas pequenas moléculas tem sido relacionada ao desenvolvimento e comportamento de diferentes doenças humanas ⁽⁵⁰⁾.

Os microRNAs são sintetizados pela RNA polimerase II e transformados após a transcrição pelo acréscimo de uma *cap* na região 5' e uma cauda poli A na região 3'. O precursor primário dos microRNAs, até então denominado pri-microRNA, forma uma estrutura do tipo *hairpin* e, no núcleo, é submetido à ação do complexo microprocessador nuclear Drosha e então convertido em pré-microRNA, uma molécula de fita dupla de aproximadamente 60-70 nucleotídeos ^(51, 52). O pré-microRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela proteína Exportina-5, onde a mesma é responsável pelo transporte núcleo-citoplasmático de macromoléculas, incluindo ácido ribonucleico ⁽⁵³⁾. Já no

citoplasma o pré-microRNA é clivado pela enzima Dicer, transformando-o assim em um microRNA duplex contendo o RNA maduro e sua fita complementar. Posteriormente temos novamente a ação da Dicer que cliva a dupla fita e produz o microRNA maduro de fita única, que então é incorporado a um complexo efetor denominado RISC (complexo silenciador induzido por RNA) ^(54, 56). Este complexo RISC leva o microRNA maduro até seu RNAm alvo e então ocorre a repressão da tradução da proteína ou a promoção da degradação do RNA. Esta ação dependerá do grau de complementariedade do microRNA com seu RNAm alvo, podendo haver um pareamento completo ou parcial ^(45, 57).

Nas últimas décadas, foi possível observar que o número de genes humanos conhecidamente regulados por estes microRNAs aumentaram ^(59, 60). Uma molécula de microRNA pode ter mais de 100 RNAm alvos, com diversas funções. Acredita-se que de um terço a metade dos genes humanos sejam controlados por este mecanismo ⁽⁶¹⁾.

Figura 2. Biogênese do microRNAs ⁽⁵⁸⁾.

Os microRNAs estão localizados entre as regiões intergênicas, assim como em íntrons e podem fazer parte da fita codificante ou não codificante. Acredita-se que metade desses microRNAs estejam localizados nos chamados sítios frágeis do genoma, onde as anormalidades estão associadas à diversas patologias, dentre elas o câncer ⁽⁶²⁾.

Alguns microRNAs têm sido relacionados ao processo de transição para o CPRC. Análises do perfil de expressão de microRNAs em linhagens celulares hormônio sensível e resistente de CaP, apresentam diferenças importantes. Dentro deste subconjunto, os miR-221 e miR-222 foram significativamente mais expressos no CPRC enquanto miR-23b e miR-27b encontram-se em níveis reduzidos nesse estágio do tumor ⁽⁶³⁾.

Os miR-221/-222 são codificados juntos e estão localizados no braço curto do cromossomo X. A superexpressão ectópica desses microRNAs resulta em redução da expressão do gene p27 (Kip-1) ⁽⁶⁴⁾. O gene p27 é um inibidor de quinases dependentes de ciclina com papel importante na regulação de muitos tipos celulares. Sua atuação no ciclo celular induz a mudança de fase G1 para S, o que é suficiente para estimular intensa proliferação celular ^(65, 66).

O miR-221 atua como marcador prognóstico em pacientes com CaP localmente avançado por ser um preditor de mortalidade. Já foi demonstrado que pacientes com Escore de Gleason alto e com expressão de miR-221 elevada apresentaram resistência à hormônioterapia mais precocemente quando comparados com pacientes que apresentam baixa expressão de miR-221 ⁽⁶⁷⁾. Sun et al, verificaram que a superexpressão de miR-221/-222 reduz significativamente a sensibilidade do tumor ao estímulo por diidrotestosterona (DHT), medida através da redução da transcrição de RNAm de PSA induzido por DHT ⁽⁶³⁾. Além disso, a aplicação de anti-miR-221 e anti-miR-222 separadamente reverteu a sensibilidade do tumor a DHT na linhagem modificada chamada LNCaP-abl. A análise do crescimento celular mostrou que a elevação da

expressão de miR-221 aumentou o crescimento celular independente de DHT e diminuiu a resposta a este.

Os miR-23b e miR-27b são codificados no cromossomo 9 humano e encontram-se em níveis reduzidos em CPRC. Sun et al. (2009) verificaram níveis reduzidos desses microRNAs em tumores primários e ainda mais reduzidos em tumores metastáticos. Estudos anteriores caracterizaram esses microRNAs como supressores de metástases, uma vez que a expressão ectópica de miR-23b/-27b foi associada à redução de invasão e migração celular em CPRC. Além disso a inibição desses microRNAs acarretou no aumento do processo metastático. Não houve, no entanto, alteração de proliferação celular. Esse mecanismo pode estar relacionado à E-caderina, pois a expressão de miR-23b/-27b aumenta os níveis dessa molécula de adesão ⁽⁶⁸⁾.

O gene CCNG1 é um potencial gene alvo dos miRs-23b/-27b, e este se encontra superexpresso em diversas células neoplásicas, incluindo linhagens celulares de CaP. Estudos têm tentado demonstrar que o CCNG1 tem função semelhante ao papel do gene TP53 no reparo de danos do DNA ^(69, 70).

Combinações terapêuticas no campo da oncologia, principalmente quando nos referimos ao CPRC são de grande interesse. Nas últimas décadas, os microRNAs receberam uma atenção primordial como fatores de desenvolvimento e progressão tumoral, agindo como supressores tumorais ou como oncomiRs e recentemente alguns autores têm postulado o papel dos microRNAs no tratamento do câncer ^(71, 72).

O presente estudo visa analisar uma relação entre a expressão dos miRs-221/-222 e dos miRs-23b/-27b e seus possíveis genes-alvo, p27-Kip1 e CCNG1 respectivamente. Tal expressão foi realizada em amostras teciduais de pacientes que possuíam CaP primário, que apresentaram recidiva bioquímica, após isto iniciaram tratamento hormonal e progrediram ou não para o CPRC. A avaliação do perfil de expressão destes

microRNAs em pacientes com CaP que vieram ou não a evoluir para o CPRC pode representar um passo inicial na compreensão do papel destes microRNAs na discriminação de quais pacientes se beneficiariam com o início do tratamento hormonal. Além disso, por meio de ensaio *in vitro* em linhagem celular PC-3 poderemos compreender o papel destes microRNAs no ambiente resistente à castração, o que poderia auxiliar no desenvolvimento de terapias alvo moleculares para este tipo de tumor.

2. OBJETIVOS

Avaliar o perfil de expressão dos miR-221, miR-222, miR-23b e miR-27b e dos genes p27-Kip1, CCNG1 e RA em amostras teciduais de pacientes com CaP localizado que progrediram ou não para o CPRC e correlacionar esta expressão aos fatores prognósticos clássicos do CaP.

Avaliar o papel dos Anti-miR-221, Anti-miR-222 e dos miR-23b e miR-27b nos ensaios de apoptose, ciclo celular e proliferação em linhagem celular de CPRC que serão ou não expostas a FLU (PC-3).

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes

O estudo foi realizado utilizando 44 amostras de espécimes cirúrgicos de pacientes com CaP clinicamente localizado que foram submetidos à prostatectomia radical, com média de idade de 63,64 anos e tempo médio de seguimento de 94,32 meses. Todos os 44 pacientes apresentaram recidiva bioquímica e iniciaram tratamento hormonal. Dos 44 pacientes apenas nove responderam inicialmente a terapia hormonal em período mínimo de um ano e 35 pacientes se mostraram resistentes a hormônio terapia em período máximo de um ano de tratamento e apresentaram elevações nos níveis do PSA. O grupo controle foi constituído por dez pacientes que possuíam diagnóstico confirmado de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). As características destes pacientes estão descritas na Tabela 2.

Os pacientes com CaP foram classificados quanto às características clínico-patológicas e a Resistência ao andrógeno. Em relação às características clínico-patológicas, o grupo foi subclassificado de acordo com Estádio Patológico (tumor órgão confinado - pT2 e não órgão confinado - pT3), nível de PSA pré-operatório (10ng/mL e ≥ 10 ng/mL) e conforme nova graduação proposta pela ISUP (ISUP-1, ISUP 2 – 4 e ISUP-5).

Todos os pacientes que foram selecionados para esta pesquisa fazem parte e são acompanhados em uma clínica particular do Prof. Dr. Miguel Srougi. A seleção dos mesmos foi realizada a partir dos prontuários e estes pacientes foram chamados e convidados a participarem da pesquisa. Os pacientes que concordaram em fazer parte do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 085/15.

