

VITÓRIA GHAZARIAN NUNES

Transfecção celular de anti-miR-21 aplicada em linhagem de carcinoma renal de células claras metastáticas

SÃO PAULO

2023

VITÓRIA GHAZARIAN NUNES

Transfecção celular de anti-miR-21 aplicada em linhagem de carcinoma renal de células claras metastáticas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
Programa de Urologia
Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos
Reis Faria

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Vitória Ghazarian

Transfecção celular de anti-miR-21 aplicada em linhagem de carcinoma renal de células claras metastáticas / Vitória Ghazarian Nunes. -- São Paulo, 2023.

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

Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1. Neoplasias renais 2. Carcinoma de células renais 3. MicroRNA 4. Transfecção 5. Expressão gênica 6. Metástase neoplásica

USP/FM/DBD-466/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais Marlene e Robson, pelo amor incondicional, apoio e por todo trabalho que sempre fizeram por mim, para que eu alcançasse minhas realizações. Todo meu amor e minha eterna gratidão.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus guias que me protegem a cada passo todos os dias.

À Professora Dra. Sabrina Thalita dos Reis, minha orientadora, que me aceitou como aluna, confiou em mim e me deu todo o suporte para realização deste trabalho, com muita dedicação, desde o primeiro dia em que entrei no LIM55 como aluna de Iniciação Científica. Agradeço pelo seu grande exemplo como orientadora, professora, amiga e líder, sempre com muito amor. Obrigada por me aceitar, me ouvir e me permitir realizar esse trabalho que é um passo fundamental na minha vida. Seu trabalho sempre será primordial para o LIM55.

À Professora Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, um grande exemplo de liderança, agradeço por todos os momentos de aprendizado, por compartilhar conosco sua experiência, sempre de braços abertos, agradeço por nos incentivar a buscarmos cada vez mais conhecimento e aprendizados.

Ao Professor Dr. Miguel Srougi, pelo seu incentivo à pesquisa e por nos apoiar em nossos trabalhos no LIM55. Agradeço pelo grande exemplo de humildade, cooperatividade, sabedoria e por compartilhar conosco suas histórias e trajetória de vida.

À Profa. Dra. Maria Helena Bellini do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer (LBCMC) pela doação fundamental da linhagem celular que utilizamos para realizar esse estudo tão importante.

Ao Iran Amorim Silva, técnico do LIM55, sempre disponível a nos auxiliar em todos experimentos, compartilhar sua experiência, e nos ensinar tudo o que for preciso, com muita dedicação.

Ao Dr. Ruan Pimenta, por todos os ensinamentos, choros, risadas, e principalmente pela amizade desde o primeiro dia que entrei no LIM55. Você foi fundamental para minha jornada, sempre dando tudo de si para ajudar a mim e a todos que precisassem no laboratório, sou eternamente grata por tudo que fez por mim. Você sempre será uma peça primordial do LIM55.

À Dra. Juliana Camargo, por todos os ensinamentos, cumplicidade e positividade em momentos difíceis. Seus ensinamentos foram essenciais para o início na minha jornada na pós-graduação, tendo me preparado para ela desde a iniciação científica, obrigada por me acolher e me ensinar tudo o que podia.

À Msc. Vanessa Guimarães, por me receber de braços abertos, desde o primeiro dia, sempre muito carinhosa e disposta a me ajudar em tudo que fosse preciso, com muito amor e dedicação. Obrigada por compartilhar sua amizade e experiência comigo durante todos esses anos.

A todos os funcionários da disciplina de Urologia e, em especial, à secretária da pós-graduação, Elisa Cruz, por toda a ajuda e disponibilidade durante esses anos de Mestrado.

Agradeço a todos os meus amigos do LIM55, alunos de iniciação científica e estagiários: Caroline Mie, Patrícia Rodrigues, Poliana Romão, Nayara Viana, Gabriel Arantes, Vinícius Genuino, Karina Silva, Marina Violini, Caroline Chiovatto, Giovanna Tamarindo, Giovana Caetano, Luana Pereira e Feres Camargo, que me auxiliaram na realização deste trabalho todos os dias, nos experimentos, nos momentos bons e

ruins. Serei eternamente grata pela amizade, cumplicidade e pela contribuição com este projeto.

