Vanessa Ribeiro Guimarães Schreiter

**Efeitos dos microRNAs 100 e 145 sobre seus genes alvo no
câncer de próstata metastático – Estudo *in vivo***

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

Área de Concentração: Urologia

Orientadora: Prof. Dra. Katia Ramos Moreira
Leite

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Schreiter, Vanessa Ribeiro Guimarães
Efeitos dos microRNA 100 e 145 sobre seus genes
alvo no câncer de próstata metastático : estudo in
vivo / Vanessa Ribeiro Guimarães Schreiter. -- São
Paulo, 2020.

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

Programa de Urologia.

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.Metástase
neoplásica 3.Ensaio antitumoral modelo de
xenoenxerto 4.Biologia molecular 5.microRNAs
6.Expressão gênica

USP/FM/DBD-085/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A minha mãe Elizabete, serei eternamente grata por tudo que dedicou para que eu realizasse este sonho. Amo muito você!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me guia todos os dias e não me desampara nos momentos mais difíceis que já passei.

À Prof^a. Dr^a. Katia Ramos Moreira Leite, minha orientadora, que me aceitou como aluna, acreditou em minha capacidade e me orientou com todo carinho, agradeço desde o dia que me acolheu como funcionária no LIM55, demonstrando o grande exemplo de liderança e incentivo. Obrigada por me permitir realizar este sonho tão importante na minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Sabrina T. Reis que muito mais que minha coorientadora se tornou minha grande amiga, obrigada pela confiança na realização dos trabalhos do LIM55, por todas as oportunidades e ensinamentos. Obrigada não só pelo tempo que passamos juntas no trabalho, mas por todos os outros que passamos com nossas famílias juntas.

Ao Dr. Miguel Srougi por sua dedicação ao LIM 55, pelo exemplo de altruísmo e profissionalismo que nos oferece todos os dias.

Ao Dr. Alexandre Iscaife, por sua grande colaboração com os experimentos animais

À todas as secretárias e demais funcionários da disciplina de Urologia da FMUSP, em especial a Elisa Cruz que não mede esforço para nos ajudar, facilitando a comunicação com a pós-graduação.

Agradeço ao Iran Amorim Silva, primeiramente por sua amizade e por todo suporte e por sempre trazer algo novo facilitando no meu dia a dia.

Agradeço imensamente a essa irmã que a vida me deu, Dr^a. Nayara I Viana, obrigada por cada palavra de apoio que me reergueram em muitos momentos, pelo carinho que dedicou a esse trabalho e que dedica a mim e pela excelente profissional que me ensina muito a cada dia.

Ao meu amigo Ms. Ruan Pimenta, obrigada pelo apoio, por ser duro comigo, pelas orientações, por estar sempre ao meu lado e por sua amizade tão especial desde o dia em que nos conhecemos.

A todos os meus amigos do LIM- 55 que me ajudaram neste trabalho e com quem convivo diariamente Denis Reis, Juliana Camargo, Gabriel Arantes, Poliana Romão, Gustavo Inoue, Patrícia Rodrigues e os alunos de iniciação científica, obrigada fazer do LIM nosso segundo lar.

Agradeço a minha madrinha e amiga do coração de Faculdade Kelly Pinto, por me ajudar nos momentos de dificuldade durante a graduação e por ter se tornado da minha família.

À minha querida mãezinha Elizabete R Guimarães, uma guerreira que em nenhum minuto de sua vida deixou de se dedicar a mim e ao meu irmão, agradeço que mesmo com tão pouco, fez possível e o impossível para que nós tivéssemos educação e conquistássemos tudo que sonhamos. Meu amor por você é incondicional e por toda vida.

Ao meu irmão Vinicyus R Guimarães, que é meu exemplo de coragem e capacidade, à quem tenho muito orgulho. Obrigada por que desde que você nasceu aprendi a compartilhar o amor.

E finalmente ao meu amor, meu marido, Denis R Schreiter, que é muito especial para mim, que se dedica e se preocupa tanto comigo, obrigada por me apoiar muito neste trabalho e na vida, obrigada por tanto amor todos os dias e por cuidar de mim nos momentos difíceis que passamos neste trajeto. Te amo muito.

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	14
1.1. Câncer de Próstata	15
1.2. Câncer de Próstata Metastático	20
1.3. MicroRNAs	21
2. OBJETIVOS	28
3. METODOLOGIA	30
3.1. Estudos <i>in vivo</i>	31
3.1.1. Linhagem celular	31
3.1.2. O modelo animal de câncer metastático de próstata	31
3.1.3. Tratamento sistêmico dos animais com a solução miRNA/atelocolágeno	35
3.2. Extração do RNA e miRNA total	37
3.3. Transcrição reversa (RT)	38
3.4. Análise de expressão de genes (mTOR, SMARCA5, cMYC e KRAS) e miRNAs miR-100 e miR-145 PCR em tempo real quantitativo	39
3.5. Análise estatística	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Bioluminescência	43
4.2. Análise de expressão dos miRNAs e dos genes alvo	46
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	67

Lista de abreviações

μl- Microlitros

μM- micro molar

CaP- Câncer de Próstata

cDNA- DNA complementar

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DP- Desvio Padrão

INCA- Instituto Nacional do Câncer

LIM-55- Laboratório de Investigação Médica-55

miRNAs- microRNAs

mL- Mililitros

ng- Nano gramas

nM- nano molar

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

pri-microRNA- microRNA primário

PSA- Antígeno Prostático Específico

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

RNA- Ácido ribonucleico

RNA_m- Ácido ribonucleico mensageiro

rpm- rotação por minuto

RT- *Transcriptase Reversa*

SFB- Soro Fetal Bovino

TME- Transição Epitélio-Mesenquimal

TNM- Estádio Tumoral

β2M- Beta 2 mioglobulina

Lista de figuras

Figura 1. Estimativa de incidência e mortalidade de cânceres no mundo em 2018. Fonte: Globocan.....	15
Figura 2. Esquematização da nova graduação proposta pela ISUP.	18
Figura 3. Esquema da biogênese de miRNAs.....	23
Figura 4. Esquema de localização da sequência codificadora de miR-100.....	24
Figura 5. Técnica de injeção intra cardíaca.....	33
Figura 6. Demonstração da eficiência da emissão de luminosidade pela linhagem PC-3M-luc-C6 in vitro.....	34
Figura 7. Protocolo de preparo do complexo miRNA/atelocolágeno para injeção na veia da cauda.	36
Figura 8. Camundongo nude (Balb/c) tratado com 50µl de miR controle negativo e 50µl de atelocolágeno e animal tratado com 50µl de miR-145 ou miR-100 ou anti-100 e 50µl de atelocolágeno.	44
Figura 9. Crescimento tumoral em porcentagem.....	46
Figura 10. Nível de expressão relativa do miR-100.....	47
Figura 11. Nível de expressão relativa do anti-miR-100.....	48
Figura 12. Nível de expressão relativa do miR-100, anti-miR-100 e do controle.	49
Figura 13. Nível de expressão relativa do miR-145.....	51

Lista de tabelas

Tabela 1. Estadiamento patológico TNM/AJCC (2017).	17
Tabela 2. Grupos de animais	35
Tabela 3. Primers utilizados para quantificação da expressão dos genes alvo.	41