Tabela 2. Dados clínicos-patológicos dos pacientes estudados.

	Casos CaP (N=44)	Casos HPB (N=10)
Idade (anos)		
Variação	47 – 76	60 – 84
Média (DP)	63,64 (8,38)	69,6 (7,50)
PSA (ng/mL)		
Variação	0,22 – 58,40	1,0 – 3,5
Média (DP)	12,37 (33,44)	2,2 (0,86)
<10 N(%)	21 (48,84)	
≥10 n(%)	22 (51,16)	
Estádio Patológico		
pT2 N(%)	6 (13,64)	
pT3 N(%)	38 (86,36)	
Escore de Gleason		
Variação	2 – 9	
Média (DP)	7 (1,41)	
≤7 N(%)	27 (61,36)	
>7N(%)	17 (38,64)	
Resistência Androgênica		
Sim N(%)	35 (79,5)	
Não N(%)	9 (20,5)	

3.2 Extração do RNA e microRNA total

Para extração de microRNA e RNA dos espécimes cirúrgicos foi utilizado o kit de isolamento *miRVana*[®] microRNA (Ambion, Austin, TX), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA incluindo os microRNAs.

As preparações das amostras de tecido fresco foram realizadas em gelo e uma forma rápida possível para evitar a degradação por proteases. As amostras de tecido foram maceradas no equipamento Tissue Lyser LT (Qiagen, Germantown, USA) com 500µL

do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tecidual) e 10% do volume total de aditivo para homogeneização em seguida os tubos foram colocados em gelo por 4 minutos. Foram adicionados 500µL de fenol-clorofórmio, e as amostras foram agitadas em *vortex* e centrifugadas na velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 100% a temperatura ambiente. A solução então foi transferida para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Nesta fase o filtro contém RNA e o filtrado, os pequenos RNA. O filtro foi então reservado. Ao filtrado foram adicionados 2/3 do volume de etanol e transferidos para uma nova coluna, centrifugadas e o filtrado descartado. Retomando os filtros com o RNA, foram realizadas lavagens com soluções próprias do kit, intercaladas com centrifugações. Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1 min a 10.000g para secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e então adicionados 50µL de água livre de RNase pré-aquecida a 95°C, no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente, a coluna contendo os microRNAs e o RNA foram centrifugados e armazenados a -80°C até sua utilização.

A pureza e concentração do microRNAs e do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280nM).

3.3 Transcrição reversa (RT)

O DNA complementar (cDNA) do microRNA foi obtido usando *TaqMan® microRNAs Reverse Transcription kit* (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 200ng/µL de microRNA foi diluída em 20µL de água. Deste volume, 3µL foram submetidos à transcrição reversa, onde foi adicionado 7µL de mix contendo os

reagentes do kit: 0,15µL de DNTP mix, 0,5µL da enzima transcriptase reversa, 1,5µL do tampão da enzima, 0,19µL de inibidor de RNase, 3,66µL de água livre de nucleasse e 1µL de *primer stem-loop* com sequência específica para os microRNAs, totalizando 10µL de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Vertiti® (AppliedBiosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30min a 16°C, 30min a 42°C e 5min a 85°C.

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada utilizando-se o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems) que utilizou a *Transcriptase reversa Multiscribe TM* e primers randômicos. O RNA total foi então diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20µL e concentração de 500ng/µL. A este volume foram acrescentados 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10x), 1,6µL do mix de dNTPs (25x), 4µL do tampão da enzima (10x), 2µL da enzima transcriptase reversa e 8,4µL de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (25°C por 10min, 37°C por 120min e 85°C por 5min) no termociclador Vertiti® (AppliedBiosystem, Foster City, CA). Ao final das reações ambos os cDNA foram armazenados a -20 °C até o uso.

3.4 Análise de expressão de genes (p27-kip-1, CCNG1 e RA) e microRNAs (miR-221, miR-222, miR-23b e miR-27b) por PCR em tempo real quantitativo.

A expressão dos microRNAs e RNAs estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR) no sistema ABI 7500 *Fast* no modo *standard* utilizando-se Master Mix PCR TaqMan Universal (AppliedBiosystems, Foster

City, CA). A expressão de microRNAs e RNA individuais foram analisadas utilizando-se *primers* sequência-específicos adquiridos pela Applied Biosystems (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados para quantificação da expressão dos microRNAs e genes pelo método de qRT-PCR.

Genes e microRNAs	Identificação do ensaio
p27kip-1	Hs1597588_m1
CCNG1	Hs00171112_m1
RA	HS00171172_m1
miR-221	000524
miR-222	002276
miR-23b	000400
miR-27b	000409
RNU48	1006
B2M	Hs00984230_m1

Este protocolo TaqMan® utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após

quebra da sonda permite a quantificação do microRNA e do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR.

Para amplificação dos fragmentos desejados as reações foram feitas com 0,5µL de uma solução contendo um par de *primer* e a sonda (com a marcação), 5µl do TaqMan Master Mix, 3,5µL de água livre nuclease e 1µL de cDNA, somando um total de 10µL para cada reação. As condições das reações foram: 2min a 50°C, 10min a 95°C e 40 ciclos de 15seg a 95°C e 1 min a 60°C. O nível de expressão dos microRNAs e dos genes alvo foram obtidos pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁶. No gráfico logarítmico, esse método padroniza a expressão do controle normal como uma linha basal (representada pelo número 1), a expressão relativa de cada microRNA e RNA para cada amostra é demonstrada em vezes o normal para mais, nos casos de superexpressão, e para menos, nos de subexpressão. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

3.5 Experimentos *in vitro*

Para avaliação da expressão de genes e microRNAs na doença metastática, utilizamos linhagem comerciais de adenocarcinoma de próstata humano metastático. A linhagem utilizada foi a PC-3, obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC). As células PC-3 são hormônio-resistentes provenientes de metástase óssea.

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

3.5.1 Grupos de tratamento

Para os experimentos *in vitro* os grupos foram constituídos da seguinte forma:

- 1) Células PC-3 tratadas com anti-miR-221, FLU, anti-miR-221+FLU e controle;
- 2) Células PC-3 tratadas com anti-miR-222, FLU, anti-miR-222+FLU e controle;
- 3) Células PC-3 tratadas com miR-23b, FLU, miR-23b+FLU e controle;
- 4) Células PC-3 tratadas com miR-27b, FLU, miR-27b+FLU e controle.

3.5.2 Transfecção celular com microRNA e antimir-RNA

Um dia antes da transfecção a linhagem celular foi mantida em meio livre de antibiótico. As células foram então transfectadas com aproximadamente 50nM de anti-221, anti-222, mimic-23b, mimic-27b separadamente e também com controle negativo precursor de mRNAs (Ambion, Austin, TX, USA). 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 (2,5µL da solução de 10µM). A seguir 1,5µL do agente de Transfecção Lipofectamina RNAiMax (INVITROGEN, Calrsbad, CA, USA) foi diluído em 50µL de meio OPTI-MEM I. Os reagentes usados nesta fase do experimento estão apresentados na Tabela 4. Ambion® Pré-miR TM são pequenos RNAs precursores de cadeia dupla de RNA que se assemelham a microRNAs endógenos. Os mimics são pequenos microRNAs produzidos quimicamente, os quais se assemelham com microRNAs biológicos maduros que ocorrem naturalmente nos organismos. Os

inibidores de microRNAs ou anti-microRNAs são pequenas moléculas de RNA de cadeia simples quimicamente modificadas para se ligar e inibir especificamente as moléculas de microRNA endógenas e permitir a análise funcional de microRNA por regulação de subexpressão.

Tabela 4. Tabela de reagentes utilizados para transfecção do pré-miR e anti-miR.

Reagentes	Identificação do Ensaio
Anti-miR-221	MH10337 (Ambion)
Anti-miR-222	MH11376 (Ambion)
Mimic-miR-23b	MC10711 (Ambion)
Mimic-miR-27b	MC10750 (Ambion)
Pré-miR -Precursor Negative Control	AM-17110 (Ambion)
Anti-miR-microRNA Inhibitor Negative Control	AM-17010 (Ambion)
OPTI-MEN I-Reduced Serum Medium	31985-062 (Invitrogen)
Lipofectamina-RNAiMAX	13778-150 (Invitrogen)

As diluições dos pré-miR e do agente de transfecção foram combinadas, misturadas e posteriormente incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para formação do complexo de transfecção (o mesmo procedimento feito com o pré-miR foi realizado com os demais anti-miR, pré-miR, controle negativo e anti-miR negativo). As células em suspensão foram transferidas e semeadas na cavidade dos poços em placa de cultura de 24 poços para sobreposição dos complexos de transfecção em um volume de 800µL de meio de cultura contendo 5×10^4 de células/poço. A seguir foram dispensados 200µL do complexo de transfecção em cada poço, onde cada amostra do complexo de transfecção foi configurada e marcada de acordo com seus controles: pré-miR (controle

negativo pré-miR) e anti-miR (controle negativo anti-miR). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Em seguida, a placa foi incubada por 48h em estufa de CO₂ à 37°C. Posteriormente, as células aderidas foram removidas das placas de cultura com tripsina/EDTA. A tripsina foi inativada com o meio MEM 10% com SFB, centrifugada a 2.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.