Agradeço a todos os meus familiares, em especial meus pais: Marlene Ghazarian e Robson Nunes, por todo o amor, apoio, ensinamentos, exemplos e todo o esforço que sempre fizeram e fazem por mim e pela família, sempre com muito carinho e dedicação. Agradeço por me aceitarem apoiarem minhas decisões e escolhas. A vocês, minha eterna gratidão.

Essa dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa 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

1.0 Introdução	1
1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco para Carcinoma de Células Renais	2
1.2 Carcinoma Renal de Células Claras	4
1.3 Fatores Prognósticos	5
1.4 Formas de Tratamento	5
1.5 miRNA	7
1.6 Anti-miRNA	10
2.0 Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3.0 Metodologia	14
3.1 Cultura Celular	15
3.2 Ensaio de Transfecção	15
3.3 Ensaio de migração pós transfecção de anti-miR-21 (wound healing)	16
3.4 Ensaio de imunofluorescência	17
3.5 Extração de RNA Total	18
3.6 Transcrição Reversa	19
3.7 Análise de Expressão do miRNA-21 por PCR em Tempo Real quantitativo	20
3.8 Análise Estatística	21
4. Resultados	22
4.1 Padronização do Ensaio de Transfecção para anti-miR-21	23
5. Discussão	28
6. Conclusão	34
7. Referências Bibliográficas	36

Tabela 1. Reagentes utilizados para a transfecção do anti-miR-21 e scramble 16

Tabela 2. Sondas e ensaios a serem utilizados no estudo21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Histologia dos tipos de neoplasias renais humanas, sua incidência e genes correspondentes3
- Figura 2.** Imagem representativa de tumores esporádicos e hereditários4
- Figura 3.** Imagem Ilustrativa da biogênese dos miRNAs..... 8
- Figura 4.** Anti-miR associado ao complexo RISC atuando na inibição do miR 11
- Figura 5.** Gráfico representando estatisticamente a diferença entre as células da linhagem Caki-1 transfectadas com anti-miR-21, Scramble e o controle. Observamos que houve diminuição estatística significativa entre as células transfectadas com anti-miR-21 em relação ao Scramble ($p=0,0171$) e ao grupo Controle ($p=0.0008$)..... 23
- Figura 6.** Representação estatística da expressão dos genes alvos do miR-21 após o tratamento com anti-miR-21. A) Demonstração gráfica do aumento da expressão do gene supressor de tumor RECK em relação ao controle ($p=0.0419$). B) Demonstração gráfica da expressão de MMP9 em relação ao controle e Scramble, os quais não apresentaram..... diferença estatística..... 24
- Figura 7.** Fotos do ensaio de migração da linhagem Caki-1. Realizadas em 0h, 24h, 48h e 72h dos grupos. Controle e Anti-miR-21..... 25
- Figura 8.** Gráficos do ensaio de migração da linhagem Caki-1. (A) Gráfico de migração de 24 horas, não evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0818$). (B) Gráfico de migração de 48 horas, evidenciando diminuição estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0155$). (C) Gráfico de migração de 48 horas, evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0109$) 25
- Figura 9.** Imunofluorescência de MMP9 (verde) e RECK (vermelho) em amostras transfectadas com anti-miR-2 em linhagem celular Caki-1..... 26
- Figura 10.** Gráficos do ensaio de imunofluorescência em linhagem Caki-1. (A) Gráfico de expressão de RECK, evidenciando aumento estatisticamente significativo entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0420$). (B) Gráfico de expressão de MMP9, evidenciando diminuição estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0249$) 27

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR - Carcinoma de Células Renais

CRCC - Carcinoma Renal de Células Claras

ccRCC - Clear Cell Renal Cell Carcinoma

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

cDNA - DNA complementar

VHL - von Hippel-Lindau

VEGFR - Receptor Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SEER - Surveillance, Epidemiology and End Results