Resumo

Vanessa Ribeiro Guimarães Schreiter. *Efeitos dos microRNA 100 e 145 sobre seus genes alvo no câncer de próstata metastático – Estudo in vivo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: O Câncer de Próstata (CaP) metastático é uma doença incurável cujo tratamento tradicional e mais eficiente é o bloqueio androgênico. Essa modalidade, entretanto, tem papel limitado e após período médio de cinco anos os tumores adquirem o status resistente à castração, sendo nessa fase as opções terapêuticas muito limitadas. O conhecimento de vias moleculares vem propiciando o desenvolvimento de moléculas ou anticorpos para serem utilizados como terapia alvo em diversos tipos de câncer. Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas, fundamentais para o controle da expressão de genes e a alteração de sua expressão tem sido descrita no processo de carcinogênese do CaP. Neste estudo avaliamos um possível papel dos miRNAs 100 e 145 em modelo *in vivo* de CaP metastático, no controle de seus genes alvo, KRAS, cMYC e SMARCA5. **Objetivo:** Analisar a atividade dos miRNAs 100 e 145 no tratamento do CaP metastático em camundongos atímicos e estudar os efeitos desse tratamento nos níveis de expressão de seus genes alvo cMYC, KRAS, mTOR e SMARCA5 no tecido tumoral. **Métodos:** Para a indução do CaP metastático, os camundongos machos Balb/c nude foram inoculados com células PC-3M-luc-C6 (linhagem bioluminescente) intra ventricular esquerdo. Após a o estabelecimento da doença metastática, no dia 21, os animais foram separados em grupos de tratamentos com o miR-100, anti-miR-100 e miR-145 e seus respectivos controles negativos, associados ao atelocolágeno através de três injeções por via sistêmica com intervalos de 3 dias. As imagens do crescimento tumoral foram obtidas no equipamento IVIS (Spectrum). Três dias pós a última dose de tratamento (dia 30), os animais foram eutanasiados e o tecido tumoral foi avaliado por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para determinação do nível de expressão dos miRNAs 100 e 145 e de seus genes alvo cMYC, KRAS, mTOR e SMARCA5. **Resultados:** O grupo de animais tratado com miR-145 apresentou a menor velocidade de crescimento tumoral. O grupo tratado com miR-100 mostrou maior expressão intratumoral de miR-100 e subexpressão de mTOR. SMARCA5 esteve superexpresso neste grupo. Os animais tratados com anti-miR-100 mostraram redução na expressão de miR-100 intratumoral, subexpressão de mTOR e ausência de alterações em SMARCA5. No grupo tratado com miR-145 houve aumento dos níveis de expressão de miR-145 e redução dos níveis de KRAS e cMYC. **Conclusão:** Demonstramos em modelo *in vivo* o efeito dos miRNAs 100 e 145 sobre o crescimento tumoral e no controle de expressão de seus genes alvo mTOR, cMYC e KRAS.

Descritores: neoplasias da próstata; metástase neoplásica; ensaios antitumorais modelo de xenoenxerto; biologia molecular; microRNAs; expressão gênica.

Summary

Vanessa Ribeiro Guimarães Schreiter. *Effects of microRNAs 100 and 145 in in vivo model of metastatic prostate cancer* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: Metastatic prostate cancer (PC) is an incurable disease which treatment is based on the androgen deprivation. Although efficient at the beginning, after a mean period of 5 years, tumor acquires a castration-resistant status, when therapies have less efficacy. The knowledge of molecular pathways involved with progression of PC have been responsible for the development of molecules and antibodies, improving the survival in many types of cancer. microRNAs are small molecules related to gene expression control, and alterations in their expression profile have been described in PC. In this study we evaluated the expression levels of target genes of miR-100 and 145, KRAS, cMYC, mTOR and SMARCA5 and their effects in an *in vivo* model of metastatic PC. **Objective:** To analyze the activity of miRNAs 100 and 145 in the treatment of metastatic PC in nude mice, and to study the effects of the miRNAs over their target genes KRAS, cMYC, mTOR and SMARCA5 in tumor tissue. **Methods:** Male Balb/c nude mice were inoculated with bioluminescent PC-3M-luc-C6 cell line. After the development of metastatic disease, on day 21, the animals were treated with miR-100, anti-miR-100 and miR-145, and their respective controls systemically with 3 days interval between them. In vivo images were obtained using the IVIS (Spectrum) equipment. Three days after the last dose (day 30), animals were sacrificed, and tumor tissues were stocked for molecular analysis. Expression levels of miR-100, miR-145 and their target controls, KRAS, cMYC, mTOR and SMARCA5 were detected by quantitative, real-time PCR (qRT-PCR). **Results:** Animals treated with miR-145 presented the lowest tumor growth among the groups. The examination of tumor tissue showed that miR-100 treated animals had high levels of miR-100 and lower expression of mTOR. SMARCA5 was underexpressed in this group. Animals treated with miR-145 showed higher expression of miR-145, and reduction in the levels of KRAS and cMYC compared to controls. **Conclusion:** We showed the effects of miR-100 and miR-145 over tumor growth and over the expression levels of their target genes mTOR, cMYC and KRAS in an *in vivo* model of metastatic PC.

Key words: prostatic neoplasms; neoplasm metastasis; xenograft model antitumor assays; molecular biology; microRNAs; gene expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1.Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é o tumor mais comum do homem e o segundo tipo de tumor mais incidente entre os homens acima dos 40 anos no mundo (figura 1)⁽¹⁾. Nos EUA para o ano de 2019 foram estimados 174.650 novos casos de CaP e aproximadamente 31.620 mortes pela doença, que corresponde a 10% de todos os cânceres que acometem a população masculina ^(2, 3). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2020 estão estimados 65.840 novos casos de CaP. Em países desenvolvidos a taxa de incidência é maior quando comparados a países em desenvolvimento ⁽⁴⁾.

Figura 1. Estimativa de incidência e mortalidade de cânceres no mundo em 2018. Fonte: Globocan

O principal fator de risco do CaP é a idade. A maioria dos diagnósticos é realizado em homens com idade superior a 65 anos. O CaP ocorre em cerca de 80% dos homens com idade superior ou igual a 80 anos e de 10 a 15% por volta dos 50 anos. Curiosamente nos EUA a média de diagnósticos pode variar de acordo com a raça sendo de 71 anos para pacientes pertencentes a raça branca e 69 anos para pacientes da raça negra ^(5, 6).

A história familiar é um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento do CaP. Possuir um parente de primeiro grau afetado com CaP antes dos 60 anos de idade é um dos principais fatores de risco não modificáveis para esta neoplasia, e se dois ou mais membros de primeiro grau são afetados, o risco pode aumentar em até 3 vezes ^(7, 8). Estima-se que 8% de todos os CaP são causados por fatores hereditários de alto risco ⁽⁹⁾.

O exame de toque retal (TR) e a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA) são utilizados para evidenciar a possibilidade de presença de neoplasia prostática, sendo o diagnóstico realizado pela biópsia prostática guiada pela ultrassonografia transretal (BTRUS) quando um ou ambos apresentarem alteração ⁽¹⁰⁾. Sabe-se que a maioria dos tumores de próstata se localiza na zona periférica passível de detecção ao toque. A presença de um nódulo endurecido de volume maior que 0,2 mL já é considerado indício de doença ^(11, 12).

O PSA é um exame que possui baixa especificidade para detectar o câncer, pois se eleva em outras doenças como prostatite e hiperplasia prostática benigna (HPB). Dong et al. demonstraram que pacientes com níveis de PSA entre 4 a 10 ng/mL têm 30% de possibilidade de apresentarem a neoplasia, e

níveis de PSA inferiores (0,5ng/mL) a possibilidade de haver o CaP é de 6,6%⁽¹³⁾. Sendo assim não há um nível de PSA 100% seguro de diagnosticar esta doença.

Entre os fatores prognósticos estão principalmente o estadiamento patológico e o escore de Gleason. O estadiamento patológico segue a classificação TNM recomendada pela AJCC (*American Joint Committee on Cancer – 2017*), conforme a tabela 1.

Tabela 1. Estadiamento patológico TNM/AJCC (2017).

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 do tecido ressecado, Gleason ≤6
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado ou Gleason ≥7
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha
T2	Tumor confinado à próstata
T3	Tumor com extensão extra prostática, que não invade outras estruturas.
T3a	Extensão extra prostática (unilateral ou bilateral)
T3b	Invasão das vesículas seminais
T4	Tumor que invade estruturas adjacentes que não as vesículas seminais: reto, músculos elevadores do ânus, parede pélvica.
N- Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
M - Metástase à distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Linfonodo(s) não regional(ais)
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

O escore de Gleason prioriza o padrão arquitetural glandular e a relação entre glândulas e o estroma prostático e é dividido em 5 graus. O grau 1 é a lesão mais diferenciada e o grau 5 a mais indiferenciada. O escore é o resultado da soma dos dois padrões mais prevalentes. Os tumores com grau 6 ou menor são classificados como de baixo grau; o escore 7 é considerado de grau intermediário e pode ser dividido em 7 (3+4) e 7 (4+3), este último com comportamento mais agressivo. Os tumores de escore 8, 9 e 10 são considerados de alto grau ^(14, 15). A nova publicação da Organização Mundial da Saúde propõe um novo sistema de graduação que foi referendado pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP). Esse é dividido em 5 graus que correspondem a graduação de Gleason como exposto na figura 2 ⁽¹⁶⁾.

Figura 2. Esquematização da nova graduação proposta pela ISUP para o CaP e as curvas de sobrevida livre de recidiva de acordo com a nova graduação.