Após os procedimentos de transfecção foram extraídos os microRNAs e RNA total das células para comprovação da eficácia do experimento. Foi realizada a síntese do cDNA e posteriormente a análise da expressão gênica por qRT-PCR. Essas etapas foram realizadas utilizando a mesma metodologia e reagentes utilizados para as análises dos espécimes cirúrgicos.

3.5.3 Exposição das células PC-3 à Flutamida

A linhagem PC-3 foi cultivada em meio de cultura MEM (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro charcoal-stripped (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) sem antibióticos por 48 horas antes de iniciar os tratamentos. Ao final das 48 horas, as células PC-3 foram semeadas em uma placa de cultura de 24 poços contendo 5×10^4 células por poço em meio MEM, sem antibióticos e com soro charcoal-stripped reduzido a 1%.

A Flutamida foi utilizada na concentração de 100µM/mL em OPTI-MEM-I (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), e como controle do experimento foi utilizado as células com as mesmas condições de tratamentos citadas anteriormente, porém apenas com meio OPTI-MEM (veículo).

Os experimentos foram realizados em triplicata. As células PC-3 foram incubadas por 48 horas e, em seguida submetidas para análise da expressão dos microRNAs e dos genes utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

3.5.4 Ensaio de Apoptose por citometria de Fluxo

O ensaio de apoptose foi realizado no citômetro de fluxo MUSE através da marcação das células com Anexina V. O ensaio com Anexina V permite a quantificação de apoptose inicial, tardia e necrose em linhagens aderentes e não aderentes. O software fornece a concentração e a porcentagem de células em todas as etapas de apoptose.

Foram plaqueadas 1×10^5 células em meio de cultura com soro a 1%, livre de antibiótico. Após plaqueadas as células foram transfectadas com os reagentes que estão descritos na Tabela 4. Um dia após a transfecção foi realizada troca do meio e posteriormente as células foram tratadas com Flutamida a $100 \mu\text{M/mL}$. Dois dias após o tratamento as células foram ressuspensas em $100 \mu\text{l}$ de PBS 1x com 1% de SFB. Logo após foram adicionados $100 \mu\text{l}$ do reagente Anexina V e do kit morte celular Muse™ (MCH100105). Então as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente livre de luz. Posteriormente a incubação, as células foram analisadas no mini citômetro Muse™ conforme recomendações do fabricante.

Antes de cada ensaio realizado no citômetro Muse™ foi realizada a calibragem do aparelho com kit Muse™ System Check para um melhor desempenho e veracidade dos dados obtidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.5.5 Ensaio de Ciclo Celular por citometria de Fluxo

O kit de ciclo celular Muse™ (MCH100106) permite realizar aferições quantitativas simples e rápidas da porcentagem das células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular de uma ampla variedade de linhagens celulares, intensidade de fluorescência e porcentagem de intensidade de fluorescência.

Foram plaqueadas 5×10^4 células com soro a 1% livre de antibiótico. Após plaqueadas as células foram transfectadas com os reagentes que estão descritos na Tabela 4. Um dia após a transfecção foi realizada troca do meio e adicionado soro a 10%, posteriormente as células foram tratadas com Flutamida a $100 \mu\text{M}/\text{mL}$. Dois dias após o tratamento as células foram ressuspensas em $100 \mu\text{l}$ de PBS 1x com 1% de SFB. Após a ressuspensão, as células foram fixadas em etanol 70% frio conforme recomendações do fabricante.

Logo após a fixação (período de 24 horas podendo se estender a 3 meses), foram adicionados $200 \mu\text{l}$ do reagente Ciclo celular Muse™ (Iodeto de Propídeo (IP) e RNase A). Então as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente livre de luz. Posteriormente à incubação, as células foram analisadas no mini citômetro Muse™ conforme recomendações do fabricante

O kit para ciclo celular utiliza como reagentes, IP e RNase A em formulação própria. O IP diferencia as células em seus diferentes estágios do ciclo, baseando-se no conteúdo diferencial do DNA e na presença de RNase para aumentar a especificidade da coloração do DNA ^(73, 74).

As células em repouso (G0/G1) contêm duas cópias de cada cromossomo. A medida que as células iniciam o ciclo, elas sintetizam o DNA cromossômico (fase S). A intensidade de fluorescência de IP aumenta até que o DNA cromossômico dobre (fase

G2/M). Nestas fases, as células em G2 possuem o dobro de intensidade em relação a população G0/G1. As células G2/M eventualmente dividem-se em duas células.

O Módulo de Software do Ciclo de Células Muse™ executa cálculos automaticamente. Os dados são exibidos em duas parcelas:

- ✓ Índice de conteúdo de DNA e índice de tamanho de célula;
- ✓ Histograma de índice de conteúdo de DNA com marcadores disponíveis para analisar as populações de células em cada fase do ciclo.

3.5.6 Ensaio de Proliferação por citometria de fluxo

O Ki67 é utilizado em várias pesquisas na área de biologia celular, imunologia e descoberta de novas drogas. A análise do Ki67 foi utilizada na avaliação de potenciais fatores de crescimento, com compostos que alteram o ciclo celular, em avaliações de atividade antiproliferativa de drogas e nos estudos de citotoxicidade ⁽⁷⁵⁾.

O ensaio de proliferação de Ki67 do Muse® utiliza a expressão do Ki67 para identificar as células que estão em proliferação e as células não proliferantes.

Neste ensaio também utilizamos linhagem celular PC-3. Foram plaqueadas 1×10^5 células com soro a 1%, livre de antibiótico. Após plaqueadas as células foram transfectadas com os reagentes que estão descritos na Tabela 4. Um dia após a transfecção foi realizada troca do meio e posteriormente as células foram tratadas com Flutamida a $100 \mu\text{M/mL}$. Um dia após o tratamento as células foram ressuspensas em $100 \mu\text{l}$ de PBS 1x, a partir de então estas foram lavadas e fixadas com reagentes de ensaio do kit Muse Ki67 (MCH100114). Logo após foram adicionados $10 \mu\text{l}$ do reagente Muse® HuIgG1-PE e Muse® HuKi67-PE (MCH100114). Então, as células foram incubadas por

30 minutos em temperatura ambiente livre de luz. Posteriormente a incubação, as células foram analisadas no mini citômetro Muse™ conforme recomendações do fabricante.

3.6 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão para as variáveis quantitativas. A comparação entre os grupos foi realizada através de Test t de Student e Anova (variáveis homogêneas) e Mann Whitney (variáveis não homogêneas).

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS19.0. Em toda análise foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentavam p-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Expressão dos genes e microRNAs nos espécimes cirúrgicos

O perfil de expressão dos miRs, -221/-222, -23b/-27b e dos genes p27kip-1, CCNG1 e RA analisados pelo método de qRT-PCR nos 44 espécimes cirúrgicos comparados ao grupo controle (HPB) está apresentado na Figura 2. Observamos que nessas amostras houve subexpressão dos quatro microRNAs analisados, miR-221 (100%), miR-222 (84,09%), miR-23b (84,09%) e miR-27b (88,63%). Em relação à expressão dos genes, observamos superexpressão em 68,18% do p27kip-1, superexpressão de 63,63% do CCNG1 e superexpressão em 100% dos casos para o gene RA como demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Perfil de expressão dos microRNAs e genes nas amostras teciduais de CaP.

Encontramos subexpressão do miR-221 em todas as amostras de CaP, quando comparamos a expressão deste microRNA entre os casos de CPRC e CPHS não encontramos significância estatística ($p=0,988$) (Tabela 5).

O miR-222 apresentou subexpressão na grande maioria dos casos tanto no CPRC quanto no HS ($p=0,250$). Porém, gostaríamos de ressaltar que este miR apresentou maior média de expressão nas amostras de CPHS, que foi quase duas vezes maior quando comparado ao CPRC (Tabela 5).

O miR-23b assim como os microRNAs anteriores também demonstrou subexpressão na grande maioria das amostras nos subgrupos do CaP, não apresentando diferenças estatísticas quando a expressão foi comparada entre eles ($p=0,158$). Contudo, o miR-23b também apresentou uma maior média de expressão no grupo do CPHS quando comparado ao grupo CPRC.