TNM - Classification of Malignant Tumors

RECK - Proteína Rica em Cisteína Indutora de Reversão com Motivos Kasal

MMP - Metaloproteinase de Matriz

MEC - Matriz Extracelular

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

OMS - Organização Mundial da Saúde

RNA_m - RNA mensageiro

miR - microRNA

STR - Short Tandem Repeats

LBCMC - Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Resumo

Nunes VG. Transfecção celular de anti-miR-21 aplicada em linhagem de carcinoma renal de células claras metastáticas. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: O Carcinoma de Células Renais, é uma neoplasia maligna que se origina no revestimento do túbulo contorcido proximal e durante décadas, pacientes com câncer renal, em sua maioria, submetem-se à nefrectomia radical ou parcial, devido as poucas opções de tratamento. O miR-21, é um microRNA que já foi associado ao crescimento celular e a inibição da apoptose em alguns tipos de câncer e em relação ao carcinoma de células renais, já foi demonstrada uma superexpressão deste miRNA sendo ainda mais relevante no tipo células claras, onde também já foi associado a um pior prognóstico. O miR-21 possui diversos genes alvos, como RECK e MMP9 que podem atuar em processos carcinogênicos. Com o aumento da exploração de estudos acerca da importância dos miRNAs, novas modalidades terapêuticas são desenvolvidas e, dentre elas, surgem os anti-miRs, que são ácidos nucleicos de cadeia simples modificados e sintetizados para se ligarem especificamente ao miRNA de interesse e inibir essas moléculas, levando ao objetivo da perda de expressão. **OBJETIVOS:** Baseado no potencial oncogênico do miR-21 realizamos a padronização da transfecção de anti-miR-21 em linhagem celular de carcinoma renal de células claras metastáticas (Caki-1), bem como a análise de expressão do miR-21 e de seus genes alvo (RECK e MMP9) pós transfecção. Por fim, realizamos ensaio de migração e imunofluorescência após a transfecção de anti-miR-21. **METODOLOGIA:** Inicialmente, cultivamos a linhagem Caki-1 em meio de cultura McCoy's 5a Medium Modified, suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica e antimicótica, após o cultivo realizamos a transfecção da linhagem com anti-miR-21 e realizamos a análise de expressão do miR e de seus genes alvo por meio da técnica de qPCR. Também realizamos ensaio de migração e imunofluorescência. Por fim, realizamos análise estatística considerando estatisticamente significantes os resultados com p-valor inferior a 5%. **RESULTADOS:** Observamos uma diminuição estatisticamente significativa da expressão do miR-21 demonstrando a eficácia da transfecção, além da diminuição da migração celular. Em relação ao gene alvo RECK, demonstramos um aumento significativo da expressão após a transfecção conforme esperado, entretanto o seu gene alvo MMP9 estava superexpresso após a transfecção, embora sem significância estatística. No ensaio de imunofluorescência evidenciamos aumento de expressão de RECK e diminuição de MMP9. **DISCUSSÃO:** Observamos que com a técnica de transfecção de anti-miR-21, foi possível, efetuar a diminuição significativa da expressão do miR-21, assim como o aumento de expressão gênica e proteica de RECK, bem como diminuição proteica de MMP9, além da importante diminuição do potencial de migração da linhagem. Dessa forma, consideramos nossos resultados *in vitro* promissores, pois o miR-21 pode apresentar um papel importante para a progressão do câncer de rim metastático. Nosso trabalho demonstra que essa ferramenta de transfecção pode contribuir com o *knockdown* do miR-21 no CRCC e retardar sua migração celular. **CONCLUSÃO:** Concluímos que a metodologia utilizada para padronização da transfecção de anti-miR-21 foi efetiva, no qual as células apresentaram diminuição significativa de miR-21 em relação ao controle, assim como um aumento de expressão do seu alvo RECK, porém não apresentou diferença entre MMP9 e controle. Identificamos uma diminuição no potencial de migração da linhagem estudada.

Palavras-chave: Carcinoma Renal de Células Claras, MicroRNA, Transfecção, RECK, MMP9, Metástase

Abstract

Nunes VG. Cell transfection of anti-miR-21 applied to metastatic clear cell renal cell carcinoma lineage. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