D'Amico e colaboradores em 1998, propuseram uma estratificação que tem como finalidade prever o risco de recidiva bioquímica posterior a prostatectomia radical ou a radioterapia. Essa proposta 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. O grupo de alto risco é postulado como sendo tumores $\geq T2c$, PSA > 20 ng/mL ou Gleason 8–10 ⁽¹⁷⁾.

Atualmente a determinação do tratamento do CaP consiste em vários fatores como escore de Gleason/ISUP, estadiamento, idade, a presença de comorbidades, riscos e possíveis efeitos adversos ao tratamento ⁽¹⁸⁾. O tratamento do CaP abrange desde a vigilância ativa até o tratamento sistêmico com bloqueio hormonal e quimioterapia. Para carcinoma confinado à próstata o tratamento é a prostatectomia radical e a radioterapia ^(18, 19).

Pacientes considerados de alto risco devem ser submetidos a tratamentos mais agressivos devido ao potencial metastático da doença. Em casos de CaP metastático a terapia de privação de andrógeno é comumente usada como tratamento de primeira linha, com o objetivo de reduzir os níveis dos principais andrógenos, a testosterona e a diidrotestosterona (DHT) ^(20, 21).

1.2. Câncer de Próstata Metastático

O processo de metástase se inicia quando as células cancerígenas da margem do tumor reativam a transição epitélio-mesenquimal (TEM, na sigla em inglês) e sofrem alteração na aderência adquirindo propriedades invasivas, atingindo um ou mais sítios teciduais distintos, através da corrente sanguínea ou de vasos linfáticos ⁽²²⁾.

O CaP metastático tem como propensão acometer os ossos, causando dor, compressão, fraturas patológicas e distúrbios hematológicos, o que acarreta efeitos prejudiciais severos na qualidade de vida do paciente. Paget em 1889 propôs a teoria de que o acometimento do CaP metastático aos ossos, se deve ao solo fértil que os ossos proporcionam (*seed and soil theory*). As células tumorais circulantes têm tendência a se aderir a cortical e medula óssea por meio de integrinas, colágeno e outras proteínas transmembrana ⁽²³⁻²⁵⁾.

Dentre os mecanismos que estão envolvidos no estudo da biologia molecular, os danos aos genes reguladores (proto-oncogenes, genes supressores tumorais, genes reguladores de apoptose e genes de reparo do DNA) são aspectos fundamentais para o desenvolvimento de neoplasias. Estes danos podem levar a disfunções na fisiologia celular como por exemplo: manutenção dos sinais para proliferação celular, desenvolvimento de angiogênese, desregulação dos mecanismos de apoptose mantendo a imortalidade replicativa, alteração na regulação de supressores do crescimento, ativação de mecanismos de invasão e metástase ⁽²⁶⁾.

O desenvolvimento de metástases pode se iniciar a partir de uma "assinatura genética" presente nas células do tumor primário e que permite a elas potencial metastático. As réplicas destas células adquirem características necessárias para invasão, podendo se desenvolver em um sítio secundário ⁽²⁷⁾.

O CaP metastático é incurável, responsável pela maior mortalidade relacionada a neoplasia, e nos melhores cenários os ganhos de sobrevida ainda são discretos, o que confere a grande importância em se estudar os mecanismos moleculares envolvidos neste evento (28). Algumas vias moleculares vêm sendo estudadas como terapia alvo molecular para o CaP metastático e para o desenvolvimento de novas drogas específicas.

1.3. MicroRNAs

Os microRNAs (miRNA) são um grupo de pequenas moléculas de RNA com 19 a 25 nucleotídeos não codificantes de proteína, com capacidade de regular a expressão gênica de animais e vegetais em nível pós-transcricional. Estão situados em regiões intergênicas, assim como em íntrons e podem fazer parte da fita codificante ou não codificante do DNA. Os miRNAs estão envolvidos em diversos processos celulares, dentre eles proliferação, diferenciação, resposta ao estresse, apoptose e regulação de várias vias celulares ⁽²⁹⁾. Os miRNAs em geral atuam predominantemente como supressores da expressão de genes e dependendo do gene alvo podem atuar como inibidor ou como estimulador de atividades celulares específicas ⁽³⁰⁾.

São sintetizados pela RNA polimerase II e modificados após a transcrição pela adição de uma *cap* na região 5' e uma cauda poli(A) na região 3'. Esta molécula chamada pri-miRNA forma uma estrutura tipo *hairpin* que no núcleo sofre a ação do complexo microprocessador (Drosha- DGCR8), através da ação de enzimas do tipo Rnase-III ⁽³¹⁾. O produto deste processamento tem aproximadamente 70 nucleotídeos, denominado pré-miRNA, este é transportado ao citoplasma pela Exportina 5, onde é clivado através da enzima Dicer formando um duplex contendo o miRNA maduro e sua fita complementar de aproximadamente 22 nucleotídeos ⁽³²⁾. Apenas uma das fitas do *duplex* de miRNA será montada dentro do complexo silenciador induzindo por RNA (RISC) que atua sobre o seu RNA mensageiro (RNAm) alvo reprimindo sua tradução em proteína ou promovendo sua degradação. Esta ação depende do grau de complementariedade do miRNA com a região 3' do RNAm alvo ⁽³³⁾. O mesmo miRNA pode ter mais de 100 RNAm alvos com funções diferentes, esperando-se que de um terço a metade dos RNA humanos sejam controlados por este mecanismo ⁽³⁴⁾ (Figura 3).

Figura 3. Esquema da biogênese de miRNAs segundo Yoon e De Micheli, 2005.

Na carcinogênese, alterações na biogênese e expressão de alguns miRNAs podem resultar em irregularidades nos níveis de expressão tanto de genes supressores de tumor, como de oncogenes ⁽³⁵⁾.

Algumas alterações na expressão de miRNAs estão relacionadas ao CaP ⁽³⁶⁾. Um dos primeiros estudos a demonstrar a expressão dos miRNAs com o CaP foi o trabalho de Porkka e colaboradores 2007, que demonstraram subexpressão de 37 miRNAs e superexpressão de 14 miRNAs, em amostras de CaP, correlacionando este perfil de expressão ao fenótipo resistente a castração ⁽³⁷⁾.

Nosso grupo vem estudando a ação de alguns miRNAs nesta neoplasia, entre eles o miR-100 e seus genes-alvo SMARCA5 e mTOR ⁽³⁸⁾. miR-100 está

localizado no cromossomo 11, na mesma posição que o miR let7-2, e é um dos membros mais conhecido da família do miR-99. Alterações na expressão dos miRNAs desta família estão relacionadas a vários tipos de tumores dentre eles o CaP ⁽³⁸⁾ (Figura 4).

Figura 4. Esquema de localização da sequência codificadora de miR-100 e seus genes alvos e seus papeis no controle de processos celulares (Leite K. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MIR100ID51447ch11q24.html>).

Em resultados anteriores foi demonstrado que a superexpressão de miR-100 está relacionada com a recidiva bioquímica em CaP localizado em pacientes tratados com prostatectomia radical ⁽³⁹⁾ e que este miRNA pode atuar de forma contexto dependente, ora atuando como oncomiR, alterando o ciclo celular e regulando negativamente o gene protetor SMARCA5, ou atuando como supressor de tumor regulando negativamente a via do mTOR, demonstrando seu possível envolvimento na progressão do CaP ⁽⁴⁰⁾.

O gene mTOR (mTOR) é uma quinase serina/treonina que pertence à via de sinalização PI3K/AKT, envolvido em diversos processos do desenvolvimento celular como a regulação do metabolismo, crescimento, nutrição, níveis de energia, estresse celular, proliferação e autofagia ⁽⁴¹⁾. SMARCA5 é um membro da família de SWI/SNF, que atua em atividades da helicase e ATPase, como parte de um complexo de remodelação da cromatina dependente de ATP. Usando a energia da hidrólise do ATP altera a posição ou estrutura do nucleossomo iniciando o processo de transcrição ⁽⁴²⁾. Alguns estudos tem demonstrado que este gene foi considerado como supressor tumoral em algumas neoplasias incluindo o CaP ⁽⁴³⁾.