O miR-27b não foi diferente dos demais microRNAs também apresentando subexpressão na grande maioria dos casos de ambos os grupos analisados. O miR-27b também não apresentou valor estatístico significativo nesta comparação ($p=0,094$), porém, como no miR-23b, o miR-27b apresentou uma maior média de expressão no grupo de pacientes com CPHS (Tabela 5).

Quando observamos os genes, verificamos que p27kip-1 apresentou uma superexpressão em 68,18% sem valor estatístico significativo considerando a resposta hormonal ($p=0,318$). Igualmente o p27, o CCNG1 apresentou superexpressão em 63,63% e o gene RA em 100% das amostras, porém não foi encontrado valor estatístico significativo ($p=0,375$) quando comparamos os subgrupos CPHS e CPRC para ambos os genes (Tabela 5).

Tabela 5. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com a resistência androgênica.

Resistência ao Andrógeno			
Média (DP)			
microRNAs e Genes	Não (N=9)	Sim (N=35)	Valor de p
miR-221	0,123 (0,181)	0,132 (0,179)	0,988*
miR-222	0,969 (1,484)	0,561 (0,981)	0,250*
miR-23b	0,483 (0,510)	0,300 (0,456)	0,158*
miR-27b	0,829 (1,157)	0,511 (1,020)	0,094*
CCNG1	2,472 (2,260)	4,339 (14,537)	0,705*
p27-kip1	1,850 (0,961)	1,458 (1,057)	0,318**
RA	3,816 (1,486)	5,583 (7,743)	0,503**

*Mann-Whitney **Test T

4.1.1 Expressão dos genes e microRNAs de acordo com características clínico-patológicas

Na comparação entre a expressão dos microRNAs e as características clínico-patológicas dos pacientes encontramos significância estatística entre o miR-23b e o grupo de pacientes com PSA ≥ 10 ng/ml. Esse miR apresentou média de expressão duas vezes maior nesse grupo de pacientes quando comparado com pacientes com PSA < 10ng/ml (p=0,013) (Tabela 6).

Tabela 6. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com o PSA.

PSA(ng/mL)			
Média (DP)			
microRNAs e Genes	<10 (N=21)	≥10 (N=22)	Valor de p
miR-221	0,079 (0,122)	0,185 (0,209)	0,174*
miR-222	0,536 (1,034)	0,774 (1,180)	0,308*
miR-23b	0,192 (0,277)	0,488 (0,570)	0,013*
miR-27b	0,698 (1,394)	0,480 (0,586)	0,065*
CCNG1	2,029 (2,241)	5,933 (18,228)	0,336*
p27-kip1	1,594 (1,133)	1,515 (0,982)	0,808**
RA	5,379 (6,891)	5,249 (7,280)	0,953**

*Mann-Whitney **Test T

Com relação ao estadiamento patológico, comparando a expressão dos microRNAs e genes não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com o Estadiamento Patológico.

microRNAs e Genes	Estadiamento Patológico		
	Média (DP)		
	pT2 (N=8)	pT3 (N=36)	Valor de p
miR-221	0,104 (0,162)	0,136 (0,182)	0,692**
miR-222	0,343 (0,419)	0,712 (1,188)	0,273**
miR-23b	0,196 (0,232)	0,368 (0,502)	0,976**
miR-27b	0,269 (0,151)	0,644 (1,143)	0,976**
CCNG1	1,905 (2,177)	4,413 (14,319)	0,627**
p27-kip1	1,435 (0,924)	1,561 (1,074)	0,762*
RA	3,396 (2,268)	5,627 (7,578)	0,418**

*Mann-Whitney **Test T

De acordo com a graduação de ISUP (Tabela 8), observamos que o miR-23b demonstrou valor significativo marginal ($p=0,070$) no grupo 1, onde esses pacientes são caracterizados com melhores características histológicas, ou seja, menor grau de diferenciação celular no tecido prostático. Em relação aos genes não encontramos diferenças estatísticas quando comparado para esta variável.

Tabela 8. Médias de expressão dos microRNAs e genes de acordo com Escore de Gleason.

miRs e Genes	ISUP			
	Média (DP)			
	1	2	3	p
miR-221	0,135 (0,172)	0,119 (0,191)	0,139 (0,171)	0,940***
miR-222	0,913 (0,980)	0,588 (1,138)	0,641 (1,107)	0,889***
miR-23b	0,906 (0,295)	0,328 (0,549)	0,231 (0,289)	0,070***
miR-27b	0,409 (0,089)	0,401 (0,607)	0,833 (1,516)	0,435***
p27kip-1	1,154 (1,073)	1,475 (1,117)	1,732 (0,969)	0,599***
CCNG1	2,785 (1,504)	5,642 (17,852)	2,026 (2,459)	0,691***
RA	3,508 (1,661)	4,381 (6,537)	6,882 (8,089)	0,494***

***ANOVA

4.2 Estudos *in vitro*

4.2.1 Transfecção celular

Na transfecção com os anti-miRs-221/222 observamos que houve subexpressão nas 3 amostras de ambos os microRNAs, -221 e -222, confirmando o sucesso da transfecção. O gene alvo deste cluster, p27kip-1, apresentou-se superexpresso (Figura 4).

Figura 4. Resultado da transfecção com microRNAs anti-miR-221, anti-miR-222 e seu respectivo gene alvo p27Kip-1 para ambos os microRNAs em linhagem PC-3.

Após a transfecção com os miR-23b/-27b observamos que os microRNAs se apresentavam superexpressos nas células PC-3, porém o gene, CCNG1, não demonstrou uma subexpressão como esperado. Interessantemente, após a análise de transfecção das células que foram tratadas apenas com o microRNAs, -23b/-27b, FLU e microRNAs+FLU, observamos que a expressão do gene diminuiu consideravelmente até se tornar subexpresso quando as células foram tratadas com microRNAs+FLU (Figura 5).

Figura 5. Expressão gênica, CCNG1, após transfecções e tratamentos na linha celular PC-3. A) Superexpressão do gene CCNG1 após tratamento usando os microRNAs -23b/-27b. B) Superexpressão do gene, CNG1, após tratamento com FLU. C) Subexpressão do gene CCNG1 após o tratamento com microRNAs -23b/-27b e FLU.

Realizamos também a análise da expressão do RA na linhagem celular PC-3 por qRT-PCR, utilizamos como controle os valores obtidos na análise do RA nas amostras de HPB e verificamos que o gene RA está presente na linhagem embora esteja subexpresso (Figura 6).

Figura 6. Expressão do gene RA em linhagem celular PC-3.

4.2.1.1 Apoptose

No ensaio de apoptose, quando comparamos os grupos de tratamentos, Anti-miR-221, FLU e Anti-miR-221+FLU e comparamos com o controle, verificamos que o grupo de células quando tratadas apenas com a FLU apresentou maior taxa de apoptose, entretanto, sem valor estatístico significativo ($p=0,168$). Já para o grupo tratado com Anti-miR-222, FLU e Anti-miR-222+FLU, quando comparamos esses grupos verificamos que apenas o tratamento realizado com FLU aumentou o número de células em apoptose em relação aos outros grupos ($p=0,002$).

Já os grupos tratados com miR-23b+FLU ($p=0,0006$) e miR-27b+FLU ($p=0,0003$) apresentaram maior taxa na porcentagem de células em apoptose quando comparados aos outros grupos e também aos seus controles, demonstrando assim um possível sinergismo entre os tratamentos realizados com microRNA+FLU simultaneamente (Tabela 9).

Tabela 9. Médias da porcentagem de apoptose dos grupos tratados com miR vs miR+FLU.

Média (Desvio Padrão)				
Controle	Anti-221	FLU	Anti-221+FLU	p
8,73 (2,85)	8,56 (0,34)	15,59 (1,18)	7,79 (7,93)	0,168***
Controle	Anti-222	FLU	Anti-222+FLU	0,002***
8,73 (2,85)	9,19 (0,95)	15,59 (1,18)	3,40 (3,64)	
Controle	miR-23b	FLU	miR-23b+FLU	0,0006***
8,73 (2,85)	8,23 (1,65)	15,59 (1,18)	23,51 (4,61)	
Controle	miR-27b	FLU	miR-27b+FLU	0,0003***
8,73 (2,85)	9,85 (1,51)	15,59 (1,18)	20,75 (2,27)	

***Anova

Abaixo segue amostra do perfil da linhagem PC-3 no ensaio de apoptose com respectivas transfecções dos Anti-miR-221, Anti-miR-222, miR-23b e miR-27b (Figuras 7 e 8). Nas figuras podemos observar que após cada transfecção dos diferentes microRNAs as células exibem perfis diferentes, sendo que o mesmo ocorre nos controles.