INTRODUCTION: Renal cell carcinoma is a malignant neoplasm that originates in the lining of the proximal convoluted tubule. For decades, patients with renal cancer have mostly undergone radical or partial nephrectomy due to the limited treatment options. miR-21 is a microRNA that has already been associated with cell growth and inhibition of apoptosis in some types of cancer. About renal cell carcinoma, overexpression of this miRNA has already been demonstrated and is even more relevant in the clear cell type, where it has also been associated with a worse prognosis. miR-21 has several target genes, such as RECK and MMP9, which can act in carcinogenic processes. As more studies explore the importance of miRNAs, new therapeutic modalities are being developed, including anti-miRs, which are single-stranded nucleic acids modified and synthesized to bind specifically to the miRNA of interest and inhibit these molecules, leading to the objective of loss of expression. **OBJECTIVES:** Based on the oncogenic potential of miR-21, we standardized the transfection of anti-miR-21 in a metastatic clear cell renal carcinoma cell line (Caki-1), as well as analyzing the expression of miR-21 and its target genes (RECK and MMP9) after transfection. Finally, we performed a migration and immunofluorescence assay after anti-miR-21 transfection. **METHODOLOGY:** Initially, we cultivated the Caki-1 strain in McCoy's 5a Modified Medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotic and antimycotic solutions. After cultivation, we transfected the strain with anti-miR-21 and analyzed the expression of miR and its target genes using the qPCR technique. We also carried out migration and immunofluorescence assays. Finally, we conducted a statistical analysis, considering results with a p-value of less than 5% to be statistically significant. **RESULTS:** We observed a statistically significant decrease in miR-21 expression, demonstrating the efficacy of transfection, as well as a decrease in cell migration. Regarding the RECK target gene, we demonstrated a significant increase in expression after transfection, as expected. However, its target gene, MMP9, was overexpressed after transfection, although without statistical significance. The immunofluorescence assay showed increased expression of RECK and decreased expression of MMP9. **DISCUSSION:** We observed that with the anti-miR-21 transfection technique, it was possible to significantly decrease miR-21 expression, as well as increase RECK gene and protein expression and decrease MMP9 protein, in addition to a significant decrease in the cell line migration potential. We, therefore, consider our in vitro results to be promising, as miR-21 may play an essential role in the progression of metastatic kidney cancer. Our work demonstrates that this transfection tool can contribute to the knockdown of miR-21 in CRCC and delay its cell migration. **CONCLUSION:** We conclude that the methodology used to standardize anti-miR-21 transfection was effective in that the cells showed a significant decrease in miR-21 compared to the control, as well as an increase in expression of its target RECK but showed no difference between MMP9 and control. We identified a decrease in the migration potential of the cell line studied.

Keywords: Clear Cell Renal Carcinoma, MicroRNA (miRNAs), Transfection, RECK, MMP9, Metastasis

1. Introdução

1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco para Carcinoma de Células Renais

O Carcinoma de Células Renais (CCR), também conhecido como hipernefroma, adenocarcinoma renal ou tumor de Grawitz, é uma neoplasia maligna que se origina no revestimento do túbulo contorcido proximal. Compreende de 80% a 90% dos tumores renais malignos e 70% a 80% de todos os tumores renais sólidos (1).

O CCR afeta cerca de 300.000 pessoas em todo o mundo a cada ano, dentre as quais 100.000 vão à óbito. Dependendo da extensão da doença, pacientes que apresentam doença localizada ou localmente avançada possuem uma taxa de sobrevida em 5 anos de 20%, já os pacientes que apresentam doença metastática possuem a taxa de sobrevida em 5 anos de 0% a 10%. O CCR é responsável por 5% de todas as doenças malignas, representando o 7º câncer mais comum em homens e o 10º mais comum em mulheres (2).

Segundo os registros do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*), nos Estados Unidos o CCR foi responsável por 14.890 mortes e 81.800 novos casos em 2023 (3). Sendo considerada a 8º neoplasia maligna mais comum e responde por 4,2% dos novos diagnósticos de câncer (4). No Brasil, a incidência estimada é de 7 a 10 casos para cada 100 mil habitantes (5). A estimativa de novos casos nos Estados Unidos considerando diferentes gêneros demonstra que foram esperados 52.360 novos casos de CCR em 2023 para homens. O cenário para mulheres é distinto, com estimativa de 29.440 novos casos (6). O CCR se apresenta mais em homens, entretanto não há uma relação entre a sobrevida de homens e

mulheres, apenas uma diferença significativa dos tumores em fases diferentes da vida (7).

A doença ainda é diagnosticada entre a quinta e a sétima década de vida, embora a média apresente variações ao decorrer dos anos devido ao avanço da tecnologia de diagnóstico (8).