O miR-145 está localizado no cromossomo 5 (5q32-33) e tem ação na supressão tumoral ⁽⁴⁴⁾. Alguns fatores a nível pós transcricional podem modular a expressão deste miRNA, propiciando que ele atue sobre diversos genes envolvidos em vários processos celulares, como, proliferação, apoptose, diferenciação, invasão e angiogênese ⁽⁴⁵⁾. Nosso grupo demonstrou que este miRNA tem a capacidade de inibir diretamente alguns oncogenes em linhagens celulares de CaP, como o cMYC, KRAS, IRS-1 e ERK5 ⁽⁴⁶⁾.

O gene cMYC age como promotor da transcrição de diversos genes e regula diversas funções celulares tais como proliferação, crescimento, diferenciação e apoptose. Estudos têm demonstrado que a expressão do cMYC está desregulada em boa parte dos tumores humanos ^(47, 48).

O gene KRAS é uma GTPase, transforma GTP em GDP. Níveis aumentados de GDP levam a inativação do KRAS, regulando a sua atividade. Mutações no KRAS diminuem sua capacidade de hidrolisar GTP em GDP, como consequência, promovem uma menor auto-inibição em sua atividade ^(49, 50). Este gene está envolvido principalmente na regulação da divisão e diferenciação celular, nos mecanismos de apoptose e quando mutado se torna um oncogene potente em diversos tipos de cânceres ⁽⁵¹⁾.

Em estudo realizado pelo nosso grupo, utilizamos um modelo de CaP metastático *in vivo*, e tratamento sistêmico com miR-100 e miR-145. O tratamento com miR-100 levou a um crescimento mais lento das lesões metastáticas enquanto o uso de anti-miR-100 levou a um crescimento maior das lesões, porém sem significância estatística. O tratamento com miR-145 reduziu o crescimento tumoral *in vivo* de forma eficaz e sem toxicidade, confirmando o seu papel como supressor tumoral e sua possível utilização como tratamento sistêmico do CaP ⁽⁴⁶⁾.

Considerando os resultados que tivemos nesse trabalho, o presente estudo propôs avaliar o padrão de expressão do miR-100 e de seus genes alvo SMARCA5 e mTOR assim como do miR-145 e de seus genes alvo cMYC e KRAS em amostras teciduais metastáticas provenientes do tratamento *in vivo* com o miR-100, anti-miR-100 e miR-145. Nosso objetivo é validar o papel desses

miRNAs no controle da expressão de seus genes alvos e suas consequências em modelo de CaP metastático reproduzido por Iscaife e cols. (2016).

2. OBJETIVOS

Analisar comportamento das lesões tumorais nos animais dos grupos tratados com miR-100 anti-miR-100 e miR-145, através das medições de bioluminescência

Analisar a expressão do miR-100 e de seus genes alvo mTOR e SMARCA5 por qRT-PCR em amostras teciduais de animais com CaP metastático tratados com miR-100 e anti-100.

Analisar a expressão do miR-145 e de seus genes alvo cMYC e KRAS por q-PCR em amostras teciduais de animais com CaP metastático tratados com miR-145.

3. METODOLOGIA

3.1. Estudos *in vivo*

3.1.1. Linhagem celular

PC-3M-luc-C6 é uma linhagem celular derivada de metástase óssea humana obtida de um paciente no MD Anderson Cancer Center, transfectada com o gene *Luciferase* do vaga-lume (Firefly) espécie *Photinus pyralis* da América do Norte utilizando um plasmídeo, no caso o pGL3. Ela foi obtida no American Type Culture Collection (ATCC) e recentemente autenticada pelo Serviço de autenticação celular da FMUSP. Esta linhagem foi cultivada em placas de cultura de contendo meio MEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) a 1%. As placas foram mantidas em estufa para cultura de células contendo atmosfera úmida composta por 95% de ar e 5% de CO₂ a temperatura de 37°C.

3.1.2. O modelo animal de câncer metastático de próstata

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pesquisa Animal da FMUSP sob o número 0010/17. Foram utilizados camundongos machos Balb/c nude atímicos de 9 a 11 semanas obtidos do Centro de Bioterismo da FMUSP. Cinco dias antes do experimento foram ambientados no biotério de experimentação de exame de imagem.

Para inoculação do modelo metastático de CaP, realizamos a injeção cardíaca intraventricular esquerda de células tumorais. Os animais foram anestesiados com isoflurano 3% e após sedação profunda, com respiração espontânea, os animais foram testados para qualquer sensibilidade à dor e quando essa estivesse abolida os animais foram posicionados em decúbito dorsal com as patas imobilizadas. Utilizamos paramentação estéril, e foi realizada antissepsia do tórax do animal com álcool 70%.

A injeção foi realizada com seringa de 1mL com agulha 30G, 6mm (BD®) com 80µl de uma solução de Dulbecco's PBS estéril contendo 2×10^6 células da linhagem PC-3M-luc-C6. Após aspiração das células uma bolha de ar foi aspirada para manter uma pressão levemente negativa dentro da seringa.

A punção, foi realizada no 3º/4º espaço intercostal esquerdo, 3 mm lateral ao esterno, com uma inclinação de 15 graus em relação ao plano horizontal com a agulha apontando para o ombro direito do animal. Utilizou-se a prega inferior da pata anterior esquerda como referência, o nível da punção deve ser 2mm abaixo dessa prega (figura 5).

Figura 5. Técnica de injeção intra cardíaca (A) utilizando a agulha os 80µl foram injetados abaixo do terceiro espaço intercostal esquerdo angulado em 45° apontado para o ombro direito. (B) imagem axial do coração da localização do VE para punção. (C) angulação de 15° da agulha com o plano horizontal. Fonte: (46).

Após a punção, a agulha foi avançada lentamente até a perfuração do VE e o acesso a sua cavidade, porém sem ultrapassá-la. O sucesso da punção foi alcançado quando um jato contínuo de sangue arterial é visualizado no interior da seringa. Isso ocorre com a progressão de aproximadamente 5mm da agulha. Nesse momento foi injetado lentamente 40µl do volume e após 3 segundos mais 40µl. Retiramos a agulha e realizamos uma leve compressão no tórax observando a frequência cardíaca, frequência respiratória e estado geral do animal.

Imediatamente após a inoculação, injetamos por via intra-peritoneal o substrato da luciferase, a D-luciferina (Promega) na dose de 5 mg/Kg, que se dissemina pelo corpo e serve como substrato reagindo com as células contendo luciferase, sendo captada pelo equipamento IVIS (Xenogen - IVIS® Spectrum).

As imagens analisadas servem para confirmar a eficiência da injeção, sendo considerados válidos apenas os animais que apresentaram bioluminescência em todo o corpo ($> 90\%$ de superfície corpórea) (Figura 6). Observa-se o crescimento do tumor através da medida da bioluminescência e das cores representadas na escala, a cor azul representa poucas células e a cor vermelha representa o máximo de células biologicamente ativas. Os animais validados foram então examinados pelo sistema IVIS semanalmente, sendo considerado D0 o dia da injeção ventricular. O aparecimento de metástases ocorreu por volta da terceira semana (D21) com uma emissão de luz de 150-250 fótons/seg/célula e quando confirmada a presença de metástases o animal foi submetido ao tratamento.

Figura 6. Demonstração da eficiência da emissão de luminosidade pela linhagem PC-3M-luc-C6 in vitro (A) teste in vitro, em triplicata, realizado antes da injeção de luciferina para verificação da atividade da luciferase (B) Injeção correta intraventricular esquerda demonstrando a circulação sistêmica das células tumorais (C). Injeção incorreta, perfurando septo e alcançando ventrículo direito demonstrando a permanência das células tumorais na circulação pulmonar.

Os grupos de animais utilizados estão especificados na tabela 2. Os grupos miR-145 e controle negativo possuem maior número de animais pois, inicialmente foi realizado um experimento piloto do qual utilizamos os resultados em nossa análise final.

Tabela 2. Grupos de animais

Grupo	Número
Controle Negativo “Scramble”	9
Tratamento miR-100	5
Tratamento anti-miR-100	5
Tratamento miR-145	8

3.1.3. Tratamento sistêmico dos animais com a solução miRNA/atelocolágeno

Para preparação do complexo miR-100, anti-miR-100, miR-145 e Controle Negativo “Scramble”, utilizamos atelocolágeno (0,1% em PBS, pH 7,4) e solução de miRNA combinados e mantidos em rotação por 1 h a 4°C, sendo a concentração final de atelocolágeno de 0,05% ⁽⁵²⁾.