Figura 7. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de apoptose após marcação com Anexina V. **A)** População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com Anti-miR-221; **B)** Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com Anti-miR-221; **C)** População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com Anti-miR-222; **D)** Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com Anti-miR-222.

Figura 8. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de apoptose após marcação com Anexina V. A) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com miR-23b+FLU; B) Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com miR-23b+FLU; C) População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com miR-27b+FLU; D) Perfil apoptótico celular PC-3 tratado com miR-27b+FLU.

4.2.1.2 Ciclo Celular

Após o ensaio de ciclo celular, notamos que dentre os tratamentos já mencionados com a linhagem celular PC-3, o que melhor apresentou resultado para esta etapa foi o grupo tratado apenas com FLU, mostrando aumento da porcentagem de células na fase G0-G1 (64,97%), seguido da redução das outras fases S (28,10%) e G2-M (6,86%) ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Médias da porcentagem do ensaio de ciclo celular dos grupos tratados com miR, miR+FLU e FLU.

Ensaio Ciclo Celular					
Média (Desvio Padrão)					
Fases	Controle	Anti-221	FLU	Anti-221+FLU	p
G0-G1	56,33 (0,64)	60,8 (1,24)	64,97 (1,12)	59,23 (1,00)	<0,0001
S	14,93 (1,61)	14,53 (1,17)	28,10 (0,78)	31,83 (2,17)	<0,0001
G2-M	22,00 (3,18)	24,63 (1,26)	6,86 (1,47)	8,83 (2,89)	<0,0001

Fases	Controle	Anti-222	FLU	Anti-222+FLU	
G0-G1	56,33 (0,64)	60,87 (0,47)	64,97 (1,12)	17,87 (3,86)	<0,0001
S	14,93 (1,61)	17,87 (0,45)	28,10 (0,78)	39,30 (3,38)	<0,0001
G2-M	22,00 (3,18)	21,23 (0,65)	6,86 (1,47)	36,93 (1,19)	<0,0001

Fases	Controle	miR-23b	FLU	miR-23+FLU	
G0-G1	56,33 (0,64)	61,47 (1,15)	64,97 (1,12)	22,70 (7,73)	<0,0001
S	14,93 (1,61)	21,37 (1,89)	28,10 (0,78)	40,27 (7,89)	0,0004
G2-M	22,00 (3,18)	17,17 (3,10)	6,86 (1,47)	30,57 (2,40)	<0,0001

Fases	Controle	miR-27b	FLU	miR-27+FLU	
G0-G1	56,33 (0,64)	52,40 (2,10)	64,97 (1,12)	16,37 (2,71)	<0,0001
S	14,93 (1,61)	25,00 (1,53)	28,10 (0,78)	42,73 (2,59)	<0,0001
G2-M	22,00 (3,18)	22,57 (3,66)	6,86 (1,47)	34,00 (0,30)	<0,0001

***Anova

Abaixo segue amostra do perfil da linhagem PC-3 no ensaio de ciclo com respectivas transfecções dos Anti-miR-221, Anti-miR-222, miR-23b e miR-27b (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de ciclo celular após marcação com IP e RNase A. **A)** População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com anti-miR-221 **B)** Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com anti-miR-221; **C)** População celular da linhagem PC-3, perfil de tratamento com anti-miR-222+FLU; **D)** Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com anti-miR-222.

Figura 10. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de ciclo celular após marcação com IP e RNase A. **A)** População celular da linhagem PC-3, transfectada com miR-23b+FLU; **B)** Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com miR-23b+FLU; **C)** População celular da linhagem PC-3, transfectada com miR-27b+FLU; **D)** Perfil do ciclo celular PC-3 tratado com miR-27b+FLU.

4.2.1.3 Ensaio de Proliferação

No ensaio de proliferação, assim como no ensaio de ciclo celular a FLU demonstrou melhor resultado dentre os tratamentos quando comparados entre si, com exceção do miR-23b, que embora tenha apresentado as menores taxa de proliferação não demonstrou significância estatística quando comparado entre os grupos (Tabela 11) (Figura 13).

Tabela 11. Ensaio de proliferação em linhagem celular PC-3.

Média (Desvio Padrão)				
Controle	Anti-221	FLU	Anti-221+FLU	p
72,00 (5,41)	63,01 (4,08)	60,23 (3,74)	60,69 (5,10)	0,046***
Controle	Anti-222	FLU	Anti-222+FLU	0,036***
72,00 (5,41)	63,98 (0,76)	60,23 (3,74)	66,69 (4,35)	
Controle	miR-23b	FLU	miR-23b+FLU	0,209***
72,00 (5,41)	59,43 (11,84)	60,23 (3,74)	60,69 (6,51)	
Controle	miR-27b	FLU	miR-27b+FLU	0,014***
72,00 (5,41)	69,55 (1,48)	60,23 (3,74)	69,51 (2,13)	

***ANOVA

Abaixo segue amostra do perfil da linhagem PC-3 no ensaio de proliferação dos seguintes grupos, controle e FLU (Figura 11).

Figura 11. Perfil da linhagem PC-3 no ensaio de proliferação celular marcadas com Muse® Hu Ki67 e Muse® Hu IgG1. **A)** População celular da linhagem PC-3, controle; **B)** Perfil de proliferação celular PC-3 tratado, controle; **C)** População celular da linhagem PC-3, tratada com FLU; **D)** Perfil de proliferação celular PC-3 tratada com FLU.

5. DISCUSSÃO

A caracterização molecular do CaP metastático especialmente o CPRC têm sido o foco de vários projetos de pesquisas, alguns destes ressaltam o possível papel de microRNAs, que são importantes reguladores de expressão gênica, neste processo. Aqui, em nosso estudo resolvemos então avaliar o perfil da expressão de quatro microRNAs que já tiveram a sua participação postulada no CPRC e de três genes em amostras teciduais de pacientes com CaP localizados que foram subdivididos em pacientes CPHS e que evoluíram para CPRC, além de estudos *in vitro* e ensaios de apoptose, ciclo celular e proliferação.

Os miRs-221/-222 são expressos de diferentes formas em vários tipos de cânceres humanos incluindo o CaP ^(76, 81). A subexpressão dos miRs-221/-222 foi observada em nossas amostras em 100% e 84,09% respectivamente. Sun et al., também demonstrou baixa expressão do miR-221 e miR-222 em amostras de tumores primários. Este mesmo trabalho supõe que a baixa regulação dos miRs-221/-222 acompanha o processo de desenvolvimento de neoplasias prostáticas o que é consistente com os dados da literatura ^(72, 77, 82, 84).

Entretanto, em nosso trabalho apesar de também demonstrarmos uma subexpressão destes microRNAs encontramos embora sem significância estatística uma expressão maior nos pacientes que evoluíram para CPRC, maior expressão no grupo de pacientes que possuíam $PSA \geq 10 \text{ ng/mL}$ e no grupo de pacientes que possuíam estadiamento patológico pT3, além disso, observamos que a subexpressão destes culmina na superexpressão do seu gene alvo p27kip-1 que está ligado diretamente ao ciclo celular, promovendo a proliferação, o que nos faz postular um possível papel na progressão do CaP atuando como um oncomiRs nesta neoplasia.

Os miR-23b e miR-27b apresentaram subexpressão na maioria dos casos de CaP quando comparado ao grupo controle, 84,09% e 88,63% respectivamente. A

subexpressão destes microRNAs também foi encontrada em um estudo japonês no qual foram estudados 39 pacientes com CaP agressivo. Neste estudo, a perda do miR-27b foi correlacionado com menor tempo de sobrevida livre de recidiva ⁽⁸⁵⁾. Em outro estudo realizado por Sun et al., também foi demonstrado a baixa expressão destes miRs-23b/-27b no CaP localizado ⁽⁷²⁾.

Nosso grupo encontrou algumas correlações entre a expressão destes microRNAs e alguns fatores prognósticos clássicos do CaP. Apesar dos miRs-23b/-27b terem apresentado subexpressão no grupo de pacientes com câncer, houve uma maior expressão do miR-27b nos pacientes que apresentavam PSA <10ng/mL, e nos pacientes que não apresentaram resistência androgênica embora nestes casos com significância estatística marginal. Já considerando o miR-23b, embora o mesmo também estivesse subexpresso na maioria dos casos, observamos maior expressão no grupo de pacientes que não evoluíram para o CPRC e de acordo com a classificação de ISUP este demonstrou maior expressão no grupo 1, nestes casos sem significância estatística, no entanto, contrário ao que esperávamos este microRNA demonstrou maior expressão nos pacientes que apresentavam PSA mais elevado que foi significativa do ponto de vista estatístico.