Os fatores de risco potenciais para o CCR incluem fatores epigenéticos como dieta e fatores genéticos como mutações hereditárias. Alguns dos fatores mais significantes são: tabagismo (9, 10), obesidade (11, 12), hipertensão arterial (13-16) e susceptibilidade genética (17, 18).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os subtipos histológicos de CCR incluem células claras (75%), papilares (5%-10%), cromóforo (5%) e oncocitoma (5%), como ilustrado na Figura 1 (19).

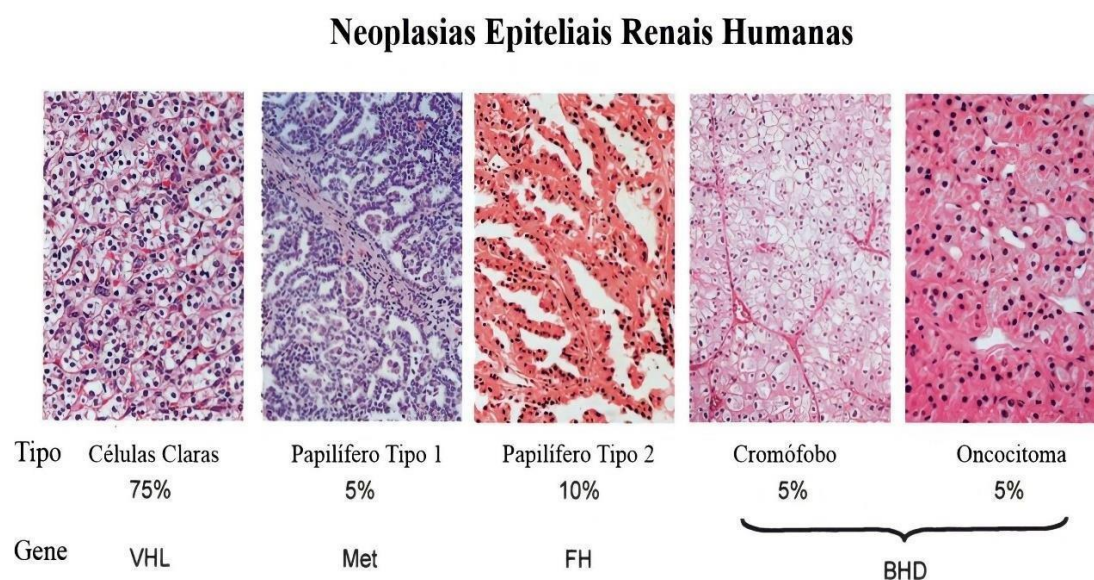


Figura 1. Histologia dos tipos de neoplasias renais humanas, sua incidência e genes correspondentes (20).

1.2 Carcinoma Renal de Células Claras

O Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC) é o tipo mais frequente, correspondendo cerca de 75% dos CCR (21). Esse tipo histológico é relacionado à síndrome hereditária de von Hippel-Lindau (VHL). Tal síndrome é autossômica dominante e acomete 1:36000 nascidos vivos, sendo caracterizada pela presença de hemangiomas de retina, hemangioblastomas de cerebelo e medula espinhal, cistos de pâncreas e rim, tumores do saco angiolinfático, cistoadenoma do epidídimo e feocromocitomas (21, 22). O desenvolvimento da síndrome está diretamente ligado à perda do braço curto do cromossomo 3, além de apresentar mutações germinativas intragênicas, deleções e defeitos de *splicing* em pacientes portadores da síndrome familiar, contrastando a perda do gene por mutação, deleção ou metilação presente em mais de 91% dos CRCC esporádico (Figura 2) (23).