Nos dias 21, 24 e 27 após a injeção das células tumorais 100 µl de volume constituído por 56 µg de miRNA complexado com atelocolágeno foram injetados na veia caudal dos animais, conforme protocolo abaixo.

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

Utilizamos uma solução de 20 µM de miRNA para um volume final de 100 µl (50µl de atelocolágeno + 50 µl de miRNA em tampão 1x) – Corresponde a dose de 3mg/Kg para animal de 20g (conforme bula Ambion), ou 56µg de miR ou 4 nmol por dose. O preparo foi realizado com 8 µl de miR (estoque 2) + 42µl de tampão 1x (tampão 10x + água em relação 1/9)= 50µl.

O produto final foi constituído por 50µl de miRNA (20nM) + tampão e 50µl de atelocolágeno que foi mantido em rotação de 4 rpm por 20 min a 4°C.

Para o tratamento, a solução preparada foi injetada na veia da cauda do camundongo após o seu aquecimento com lâmpada ou água à 39°C para aumentar o fluxo sanguíneo e ter melhor visualização (Figura 7).

Figura 7. Protocolo de preparo do complexo miRNA/atelocolágeno para injeção na veia da cauda.

Realizamos 3 doses do tratamento com intervalo de 3 dias, ou seja, no D21, D24 e D27.

Antes de cada injeção de miRNA e no dia 30 os animais foram novamente examinados pelo sistema de imagem. Sendo que no dia 30 após o último exame os animais foram eutanasiados para a coleta das amostras de tecido metastático, que foram armazenadas em RNAlater para as análises de expressão gênica.

3.2. Extração do RNA e miRNA total

Para extração de miRNA 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 miRNAs.

As preparações das amostras de tecido fresco foram realizadas em gelo de 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 miRNAs e o RNA foram centrifugados e armazenados a -80°C até sua utilização.

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

3.3. Transcrição reversa (RT)

O DNA complementar (cDNA) do miRNA foi obtido usando TaqMan® miRNAs Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 200ng/µL de miRNA 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 miRNAs, 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™ 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 cDNAs foram armazenados a -20 °C até o uso.

3.4. Análise de expressão de genes (mTOR, SMARCA5, cMYC e KRAS) e miRNAs miR-100 e miR-145 PCR em tempo real quantitativo

A expressão dos miRNAs 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, FosterCity, CA). A expressão de miRNAs e RNA individuais

foram analisadas utilizando-se primers sequência-específicos adquiridos pela Applied Biosystems.

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 indireta do miRNA 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) (Tabela 4), 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 miRNAs e dos genes alvo foram obtidos pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (53).

Tabela 3. Primers utilizados para quantificação da expressão dos genes alvo.

Gene e miRNAS	Identificação do ensaio
SMARCA5	HS00186149_m1
mTOR	HS01042424_m1
cMYC	Hs00153408_m1
KRAS	Hs00364284_g1
B2M (controle)	Hs99999907_m1
miR-145	000467
miR-100	000437
RNU48	1006

3.5. Análise estatística

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

Para análise estatística utilizamos o software GraphPad Prism 8.0. E adotamos um nível de significância de 5%, ou seja, consideramos estatisticamente significantes os resultados que apresentaram o valor de p inferior a 5% ($p < 0,05$) em todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. Bioluminescência

A medida de bioluminescência absoluta foi obtida através da média de todas as lesões de cada animal do grupo analisado. A normalização foi feita dividindo o valor da bioluminescência do dia de tratamento, pelo valor do dia anterior ao início do tratamento.

Os animais apresentaram metástases ósseas difusas após 21 dias da inoculação das células PC-3M-luc-C6. O grupo controle foi composto por 9 animais e durante o tratamento 2 animais deste grupo morreram antes da última injeção de tratamento no D27. Os grupos tratados com miR-100 e o grupo anti-miR-100 foram constituídos por 5 animais cada. No grupo tratado com o miR-145 apenas 1 dos 8 animais do grupo não sobreviveu ao último tratamento. Inicialmente realizamos um experimento piloto com os grupos miR-145 e controle negativo e os resultados deste experimento utilizamos em nossa análise final então, por isso estes dois grupos possuem maior número de animais.

As imagens obtidas pelo equipamento IVIS, demonstram a comparação evolutiva das lesões dos animais tratados com o controle, miR-100, anti-miR-100 e miR-145 (Figura 8). As bioluminescências desses animais foram analisadas a cada injeção de tratamento para observação do crescimento dos tumores.

Figura 8. Camundongo nude (Balb/c) tratado com 50µl de miR controle negativo e 50µl de atelocolágeno e animal tratado com 50µl de miR-145 ou miR-100 ou anti-100 e 50µl de atelocolágeno. A imagem representa a bioluminescência da evolução tumoral do mesmo animal a partir do 14º dia (D14) e dos dias de tratamentos, 21º, 24º e 27º.

Na figura 9 cada valor representa a porcentagem de aumento da emissão de luciferase pelo tumor em relação ao dia anterior de tratamento. Apesar de não significativo do ponto de vista estatístico, as curvas de bioluminescência demonstram que o grupo tratado anti-miR-100 apresentou menor crescimento (D24 $p=0,2657$ e D27 $p=0,2179$) quando comparado ao grupo do miR-100, que obteve o maior crescimento entre os grupos (D24 $p=0,4918$ e D27 $p=0,1350$).

O grupo tratado com miR-145 demonstra menor velocidade de crescimento comparado ao grupo controle, entretanto essa diferença entre os dias de tratamento não foi estatisticamente significante (D24 $p=0,5183$ e D27 $p=0,8105$) (Figura 9).

Embora não tenhamos encontrado significância estatística acreditamos que esse resultado seja relevante do ponto de vista biológico, uma vez que a diferença do crescimento entre o segundo e o terceiro tratamento (D24/D27) foi grande, demonstrando uma ação deste tratamento em tumores metastático de grau avançado.

Figura 9. Crescimento tumoral em porcentagem. Comparação entre o dia 24/21(1) e 27/24(2).

4.2. Análise de expressão dos miRNAs e dos genes alvo

O perfil de expressão do miR-100 e do anti-miR-100 e seus genes alvo foi analisado pelo método qRT-PCR nas metástases de cada animal do grupo correspondente e comparadas às metástases do grupo controle (Figura 10).

Ao compararmos as expressões das amostras dos grupos podemos observar que o grupo tratado com miR-100 apresenta superexpressão deste miR em relação ao controle (13557 ± 25028 vs $37,34 \pm 52,55$ – $p = 0,3221$). Embora

não estatisticamente diferente, demonstramos que há um aumento de seus níveis nos animais tratados.

A expressão do gene alvo mTOR do grupo tratado com miR-100 foi menor em comparação ao grupo controle, embora sem significância estatística ($0,009512 \pm 0,00665$ vs $0,01201 \pm 0,00669$ – $p= 0,6126$)

Já o gene SMARCA5 apresentou aumento da expressão no grupo de animais tratados com o miR-100 em comparação ao grupo controle, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($0,02327 \pm 0,08254$ vs $0,03139 \pm 0,08864$ – $p= 0,1768$)

Figura 10. Nível de expressão relativa do miR-100 e dos genes alvo mTOR e SMARCA5 analisado no tecido metastático dos animais tratados (Teste T).

No grupo tratado com anti-miR-100, este miRNA demonstrou subexpressão em relação controle, entretanto sem significância estatística ($11,76 \pm 11,88$ vs $37,34 \pm 52,55$ – $p= 0,3790$) (Figura 11).

Em relação a expressão do gene mTOR do grupo tratado com anti-miR-100 encontramos subexpressão deste gene em relação ao seu controle, mas também sem significância estatística ($0,005113 \pm 0,003838$ vs $0,01286 \pm 0,007111$ – $p= 0,0644$)

Em relação ao gene SMARCA5 encontramos um perfil de expressão bem semelhante entre o grupo de animais tratados com o anti-miR-100 e o grupo controle ($0,03136 \pm 0,01222$ vs $0,031309 \pm 0,02327$ – $p= 0,9978$).

Figura 11. Nível de expressão relativa do anti-miR-100 e dos genes alvo mTOR (*Mann-Whitney) e SMARCA5 analisado no tecido metastático dos animais tratados.

Ao compararmos as médias de expressão do miR-100 entre os grupos tratados com miR-100 e anti-miR-100, comparados ao grupo controle, observamos que houve superexpressão deste miR no grupo tratado com miR-100 e subexpressão no grupo tratado com anti-miR-100, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (miR-100: 13557 ± 25028 vs anti-miR-100: $11,76 \pm 11,88$ vs controle: $37,34 \pm 52,55$ – $p= 0,3627$) (Figura 12).