Ao avaliarmos o gene alvo dos miR-23b/-27b, após as transfecções, o gene CCNG1 apresentou superexpressão, entretanto, este resultado não era esperado por nós uma vez que análises de softwares como Targetscan ⁽⁸⁶⁾, Pictar ⁽⁸⁷⁾ e miRanda ⁽⁸⁸⁾, demonstram que este gene é um alvo negativo direto da ação reguladora destes microRNAs, além disso na literatura já foi demonstrado que quando há superexpressão dos miRs-23b/-27b ocorre uma diminuição nos níveis de CCNG1, todavia, estes dados foram observados em linhagens de adenocarcinoma hepático ⁽⁸⁹⁾. A superexpressão do CCNG1, foi observada em linhagens de câncer de mama e CaP e a superexpressão deste gene foi correlacionado com iniciação e progressão tumoral nestas duas linhagens ⁽⁶⁹⁾.

Reimer et al., (1999), sugere que novas abordagens terapêuticas devem ser direcionadas para redução da expressão do CCNG1 nos cânceres de mama e próstata na tentativa de uma redução tumorigênica. Embora após transfecção com os estes microRNAs não tenhamos conseguido suprimir a expressão de CCNG1, demonstramos que após a adição da FLU, juntamente com os microRNAs este gene demonstrou-se subexpresso nas amostras.

A apoptose é um mecanismo celular extremamente regulado e de suma importância, altamente eficiente, tal processo requer interações de inúmeros componentes celulares. As alterações morfológicas observadas são decorrentes de uma cascata de eventos moleculares, bioquímicos específicos e são geneticamente regulados ⁽⁹⁰⁾.

Ainda que o câncer apresente características muito heterogêneas, todos os tumores malignos, inclusive o CaP, adquirem um domínio de crescimento além do limite impostos as células normais. Evidências têm demonstrado que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores ⁽⁹¹⁾.

Considerando a apoptose, ensaios utilizando Caspases 3 e 10 já foram realizados por um grupo de pesquisadores chineses e seus resultados em ensaios de citometria demonstraram que a porcentagem de células em apoptose foi significativamente diminuída nas células que foram tratadas com mimics-221/-222 em linhagem PC-3 ⁽⁹²⁾. Todavia, aqui em nosso estudo, no ensaio de apoptose utilizando anexina V, após transfecção da linhagem PC-3 com os inibidores do miR-221 e miR-222 e comparando entre os grupos de tratamentos com o grupo controle, não encontramos diferenças nas taxas de apoptose total para os anti-miR-221 e anti-miR-222 ou e nem mesmo quando foi adicionado a FLU nestes experimentos juntamente com os microRNAs.

Analizando os miRs-23b/-27b, encontramos diferenças significativas para os dois microRNAs no ensaio de apoptose. Quando comparamos a taxa de apoptose total levando

em consideração os tratamentos com FLU, miR+FLU e miR, encontramos taxas maiores de apoptose nos grupos tratados com miR+FLU para ambos os microRNAs quando comparados ao controle. Observamos um aumento na taxa de apoptose quase 3 vezes maior do grupo tratado com miR+FLU em relação ao grupo tratado apenas com os miRs, e embora de forma um pouco menos significativa as taxas também foram maiores quando comparado ao grupo tratado apenas com FLU. Este fato nos faz postular um possível efeito sinérgico entre estes microRNAs e a FLU no controle da apoptose. Majid et al., (2012), demonstraram em estudos utilizando as linhagens de CaP, PC-3 e DU-145, que após transfecções com o miR-23b as taxas de apoptose aumentaram comparado com grupo controle. Entretanto, também foi observada uma diminuição na viabilidade celular ⁽⁹³⁾. Já Mu et al., demonstram que o miR-27b sensibiliza células cancerígenas para um amplo espectro de drogas anticancerígenas *in vitro* e *in vivo*, e que funcionalmente, o miR-27b melhora a resposta a fármacos anticancerígenos ativando a apoptose dependente de p53 ⁽⁹⁴⁾, estes resultados são semelhantes ao que encontramos em nosso estudo uma vez que podemos postular que o miR-27b sensibilizou as células PC-3 para uma melhor a resposta a FLU, considerando a apoptose. Embora este resultado tenha sido considerado por nós animador mais estudos são necessários sobre estes microRNAs para que possamos esclarecer o seu papel no CaP.

O ciclo celular representa um dos processos mais expressivos e fundamentais nas células eucarióticas, resultando no crescimento e divisão derivando em duas células filhas ⁽⁹⁵⁾. A regulação do ciclo celular é um papel crítico para manutenção e sobrevivência celular, uma vez que este processo conduz a reparação do dano genético e prevenção da divisão celular exacerbada. Os defeitos encontrados durante a regulação do ciclo celular são de fato uma característica de células tumorais, e as mutações de genes envolvidos no controle do ciclo são extremamente comuns no câncer. A análise do ciclo celular tornou-

se um evento muito importante para o entendimento da ação de compostos cancerígenos ⁽⁹⁶⁾ e também nos mecanismos mitóticos celulares ⁽⁹⁷⁾.

Considerando os dados do ensaio de ciclo celular, não encontramos nenhuma correlação entre a transfecção com os microRNAs Anti-221, Anti-222, miR-23b e miR-27b neste ensaio, sendo que nestes caso a administração da droga FLU se mostrou eficaz em linhagens PC-3 quando correlacionamos com o grupo controle. Após o tratamento com FLU, as células ficaram retidas na fase G0-G1 e consequentemente foi observado uma diminuição gradativa de células nas fases posteriores. A porcentagem final de células que conseguiram completar a mitose foi expressivamente menor quando correlacionadas aos outros grupos.

Acreditamos que a via androgênica na linhagem PC-3 ainda é ativa, como demonstra nossos resultados de expressão do RA nesta linhagem, embora ele esteja presente em menor quantidade conseguimos detectar a expressão de seu RNAm na linhagem PC-3. Mesmo após as transfecções com os microRNAs e adição da FLU, alguns ensaios responderam melhor quando foi administrado apenas a droga FLU, como pode ser observado nos ensaios de ciclo celular e proliferação, e mesmo a taxa de apoptose total no grupo FLU não estando maior do que quando administrada com os microRNAs, estes dados ainda foram maiores que o controle e também que o grupo tratado apenas com os microRNAs. Então, postulamos que a FLU se mostrou como uma droga eficaz para ser utilizada em estudos *in vitro* em linhagem de CPRC.

Estudos anteriores demonstraram que os miRs-221/-222 promovem a proliferação em células de CaP ^(64, 92). Entretanto, Yang et al., defende a ideia de que quando há a inibição dos miR-221/-222 ocorre uma diminuição na taxa de proliferação e migração celular tendo como consequência aumento nos níveis de apoptose, sendo que este efeito encontrado foi devido a superexpressão da SIRT-1 em linhagem celular PC-3 ⁽⁹⁸⁾. Não

conseguimos validar estes resultados da literatura uma vez que nossos dados demonstraram uma diminuição discreta do número de células em proliferação quando transfectados os inibidores dos miR-221/-222. Gostaríamos de ressaltar que também para o ensaio de proliferação, a administração da FLU apresentou melhores resultados dentre os grupos para este ensaio.

Resumidamente, encontramos em nosso trabalho alguns resultados importantes, embora todos os microRNAs estudados tenham sido encontrados subexpressos, demonstramos uma maior expressão do miR-27b em amostras de pacientes que apresentavam bom prognóstico para o CaP, inclusive nos casos que permaneceram sensíveis ao hormônio por um longo período de tempo, embora estes resultados não tenham tido significância estatística consideramos estes dados importantes uma vez que ressalta o papel deste microRNA como um supressor tumoral. Encontramos também resultados promissores quando a administração da FLU junto aos miR-23b/-27b conseguiu suprimir o importante oncogene CCN1, além disso outro resultado que consideramos relevante foi o aumento significativo nas taxas de apoptose quando uma linhagem celular sabidamente resistente à castração foi transfectada com os miR-23b e miR-27b juntamente com a adição da FLU, o que também nos abre perspectiva para novos estudos utilizando estes microRNAs como uma possível forma de tratamento alvo molecular para o CaP.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Considerando a análise das amostras teciduais, uma limitação importante de nosso estudo é o fato de não termos tecidos representativos de CPRC, e sim amostras de tumores primários que evoluíram para este tipo tumoral, entretanto neste primeiro estudo

consideramos importante tentar avaliar se a expressão destes microRNAs conseguiriam antever esta evolução para CPRC, e em estudos futuros tentaremos avaliar a expressão especialmente dos microRNAs 23b/-27b em amostras de biopsia líquida de pacientes com CPRC.