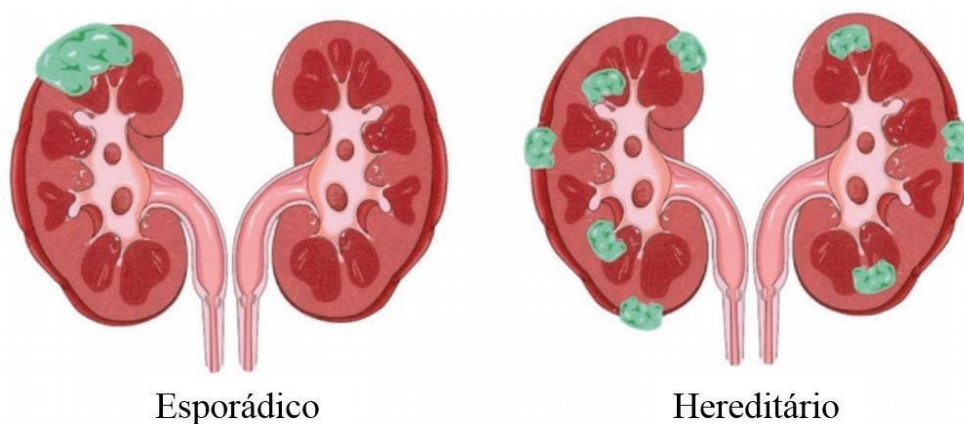


Figura 2. Imagem representativa de tumores esporádicos e hereditários (20).

Na maioria dos CRCC, a expressão do gene VHL é desregulada de maneira semelhante, apresentando em 98% dos casos, deleção do gene, com hipermetilação e mutações pontuais nos 2% restantes. A ativação do receptor VEGFR2 regula, particularmente, o processo de angiogênese, garantindo o fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tumor, estimulando o surgimento de metástases. Além de levar à ativação das vias ERK1/2, AKT, Src e p38 MAPK, importantes para o desenvolvimento tumoral e metástase. Tais vias estão associadas a importantes eventos de angiogênese que incluem: proliferação celular, migração, sobrevivência e permeabilidade vascular (24).

1.3 Fatores Prognósticos

Fuhrman *et al.* realizaram um estudo que determinou quatro graus nucleares para definir os tumores do CRCC. Foram considerados o crescimento do núcleo das células tumorais, irregularidade e proeminência nuclear. Assim, Fuhrman *et al.* evidenciaram que a graduação nuclear é um parâmetro consistente na predição do desenvolvimento de metástase à distância após nefrectomia (25).

A invasão microvascular, está relacionada à recorrência tumoral e progressão da doença. Um estudo demonstrou que 46% dos indivíduos com invasão microvascular desenvolveram recorrência de CRCC (26).

1.4 Formas de Tratamento

Enquanto os CRCC em estágio inicial são tratados principalmente por cirurgia, os CRCC metastáticos são tratados farmacologicamente. Os inibidores de citocinas e de *checkpoint* imunológico são os tratamentos aceitáveis de CRCC, o que sugere que o gerenciamento de respostas inflamatórias é crucial para este tratamento. A inflamação sistêmica tem sido frequentemente reconhecida no CRCC e este é um evento muito importante, por estar associado diretamente ao CRCC em estágio avançado (27). A inflamação intrínseca das células cancerosas facilita a metástase do câncer e a progressão inicial por meio da reconstituição do microambiente tumoral, vigilância imunológica e formação de um nicho pré-metastático (27).

Os inibidores-alvo moleculares, surgem como uma esperança de tratamento da doença em sua forma metastática, a qual é refratária às terapias convencionais. Contudo, seu uso está diretamente relacionado ao melhor entendimento das vias moleculares envolvidas na oncogênese. O futuro da terapia no CRCC metastático segue diretamente para a individualização do perfil molecular de cada paciente e da seleção de terapias específicas individuais (20, 28-32).

Mesmo com esse progresso na última década, existem muitas perguntas sem resposta e caminhos de pesquisa inexplorados. Pesquisas ainda devem ser realizadas, no intuito de desenvolver novas ferramentas para auxiliar na definição do prognóstico e novas moléculas que possam ser alvo de tratamentos que tenham bons resultados em relação à sobrevida do paciente (33), neste sentido nas últimas décadas alguns estudos vêm ressaltando o papel dos miRNAs.

1.5 microRNA

As diferentes formas que pequenas moléculas de RNAs podem assumir estão relacionadas com a supressão da tradução em eucariotos, como estimuladoras de atividade celular, diferenciação, proliferação, indução de apoptose e degradação de RNAm (RNA mensageiro) (34). Tais moléculas são conhecidas como miRNAs (miRs) e, quando maduras, são constituídas por 19 a 25 nucleotídeos. O processo de síntese dos miRs primários (pri-miRNAs) ocorre quando os mesmos são transcritos pela enzima RNA polimerase II, juntamente com precursores de RNA fita simples (alça), que, junto a uma estrutura chamada grampo, formam uma cauda poli A, ligada à região 3'. Após a síntese no núcleo da célula, ocorre a maturação do pri-miRNA em pré-miRNA, que sofre ação de um microprocessador (Drosha-DGCR8), enzimas de RNase-II, que realizam o fenômeno *cropping*, que corresponde a clivagem da capa do pri-miRNA. O pré-miRNA possui aproximadamente 70 nucleotídeos e é transportado para o citoplasma pela enzima Exportina 5. Quando no citoplasma, o pré-miRNA sofre ação da enzima Dicer. Essa enzima cliva a alça formando o miRNA duplex, que contém o miRNA maduro e sua fita complementar de aproximadamente 22 nucleotídeos (35). No complexo silenciador induzido por RNA (RISC), é formada uma das fitas do complexo duplex de miRNA. Tal fita age sobre o RNAm alvo,