Figura 12. Nível de expressão relativa do miR-100, anti-miR-100 e do controle analisado no tecido metastático dos animais tratados.

A expressão de miR-145 e seus genes alvo foi analisado pelo método de qRT-PCR nas metástases de cada lesão individual nos animais do grupo tratado com este miR e comparadas às expressões das lesões provenientes do grupo controle (Figura 13). Encontramos superexpressão do miR-145 nas amostras provenientes dos animais que foram tratados com este miR, em comparação ao grupo controle, embora sem significância estatística ($0,1115 \pm 0,1742$ vs $0,06934 \pm 0,05238$ – $p= 0,579$). Apesar disso, consideramos que o método de tratamento foi efetivo, uma vez que encontramos maior expressão do miR em questão, nos animais onde houve sua injeção.

O gene alvo do miR-145, cMYC apresentou subexpressão quando comparado a seu controle ($1,572 \pm 1,524$ vs $3,135 \pm 2,257$ – $p= 0,0987$), assim como gene KRAS ($0,0003441 \pm 0,0002322$ vs $0,002074 \pm 0,002557$ – $p= 0,1001$), mas essas relações não foram diferentes do ponto de vista estatístico. Entretanto, a subexpressão desses genes reforça nossa teoria sobre a efetividade do nosso modelo de tratamento.

Figura 13. Nível de expressão relativa do miR-145 e dos genes alvo cMYC e KRAS analisado no tecido metastático dos animais tratados.

5. DISCUSSÃO

Para compreender o potencial terapêutico dos miRNAs 100 e 145 no CaP metastático, utilizamos um modelo in vivo, previamente estabelecido em nosso laboratório, e a partir dele estudamos o perfil de expressão dos genes mTOR, SMARCA5, cMYC e KRAS, alvos desses miRNAs.

O CaP metastático foi reproduzido em camundongos Balb/c nude, que possuem resposta imune adaptativa limitada capazes de aceitar enxertos de tecidos de outra espécie, sendo considerado portanto, um modelo ideal para pesquisa em câncer, permitindo estudos de tumores humanos sem alterar sua originalidade ⁽⁵⁴⁾.

Com intensão de reproduzir uma doença que afeta humanos, inoculamos os animais com células bioluminescentes provenientes de metástase óssea de CaP (PC3-M-LUC-C6), via sistema arterial e tratamos com os miRNAs 100, anti-100 e 145, por via sistêmica, endovenosa, simulando um tratamento de quimioterapia. Acompanhamos o crescimento tumoral através da bioluminescência emitida por fótons pelas células viáveis e em atividade ⁽⁵⁵⁾.

MiR-100 e anti-miR-100

A investigação do papel dos microRNAs no diagnóstico, prognóstico e possível tratamento do CaP constitui uma das principais linhas de pesquisa do nosso laboratório. Leite et al demonstraram que o miR-100 está diretamente relacionado à progressão do CaP, apresentando alta expressão em tumores localizados de alto grau ⁽⁵⁶⁾. Outros estudos sugerem que o miR-100 possui um

papel contexto dependente no CaP, podendo atuar como supressor tumoral ou oncogene, dependendo do estágio do tumor ⁽⁵⁷⁾.

Na tentativa de entender melhor o mecanismo de diferenciação da expressão do miR-100 nos tumores de CaP, Sánchez et al. ⁽⁵⁷⁾ analisaram os exossomos em células de CaP de alto grau e verificaram uma abundância de miR-100. Os exossomos têm a capacidade de mediar a interação celular contribuindo para a modificação do microambiente tumoral facilitando a diferenciação, a proliferação, a migração e a TEM. Células tumorais liberam exossomos para o meio extracelular e esses atuam na comunicação de alterações do microambiente pré- metastático, demonstrando que o miR-100 contribui com a progressão do CaP.

Em nosso estudo avaliamos o potencial terapêutico do miR-100 e de seu inibidor anti-miR-100 sobre metástase de tumores de CaP em modelo *in vivo*. Nos animais tratados as metástases continuaram em progressão e os níveis de miR-100 eram maiores em relação ao controle. Enquanto que as amostras provenientes dos animais tratados com seu anti-miR apresentaram menor taxa de crescimento e menor expressão de miR-100. Embora não tenha havido desaparecimento da doença metastática, sua progressão foi menor no grupo tratado com anti-miR100 em relação aos demais grupos.

Takeshita et al. ⁽⁵⁸⁾ utilizando a mesma técnica de tratamento *in vivo* à semelhança do nosso não encontrou resultados significativos na redução das metástases nos tratamentos iniciados após quatro semanas da inoculação das células de CaP em camundongos. Em um segundo momento neste mesmo estudo, Takeshita encontrou resultados mais relevantes quando o tratamento se

iniciou a partir do terceiro dia após a inoculação. Sendo assim acreditamos que o tratamento utilizado em nosso estudo, poderia ter apresentado maior eficácia caso fosse iniciado em um período mais precoce. Entretanto, ressaltamos que nosso objetivo era avaliar o possível efeito terapêutico desses miRNAs nas metástases já estabelecidas, uma vez que nesse estágio da doença as opções terapêuticas são escassas.

Sabe-se que o complexo PI3K / Akt / mTOR está envolvido em muitos processos celulares e sua desregulação está associada à progressão de diversos tipos de cânceres e também no CaP ⁽⁵⁹⁾. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou em estudos *in vitro* realizado em linhagens celulares metastáticas de CaP que o miR-100, apesar de ser considerado um oncomiR, atua como supressor de tumor regulando negativamente a expressão do gene mTOR, um oncogene ⁽⁴⁰⁾. Esse fato foi comprovado em nosso estudo, onde mTOR esteve menos expresso no tecido tumoral de animais tratados com miR-100, embora essa diferença não tenha sido significativa.

De outro lado, miR-100 pode atuar como um oncomiR, controlando negativamente a expressão de SMARCA5. Este é um membro da família de proteínas SWI/SNF, que participa da regulação do ciclo celular, inibindo a proliferação, migração e invasão celular ⁽⁴³⁾. Esses dados, no entanto, são controversos. Experimentos funcionais com a indução do gene SMARCA5 demonstraram que ele se comportou como oncogene no CaP, promovendo a proliferação do ciclo celular e inibindo a apoptose ⁽⁶⁰⁾.

Nosso grupo demonstrou anteriormente que o gene SMARCA5 é um possível alvo do miR-100 em estudos de linhagem celular, detectando uma

menor expressão deste em células transfectadas com miR-100 ⁽⁴⁰⁾. Nossos dados atuais em animais são opostos. Houve uma maior expressão de SMARCA5 no grupo tratado com miR-100, e naqueles inoculados com anti-miR100 não houve alteração em seus níveis de expressão. Acreditamos que outras técnicas devem ser utilizadas para o esclarecimento da atuação do miR-100 sobre o SMARCA5 e sobre o papel de ambos na carcinogênese prostática.

miR-145

Michael et al. ⁽⁶¹⁾ foram os primeiros a relatar a desregulação do miR-145 em tumores onde encontraram níveis reduzidos deste miR em pacientes com adenocarcinoma do cólon. O miR-145 é considerado um importante supressor tumoral e tem sido relacionado à progressão do CaP ⁽⁶²⁾.

Estudos anteriores mostram miR-145 desregulado em vários tipos de câncer tais como colo do útero, bexiga e ovário ⁽⁶³⁻⁶⁶⁾. Wen-Xiu Xu et al. concluíram que este miRNA pode ser usado no tratamento de tumores ⁽⁶⁷⁾. O primeiro estudo na literatura utilizando este miRNA como tratamento do CaP metastático *in vivo* foi do nosso grupo conduzido por Iscaife e cols. Neste trabalho o miR-145 reduziu o crescimento tumoral *in vivo* de forma consistente e sem toxicidade ⁽⁶⁸⁾.

Reproduzimos o modelo e o tratamento utilizado por Iscaife e cols. e novamente encontramos resultados animadores em relação ao miR-145. No modelo *in vivo*, os animais que foram tratados com o miR-145 apresentaram redução da velocidade de progressão da doença, que foi observada pela

redução da curva de bioluminescência das metástases. E quando mensuramos a expressão deste miRNA nas lesões, encontramos uma maior expressão deste quando comparado ao grupo controle.