Para padronização do MUSE para os ensaios de apoptose, ciclo e proliferação nosso grupo apresentou algumas dificuldades. As células PC-3 são hormônio-resistentes provenientes de metástases ósseas, estas células por serem provenientes de tecidos neoplásicos logo são morfologicamente diferentes de células de tecidos normais, considerando este fato, no momento da padronização os exemplos disponíveis não eram consistentes com as imagens obtidas. Não encontramos na literatura trabalhos que fizeram análises semelhantes. Mas após vários testes nós conseguimos um resultado que consideramos ideal como padrão para as células sem transfecção e tratamento e também para células transfectadas e tratadas simultaneamente.

6. CONCLUSÃO

1. Os miRs-221/-222 e miRs-23b/-27b apresentaram-se subexpressos no CaP quando comparados ao controle (HPB); O gene p27 Kip-1 demonstrou superexpressão em 68,18% dos casos de CaP, o gene CCNG1 demonstrou superexpressão em 63,63% dos casos e o gene RA demonstrou-se totalmente superexpressos nestes casos; De acordo com os fatores prognósticos demonstramos maior expressão do miR-23b em pacientes com PSA ≥ 10 ng/ml.
2. Demonstramos maiores taxas de apoptose quando as células foram tratadas com os miRs-23b/-27b juntamente com a FLU quando comparado com a administração isolada dos miRs, da FLU e até mesmo do controle; Para os ensaios de Ciclo celular apenas o tratamento com FLU se mostrou eficaz, fazendo com que as células fossem retidas na fase G0-G1 e uma menor porcentagem entrassem na fase final, G2-M. Assim como no ensaio de ciclo celular, a FLU demonstrou melhores resultados no ensaio de proliferação fazendo com que o número de células fosse menor quando comparadas aos outros grupos de tratamento e também ao grupo controle.

7. REFERÊNCIAS

1. INCA. Tipos de Câncer - Próstata 2017 [Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
3. Stanford JL SR, Coyle LM, Cerhan J, Correa R, Eley JW, Gilliland F, Hankey B, Kolonel LN, Kosary C, Ross R, Severson R, West D. *Prostate Cancer Trends 1973-1995*. Bethesda 1999.
4. Graefen M, Karakiewicz PI, Cagiannos I, Quinn DI, Henshall SM, Grygiel JJ, et al. International validation of a preoperative nomogram for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2002;20(15):3206-12.
5. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int*. 2002;90(2):162-73.
6. 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;30(2):181-4.
7. Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. *Urology*. 1999;54(5):780-6.
8. Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*. 2005;48(3):386-99; discussion 98-9.
9. Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA*. 1995;273(4):289-94.
10. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 1992;23(3):273-9.
11. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL, Committee IG. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(9):1228-42.
12. Carter HB, Partin AW, Walsh PC, Trock BJ, Veltri RW, Nelson WG, et al. Gleason score 6 adenocarcinoma: should it be labeled as cancer? *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4294-6.
13. 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*. 2016;69(3):428-35.
14. 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;280(11):969-74.
15. Dall'Era MA, Albertsen PC, Bangma C, Carroll PR, Carter HB, Cooperberg MR, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol*. 2012;62(6):976-83.
16. 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;28(1):126-31.
17. 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;189(3):878-83.
18. Chaturvedi S, Garcia JA. Novel agents in the management of castration resistant prostate cancer. *J Carcinog*. 2014;13:5.

19. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57(1):43-66.
20. 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;22(4):232-40.
21. Haapala K, Kuukasjarvi T, Hyytinen E, Rantala I, Helin HJ, Koivisto PA. Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer. *Hum Pathol.* 2007;38(3):474-8.
22. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res.* 1999;59(4):803-6.
23. Mousses S, Wagner U, Chen Y, Kim JW, Bubendorf L, Bittner M, et al. Failure of hormone therapy in prostate cancer involves systematic restoration of androgen responsive genes and activation of rapamycin sensitive signaling. *Oncogene.* 2001;20(46):6718-23.
24. Chang A, Yeap B, Davis T, Blum R, Hahn R, Khanna O, et al. Double-blind, randomized study of primary hormonal treatment of stage D2 prostate carcinoma: flutamide versus diethylstilbestrol. *J Clin Oncol.* 1996;14(8):2250-7.
25. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(15):1502-12.
26. 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;367(13):1187-97.
27. 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;376(9747):1147-54.
28. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(21):1995-2005.
29. 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;363(5):411-22.
30. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(3):213-23.
31. Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol.* 2012;30(2):195-200.
32. Zeng L, Kyprianou N. Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2005;8(1):7-13.
33. Chen H, Nandi AK, Li X, Bieberich CJ. NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res.* 2002;62(2):338-40.
34. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010;24(18):1967-2000.
35. D'Amico AV, Halabi S, Vollmer R, Loffredo M, McMahon E, Sanford B, et al. p53 protein expression status and recurrence in men treated with radiation and androgen

- suppression therapy for higher-risk prostate cancer: a prospective phase II Cancer and Leukemia Group B Study (CALGB 9682). *Urology*. 2008;71(5):933-7.
36. Huang S, Gulzar ZG, Salari K, Lapointe J, Brooks JD, Pollack JR. Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. *Oncogene*. 2012;31(37):4164-70.
 37. Liu W, Lindberg J, Sui G, Luo J, Egevad L, Li T, et al. Identification of novel CHD1-associated collaborative alterations of genomic structure and functional assessment of CHD1 in prostate cancer. *Oncogene*. 2012;31(35):3939-48.
 38. Lorente D, De Bono JS. Molecular alterations and emerging targets in castration resistant prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50(4):753-64.
 39. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010;18(1):11-22.
 40. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487(7406):239-43.
 41. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*. 2012;44(6):685-9.
 42. Pan Y, Kytölä S, Farnebo F, Wang N, Lui WO, Nupponen N, et al. Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;87(3-4):225-32.
 43. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):34-45.
 44. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66.
 45. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573-6.
 46. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
 47. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
 48. Griffiths-Jones S. miRbase [Available from: <http://www.mirbase.org/>].
 49. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
 50. Ricarte Filho JC, Kimura ET. [MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(6):1102-7.
 51. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016-27.
 52. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
 53. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.
 54. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
 55. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-6.

56. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
57. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*. 2004;10(3):544-50.
58. DIP-JUNIOR NG. Análise de expressão de microRNA em carcinoma urotelial de bexiga. Cirurgia - Urologia. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012. p. 85.
59. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-31.
60. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1768-71.
61. Yoon S, De Micheli G. Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes. *Bioinformatics*. 2005;21 Suppl 2:ii93-100.
62. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2999-3004.
63. 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;69(8):3356-63.
64. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2007;282(32):23716-24.
65. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, et al. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2007;26(15):3699-708.
66. Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM, et al. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res*. 2008;68(8):2773-80.
67. Santos JI, Teixeira AL, Dias F, Maurício J, Lobo F, Morais A, et al. Influence of peripheral whole-blood microRNA-7 and microRNA-221 high expression levels on the acquisition of castration-resistant prostate cancer: evidences from in vitro and in vivo studies. *Tumour Biol*. 2014;35(7):7105-13.
68. Ishteiwy RA, Ward TM, Dykxhoorn DM, Burnstein KL. The microRNA -23b/-27b cluster suppresses the metastatic phenotype of castration-resistant prostate cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e52106.
69. Reimer CL, Borrás AM, Kurdستاني SK, Garreau JR, Chung M, Aaronson SA, et al. Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. *J Biol Chem*. 1999;274(16):11022-9.
70. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell*. 1991;66(6):1071-4.
71. van Beijnum JR, Giovannetti E, Poel D, Nowak-Sliwinska P, Griffioen AW. miRNAs: micro-managers of anticancer combination therapies. *Angiogenesis*. 2017;20(2):269-85.
72. Sun T, Yang M, Chen S, Balk S, Pomerantz M, Hsieh CL, et al. The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(10):1093-103.
73. Darzynkiewicz Z, Juan G, Bedner E. Determining cell cycle stages by flow cytometry. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001;Chapter 8:Unit 8.4.
74. J H, K G, D. F. A simple and robust system for determining cells cycle distribution: the Guava cell cycle assay. Guava Technologies Application Note2004.

75. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *J Endocrinol*. 2006;189(3):441-53.
76. Yamashita R, Sato M, Kakumu T, Hase T, Yogo N, Maruyama E, et al. Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222 in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Med*. 2015;4(4):551-64.
77. Qiu D, Sun YC. Overexpression of miR-221 inhibits proliferation and promotes apoptosis of human astrocytoma cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4851-6.
78. Ihle MA, Trautmann M, Kuenstlinger H, Huss S, Heydt C, Fassunke J, et al. miRNA-221 and miRNA-222 induce apoptosis via the KIT/AKT signalling pathway in gastrointestinal stromal tumours. *Mol Oncol*. 2015;9(7):1421-33.
79. Yang F, Wang W, Zhou C, Xi W, Yuan L, Chen X, et al. MiR-221/222 promote human glioma cell invasion and angiogenesis by targeting TIMP2. *Tumour Biol*. 2015;36(5):3763-73.
80. Moshiri F, Callegari E, D'Abundo L, Corrà F, Lupini L, Sabbioni S, et al. Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2014;7(1):43-54.
81. Wang Y, Zhao Y, Herbst A, Kalinski T, Qin J, Wang X, et al. miR-221 Mediates Chemoresistance of Esophageal Adenocarcinoma by Direct Targeting of DKK2 Expression. *Ann Surg*. 2016.
82. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther*. 2009;16(3):206-16.
83. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126(5):1166-76.
84. 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;14(11):1271-7.
85. Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, et al. The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014;5(17):7748-59.
86. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
87. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500.
88. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e363.
89. Jensen MR, Factor VM, Fantozzi A, Helin K, Huh CG, Thorgeirsson SS. Reduced hepatic tumor incidence in cyclin G1-deficient mice. *Hepatology*. 2003;37(4):862-70.
90. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45(3):528-37.
91. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):592-603.
92. Wang L, Liu C, Li C, Xue J, Zhao S, Zhan P, et al. Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells. *Gene*. 2015;572(2):252-8.
93. Majid S, Dar AA, Saini S, Arora S, Shahryari V, Zaman MS, et al. miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Res*. 2012;72(24):6435-46.

94. Mu W, Hu C, Zhang H, Qu Z, Cen J, Qiu Z, et al. miR-27b synergizes with anticancer drugs via p53 activation and CYP1B1 suppression. *Cell Res.* 2015;25(4):477-95.
95. McCarthy, A D, Macey MG. Cytometric Analysis of Cell Phenotype and Function: *Blackwell Science Ltd*; 2002 2002.
96. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
97. Low J, Chakravartty A, Blosser W, Dowless M, Chalfant C, Bragger P, et al. Phenotypic fingerprinting of small molecule cell cycle kinase inhibitors for drug discovery. *Curr Chem Genomics.* 2009;3:13-21.
98. Yang X, Yang Y, Gan R, Zhao L, Li W, Zhou H, et al. Down-regulation of mir-221 and mir-222 restrain prostate cancer cell proliferation and migration that is partly mediated by activation of SIRT1. *PLoS One.* 2014;9(6):e98833.

8. APÊNDICE

XXXV CONGRESSO
BRASILEIRO DE UROLOGIA
31/OUT A 4/NOV DE 2015

CERTIFICADO

CERTIFICATE

Certificamos que o trabalho
**O PAPEL DE MICRORNAS NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA
ANDRÓGENO INDEPENDENTE**

dos autores: RUAN CÉSAR APARECIDO PIMENTA; NAYARA IZABEL VIANA; KATIA RAMOS MOREIRA LEITE; WILLIAN CARLOS NAHAS; MIGUEL SROUGI; SABRINA THALITA DOS REIS, foi apresentado, na modalidade Pódium (oral), no evento XXXV Congresso Brasileiro de Urologia ocorrido de 31 de outubro a 04 de novembro de 2015 no SulAmérica Centro de Convenções em Rio de Janeiro/RJ.

Rio de Janeiro, 04 de novembro de 2015

Archimedes Nardozza Jr.
Archimedes Nardozza Jr.
Comissão Organizadora do
XXXV Congresso Brasileiro de Urologia

Francisco Flávio Horta Bretas
Francisco Flávio Horta Bretas
Presidente da Comissão Científica do
XXXV Congresso Brasileiro de Urologia

Carlos Eduardo Corradi Fonseca
Carlos Eduardo Corradi Fonseca
Presidente da Sociedade Brasileira de Urologia

GENÉTICA 2016

Brazilian-International Congress of Genetics

11 a 14 de setembro de 2016 - Hotel Glória, Caxambu, MG

Certificamos que RUAN CÉSAR APARECIDO PIMENTA apresentou o trabalho intitulado THE ROLE OF MICRORNAS ON THE PROGRESSION OF ANDROGEN INDEPENDENT PROSTATE CANCER de autoria de PIMENTA, RCA, VIANA, NI, MORAIS, DR, GUIMARÃES, VR, CORREA, IP, AMARAL, GQ, PARK, R, SILVA, IA, LEITE, KRM, SROUGI, M, REIS, ST, no 62º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, no período de 11 a 14 de setembro de 2016, em Caxambu, MG, na área de GENÉTICA HUMANA.

Fabiano Rodrigues dos Santos
Fabiano Rodrigues dos Santos
Presidente da SBG

Célia Maria de Almeida Soares
Célia Maria de Almeida Soares
Primeira Secretária da SBG

2017

bq
SBBq

*Annual Meeting of Brazilian Society for
Biochemistry and Molecular Biology*

July 27th to 30th, 2017 Águas de Lindóia - SP - Brazil

Certificado

Certificamos que RUAN CESAR APARECIDO PIMENTA
apresentou o trabalho intitulado: **MICRORNA 23B SUPPRESSES**
THE APOPTOSIS RATE IN ANDROGEN RESISTANT PROSTATE
CANCER CELL LINE de autoria de PIMENTA, R.C.A, VIANA, N.I,
MORAIS, D.R, GUIMARÃES, V.R, CORREA, I.P, PARK, R,
AMARAL, G.Q, SILVA, I.A, LEITE, K.R.M, ISCAIFE, A, SROUGI, M,
REIS, S.T durante a 46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de
Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Águas de Lindóia,
São Paulo, no período de 27 a 30 de Julho de 2017.

Águas de Lindóia, 30 de julho de 2017.

Glaucius Oliva
Presidente da SBBq

Richard Charles Garratt
Vice Presidente da SBBq

RUAN C. A. PIMENTA

Apresentou trabalho científico na sessão **CIÊNCIA BÁSICA** com o **MICRORNAS 23B/27B EM ASSOCIAÇÃO COM FLUTAMIDA AUMENTAM A TAXA DE APOPTOSE EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A CASTRAÇÃO**, no dia **26/08/2017** às **11:00:00 13:00:00**.

Com o autor principal **RUAN C. A. PIMENTA** e os co-autores **NAYARA I. VIANA; DENIS REIS MORAIS; RUBENS PARK; KATIA RAMOS MOREIRA LEITE; WILLIAM CARLOS NAHAS; MIGUEL SROUGI; SABRINA T. REIS.**

Durante o **XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA**, de 26 a 29 de agosto de 2017, no Centro de Eventos de Fortaleza-CE.

Archimedes Nardozza Jr.
Archimedes Nardozza Jr.
Presidente da
Sociedade Brasileira de Urologia Biênio 2016-17

William Carlos Nahas
William Carlos Nahas
Presidente da Comissão Científica do
XXXVI Congresso Brasileiro de Urologia

Marcos Flávio Holanda Rocha
Marcos Flávio Holanda Rocha
Presidente da Comissão Local do
XXXVI Congresso Brasileiro de Urologia

Prezado(a) colega,

Parabéns! Seu trabalho "**código: 208- O PAPEL DOS MICRORNAS 23B/27B NA APOPTOSE EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE À CASTRAÇÃO**" foi selecionado para **apresentação no 31º Congresso Brasileiro de Patologia**, na forma de Pôster.

As apresentações neste formato são concorrentes ao prêmio abaixo:

- **Prêmio SBP Categoria Pôster** – Será concedido diploma de "Menção Honrosa" e prêmio em dinheiro, no valor de R\$ 600,00 (seiscentos reais), para até 10 (dez) dos melhores trabalhos selecionados para apresentação sob a forma de pôster, independentemente da classificação.

A Comissão Científica solicita que o autor do trabalho esteja em frente ao trabalho exposto durante os intervalos da programação científica.

Não haverá apresentação - será um momento em que o autor deverá estar disponível para responder a perguntas e dúvidas.

Em breve divulgaremos o cronograma de exposição dos pôsteres. Fique atento ao site do congresso:

www.congressodepatologia2017.com.br

A premiação será divulgada durante a festa de encerramento do Congresso.

Atenciosamente,
Comissão Científica

Camila Mazotti
Trabalhos Científicos
CCM CONGRESSES