causando bloqueio na tradução proteica ou sua degradação. O mesmo miRNA pode agir em mais RNAm alvo com atividades diferentes (Figura 3) (34).

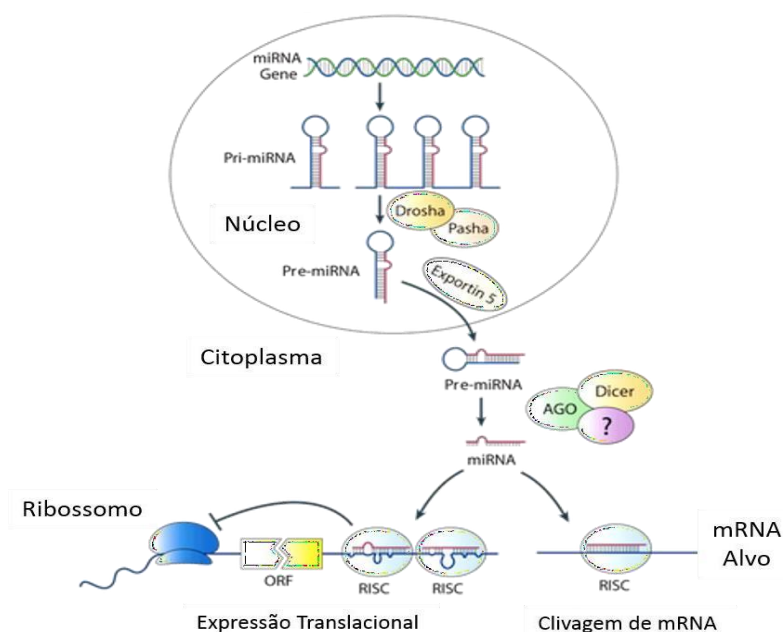


Figura 3. Imagem ilustrativa da biogênese dos miRNAs (34) .

Os miRNAs são mediadores endógenos de silenciamento de RNAm que funcionam para atenuar saídas transcricional e translacional. Assim, podendo regular negativamente alvos transcricionais. Os miRNAs podem interferir funcionalmente com RNAm com múltiplos alvos *in vivo* ou *in vitro* (36).

O miR-21 especificamente, é um miRNA oncogênico regulado positivamente em muitos tumores. Foi identificado que o mesmo está regulado positivamente no CRCC e sua superexpressão é útil para distinguir CRCC de CCR papilar e se correlaciona com a progressão do estágio e grau dos tumores (37). A utilidade clínica do miR-21 como marcador tumoral é especulativa para diversos tipos de câncer e seu efeito na carcinogênese e progressão tumoral foi analisado experimentalmente por Faragalla, H. *et al.*

Intrinsecamente, o miR-21 foi associado à diversas vias moleculares relacionadas ao início e progressão do CRCC, assim podendo desempenhar o papel de alvo terapêutico atraente que possa controlar diversas etapas desta patogênese de forma simultânea (38). Várias moléculas são descritas como alvos para miR-21, como: RECK e MMP9 (38). A proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal (RECK), regulada negativamente, mostrou ser um marcador diagnóstico para CRCC em estágio inicial e para os subtipos de CRCC. GORKA, J. *et al.* observaram uma diminuição significativa na expressão do gene RECK em pacientes com tumores de grau III e IV em comparação com os pacientes com tumores de grau I e II. A proteína RECK regula pelo menos três membros da família MMP (metaloproteinases da matriz): MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP. As proteínas da família MMP desempenham papéis importantes na invasão e metástase e estão associadas à proliferação celular e angiogênese em vários tipos de câncer (39-41).