Em meados de 2005 sabia-se que a ativação do p53 estava associada à regulação negativa do oncogene cMYC, no entanto ainda não estava elucidado qual era o mecanismo responsável por essa regulação ⁽⁶⁹⁾. Em 2009 Sachdeva, demonstrou que existe um elemento de resposta ao p53 em região promotora de miR-145 (p53RE) que permite a ligação do p53, induzindo a expressão do miR-145 ⁽⁷⁰⁾. O aumento da expressão do miR-145 pode regular vários processos associados à tumorigênese, como proliferação, apoptose, metástase, diferenciação celular e angiogênese, através do controle da expressão de alguns importantes oncogenes como o cMYC e KRAS, que estão associados ao CaP ⁽⁴⁵⁾.

Os nossos animais tratados com miR-145 mostraram um maior nível de expressão dessa molécula no tecido tumoral onde também observamos uma subexpressão do gene cMYC.

O gene Ras é um protooncogene que está comumente mutado em diversos tumores. KRAS é responsável por 86% dos cânceres causados por RAS pois é a isoforma mais frequentemente mutada ⁽⁷¹⁾. A supressão de RAS pelo miR-145 já foi descrita em alguns tumores como, adenocarcinoma colorretal e câncer do colo do útero ^(72, 73). Existem evidências, também de que o KRAS age sobre o miR-145. O estudo de Kent et al. demonstrou que o gene KRAS juntamente com o gene codificador de proteína RREB1 leva a repressão da expressão do miR-145 em câncer colorretal ⁽⁷⁴⁾.

Em nossas amostras o gene KRAS apresentou menor expressão no grupo de animais tratados com o miR-145, reforçando seu controle sobre esse oncogene.

Esses resultados nos levam a crer que o método utilizado para tratamento com o miR-145 foi eficaz para a redução da expressão dos oncogenes cMYC e KRAS, reforçando nossa intenção de propor este miR como uma molécula que tem potencial para ser utilizada no tratamento do CaP metastático.

Limitações do estudo

Em nosso estudo, algumas limitações foram observadas.

Acreditamos que a observação dos fenômenos biológicos seria mais acurada se um maior número de animais fosse estudado.

O início do tratamento no D21 também é uma crítica. Nessa época as lesões são volumosas e o efeito de drogas biológicas talvez seja insuficiente para observação de fenômenos mais exuberantes. Visto que, houve uma redução do crescimento das metástases, mas sem poder para comprovação estatística.

Outra dificuldade é o número de tratamento. Um número maior de injeções e uma frequência maior poderiam resultar em dados mais robustos. Porém, o acesso para a injeção sistêmica é difícil e alguns animais apresentaram lesões locais que dificultaram a sua realização.

6. CONCLUSÃO

Os animais tratados com miR-100 demonstraram maior crescimento das lesões em comparação com os demais grupos, mostrando um papel de oncogene desse miRNA no CaP.

O grupo tratado com miR-145 obteve a menor curva de crescimento tumoral entre os grupos.

No tecido tumoral de todos os animais tratados com os diferentes miRNAs observamos uma maior expressão dos respectivos miRNAs em relação aos controles.

A atividade de miR-100 e anti-miR-100 sobre os genes mTOR e SMARCA5 se mostraram inconsistentes, não permitindo conclusões a respeito do controle de sua expressão sobre esses genes.

A atividade de miR-145 como um gene supressor de tumor está reforçada, pois os genes cMYC e KRAS tiveram sua expressão consistentemente diminuída após a sua injeção.

7. REFERÊNCIAS

1. GLOBOCAN. Cancer today 2020 [Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
2. NIOH. U.S. Department of Health and Human Services NIOH, National Cancer Institute. U.S. Department of Health and Human Services: National Institutes of Health; 2019 [Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
3. Siegel RLaMKDaJA. Cancer statistics, 2019. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2019;69(1):7-34.
4. INCA. Câncer de próstata. 2020.
5. STANFORD JL, STPHENSON RA, COYLE LM, al. e. Prostate cancer trends, 1973-1995. Bethesda, MD: SEER Program, National Cancer Institute, NIH Pub. 1999;99-45-43.
6. 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.
7. Reddy S, Shapiro M, Morton R, Brawley OW. Prostate cancer in black and white Americans. Cancer Metastasis Rev. 2003;22(1):83-6.
8. Kiciński M, Vangronsveld J, Nawrot TS. An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: a meta-analysis. PLoS One. 2011;6(10):e27130.
9. Verhage BA, Baffoe-Bonnie AB, Baglietto L, Smith DS, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, et al. Autosomal dominant inheritance of prostate cancer: a confirmatory study. Urology. 2001;57(1):97-101.
10. Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. Urology. 1999;54(5):780-6.
11. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. Urology. 1993;42(4):365-74.
12. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Ramos C, Catalona WJ. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. J Urol. 1999;161(3):835-9.
13. Dong F, Kattan MW, Steyerberg EW, Jones JS, Stephenson AJ, Schröder FH, et al. Validation of pretreatment nomograms for predicting indolent prostate cancer: efficacy in contemporary urological practice. J Urol. 2008;180(1):150-4; discussion 4.
14. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. Scand J Urol Nephrol Suppl. 2005(216):34-63.
15. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol. 1992;23(3):273-9.
16. Epstein JI. Prostate Cancer Grade Groups Correlate with Prostate-specific Cancer Mortality: SEER Data for Contemporary Graded Specimens. Eur Urol. 2016.
17. 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.

18. Brawer MK, Stamey TA, Fowler J, Droller M, Messing E, Fair WR. Perspectives on prostate cancer diagnosis and treatment: a roundtable. *Urology*. 2001;58(2):135-40.

19. Chaturvedi S, Garcia JA. Novel agents in the management of castration resistant prostate cancer. *J Carcinog*. 2014;13:5.

20. Simonsen K, Kolesar J. New treatment options for castration-resistant prostate cancer. *Am J Health Syst Pharm*. 2013;70(10):856-65.

21. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA*. 2005;294(2):238-44.

22. Weidle UH, Epp A, Birzele F, Brinkmann U. The Functional Role of Prostate Cancer Metastasis-related Micro-RNAs. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16(1):1-19.

23. Harrison MR, Wong TZ, Armstrong AJ, George DJ. Radium-223 chloride: a potential new treatment for castration-resistant prostate cancer patients with metastatic bone disease. *Cancer Manag Res*. 2013;5:1-14.

24. Bienz M, Saad F. Management of bone metastases in prostate cancer: a review. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2015;9(3):261-7.

25. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(7):409-25.

26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

27. Sleeman JP, Christofori G, Fodde R, Collard JG, Berx G, Decraene C, et al. Concepts of metastasis in flux: the stromal progression model. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(3):174-86.

28. Sleeman JP. Metastasis: understanding is the beginning of order in chaos. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(3):173.

29. Amaral BAd, Nonaka CFW, Freitas RdA, Souza LBd, Pinto LP. MicroRNAs: biogênese, functions and its potential role in oral carcinogenesis. 2010.

30. 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.

31. Pereira TC. Introducao ao Mundo dos microRNAs 2015.

32. 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.

33. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.

34. Yoon S, De Micheli G. Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes. *Bioinformatics*. 2005;21 Suppl 2:ii93-100.

35. Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS*. 2007;115(10):1090-106.

36. Ambis S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6162-70.

37. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67(13):6130-5.
38. Leite KRM. MIR100 (microRNA 100). Atlas Genetics Oncol Haematol: INIST-CNRS 2012 [updated 2012. Jean-Loup Huret [16:5]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MIR100ID51447ch11q24.html>.
39. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sañudo A, Dall'Oglio MF, et al. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *J Urol.* 2011;185(3):1118-22.
40. Leite KR, Morais DR, Reis ST, Viana N, Moura C, Florez MG, et al. MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68(6):797-802.
41. Cortot A, Armand JP, Soria JC. [PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors]. *Bull Cancer.* 2006;93(1):19-26.
42. Havas K, Whitehouse I, Owen-Hughes T. ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(5-6):673-82.
43. Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C, et al. miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 2011;71(4):1313-24.
44. Goto Y, Kurozumi A, Enokida H, Ichikawa T, Seki N. Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer. *Int J Urol.* 2015;22(3):242-52.
45. Cui SY, Wang R, Chen LB. MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *J Cell Mol Med.* 2014;18(10):1913-26.
46. Iscaife A. O uso de MicroRNA para o tratamento do Câncer de Próstata: estudos *in vitro* e *in vivo*.: Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo 2016.
47. Wong WJ, Qiu B, Nakazawa MS, Qing G, Simon MC. MYC degradation under low O2 tension promotes survival by evading hypoxia-induced cell death. *Mol Cell Biol.* 2013;33(17):3494-504.
48. Wolfer A, Wittner BS, Irimia D, Flavin RJ, Lupien M, Gunawardane RN, et al. MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3698-703.
49. Kiyono M, Kato J, Kataoka T, Kaziro Y, Satoh T. Stimulation of Ras guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) upon tyrosine phosphorylation by the Cdc42-regulated kinase ACK1. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29788-93.
50. Rubio I, Wittig U, Meyer C, Heinze R, Kadereit D, Waldmann H, et al. Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Eur J Biochem.* 1999;266(1):70-82.
51. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1756(2):81-2.
52. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, et al. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(13):e109.
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
54. Mouse (immunodeficient) Nude mice 2020

55. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal models of bone metastasis. *Cancer*. 2003;97(3 Suppl):748-57.
56. Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Camara-Lopes LH, Sañudo A, et al. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol*. 2011;29(3):265-9.
57. Sánchez CA, Andahur EI, Valenzuela R, Castellón EA, Fullá JA, Ramos CG, et al. Exosomes from bulk and stem cells from human prostate cancer have a differential microRNA content that contributes cooperatively over local and pre-metastatic niche. *Oncotarget*. 2016;7(4):3993-4008.
58. Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, et al. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12177-82.
59. Russo GI, Hennenlotter J, Vogel U, Kühs U, Wurm TM, Gerber V, et al. Intratumoral Heterogeneity Determines the Expression of mTOR-pathway Proteins in Prostate Cancer. *Dis Markers*. 2019;2019:1296865.
60. Kong Z, Wan X, Zhang Y, Zhang P, Zhang X, Qi X, et al. Androgen-responsive circular RNA circSMARCA5 is up-regulated and promotes cell proliferation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(3):1217-23.
61. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003;1(12):882-91.
62. Zaman MS, Chen Y, Deng G, Shahryari V, Suh SO, Saini S, et al. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010;103(2):256-64.
63. Sathyanarayanan A, Chandrasekaran KS, Karunagaran D. microRNA-145 modulates epithelial-mesenchymal transition and suppresses proliferation, migration and invasion by targeting SIP1 in human cervical cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017;40(2):119-31.
64. Kou B, Gao Y, Du C, Shi Q, Xu S, Wang CQ, et al. miR-145 inhibits invasion of bladder cancer cells by targeting PAK1. *Urol Oncol*. 2014;32(6):846-54.
65. Dip N, Reis ST, Srougi M, Dall'Oglio MF, Leite KR. Expression profile of microRNA-145 in urothelial bladder cancer. *Int Braz J Urol*. 2013;39(1):95-101; discussion 2.
66. Dong R, Liu X, Zhang Q, Jiang Z, Li Y, Wei Y, et al. miR-145 inhibits tumor growth and metastasis by targeting metadherin in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(21):10816-29.
67. Xu WX, Liu Z, Deng F, Wang DD, Li XW, Tian T, et al. MiR-145: a potential biomarker of cancer migration and invasion. *Am J Transl Res*. 2019;11(11):6739-53.
68. Iscaife A, Reis ST, Morais DR, Viana NI, da Silva IA, Pimenta R, et al. Treating metastatic prostate cancer with microRNA-145. *Apoptosis*. 2018;23(7-8):388-95.
69. Ho JS, Ma W, Mao DY, Benchimol S. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. 2005;25(17):7423-31.

70. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3207-12.
71. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):828-51.
72. Gomes SE, Simões AE, Pereira DM, Castro RE, Rodrigues CM, Borralho PM. miR-143 or miR-145 overexpression increases cetuximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in human colon cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(8):9368-87.
73. Liang Y, Sun R, Li L, Yuan F, Liang W, Wang L, et al. A Functional Polymorphism in the Promoter of MiR-143/145 Is Associated With the Risk of Cervical Squamous Cell Carcinoma in Chinese Women: A Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(31):e1289.
74. Kent OA, Fox-Talbot K, Halushka MK. RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene*. 2013;32(20):2576-85.

APÊNDICE

VANESSA R. GUIMARÃES

Apresentou trabalho científico na sessão **CIÊNCIA BÁSICA** com o título **O PAPEL DO MICRORNA 145 NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA METASTÁTICO EM MODELO IN VIVO.**, no dia **26/08/2017** às **11:00:00 13:00:00**.

Com o autor principal **VANESSA R. GUIMARÃES** e os co-autores **ALEXANDRE ISCAIFE; SABRINA T. REIS; NAYARA I. VIANA; RUAN C. A. PIMENTA; DENIS REIS MORAIS; MIGUEL SROUGI; KATIA RAMOS MOREIRA LEITE.**

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 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

Certificamos que

O trabalho intitulado **“O papel do microRNA 145 no tratamento do câncer de próstata metastático em modelo in vivo”** foi premiado como o melhor trabalho científico na categoria **APRESENTAÇÃO ORAL PÓDIUM**, apresentado durante o **XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE UROLOGIA**, de 26 a 29 de agosto de 2017, no Centro de Eventos de Fortaleza-CE.

Autores:

Vanessa R. Guimarães; Alexandre Iscaife; Sabrina T. Reis; Nayara I. Viana; Ruan C. A. Pimenta; Denis Reis Moraes; Miguel Srougi; Katia Ramos Moreira Leite.

Fortaleza, 29 de agosto de 2017.

Archimedes Nardozza Jr.
Archimedes Nardozza Jr.
Presidente da
Sociedade Brasileira de Urologia 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

This hereby certifies that

Vanessa Ribeiro Guimarães

presented the poster:

Treating metastatic, castration-resistant prostate cancer with MicroRNA 145 – in vivo study.

Vanessa Ribeiro Guimarães, Alexandre Iscaife, Sabrina Thalita dos Reis, Nayara Izabel Viana, Ruan Cesar Aparecido Pimenta, Denis Reis Morais, Juliana Alves de Camargo, William Carlos Nahas, Miguel Srougi, Katia Ramos Moreira Leite

during the
XXII International Congress of Genetics (ICG),
in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, September 10th to 14th, 2018.

Márcia Margis-Pinheiro
Márcia Margis-Pinheiro
President of the SBG
Secretary General of the ICG 2018

Phillip Batterham
Phillip Batterham
President of the
International Genetics Federation

Certificamos que o trabalho científico
na modalidade **Apresentação Oral (Pódium)**,

intitulado **O EFEITO DO MICRORNA 100 E DO ANTI MICRORNA 100 E DE SEUS GENES ALVO NO CANCER DE PROSTATA METASTATICO EM MODELO IN VIVO.**

dos autores: **Vanessa Ribeiro Guimarães, Alexandre Iscaife, Sabrina Thalita Reis, Nayara Izabel Viana, Ruan Pimenta, Juliana Alves Camargo, Denis Reis Moraes, Miguel Srougi, William Carlos Nahas, Katia Ramos Moreira Leite,**

foi submetido e aprovado no XXXVII Congresso Brasileiro de Urologia, realizado no período de 24 a 27 de agosto de 2019,
no Expo Unimed Curitiba.

Curitiba, 27 de agosto de 2019.

Sebastião Westphal
Presidente da SBG Gestão 2018/2019

Gustavo Franco Carvalho
Presidente da Comissão Científica

GENÉTICA 2019

17 a 20 de setembro de 2019
Hotel Monte Real Resort - Águas de Lindóia - SP

65th Brazilian Congress of Genetics

CERTIFICADO

Certificate of poster presentation

This hereby certifies that

Vanessa Ribeiro Guimarães

presented the poster:

The effect of microRNA 100 and anti microRNA 100 and their target genes in metastatic prostate cancer.

Autores: Guimarães, V.R. ; Iscaife, A. ; Reis, S.T. ; Viana, N.I. ; Pimenta, R.C.A. ; Moraes, D.R. ; Camargo J.A. ; Nahas, W.C. ; Srougi, M. ; Leite, K.R.M.

during the

**Genética 2019,
in Hotel Monte Real Resort, Águas de Lindóia, SP**

Márcio de Castro Silva Filho
Presidente da SBG

Antonio Mateo Solé Cava
Primeiro Secretário da SBG