As MMPs são proteínas pertencentes a uma família de aproximadamente trinta enzimas proteolíticas ou endoproteinases que degradam vários componentes da matriz extracelular (MEC), estando presentes tanto em tecidos normais, nos quais se envolvem no remodelamento da matriz, como em doenças, incluindo o câncer onde promovem a degradação de componentes da MEC, permitindo a migração das células tumorais (42).

1.6 Anti-miRNA

Os miRNAs surgem como reguladores pós transcricionais de enorme relevância em patologias, sobretudo no câncer, encontrados superexpressos ou inibidos em diversos tumores, de maneira tão evidente que esses são classificados como oncomiRs (43). Com o aumento da exploração de estudos acerca da importância dos miRNAs e as associações a doenças, novas modalidades terapêuticas são desenvolvidas e, dentre elas, surgem os chamados inibidores de miRNAs, conhecidos como anti-miRs, que são ácidos nucleicos de cadeia simples modificados e sintetizados para se ligarem especificamente ao miRNA de interesse e inibir essas moléculas, levando ao objetivo da perda de expressão (44).

Os miRNAs exercem a função de regulador pós transcricional, se ligando ao RNA mensageiro juntamente ao complexo RISC. O anti-miR atua justamente nesse processo, na última etapa pré-regulação, guiando o complexo RISC a sítios parcialmente complementares. O anti-miR isola o miRNA maduro em competição com o RNA mensageiro alvo celular, levando à inibição da função do miRNA (Figura 4) (44, 45).

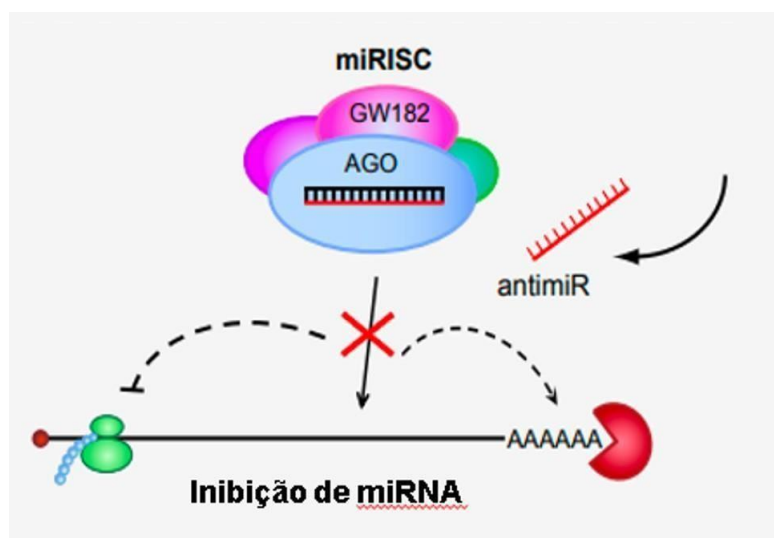


Figura 4. Anti-miR associado ao complexo RISC atuando na inibição do miRNA (44).

Visando as vias de angiogênese, proliferação, migração e apoptose, iremos estudar o impacto da inibição do miR-21 no carcinoma renal de células claras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Realizar a padronização da transfecção de anti-miR-21 em linhagem celular de carcinoma renal de células claras metastáticas (Caki-1).

2.2 Objetivos Específicos

Realizar a análise de expressão do miR-21 e de seus genes alvo (RECK e MMP9) pós transfecção, assim como ensaio de migração celular e ensaio de imunofluorescência.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultura celular

Foi utilizada a linhagem celular Caki-1 de carcinoma renal de células claras metastáticas. Esta que foi doada gentilmente pela Profa. Dra. Maria Helena Bellini do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer (LBCMC). As células Caki-1 foram acondicionadas em placas de cultura de 25cm² contendo meio de cultura McCoy's 5a Medium Modified, 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 na estufa para culturas de células contendo atmosfera úmida composta por 95% de ar e 5% de CO₂ a temperatura de 37°C. A linhagem foi autenticada pelo método de STR (*short tandem repeats*) em um serviço disponível pela rede premium da FMUSP.

3.2 Ensaio de transfecção

As células foram transfectadas com aproximadamente 50 nM de anti-miR-21, assim como o controle negativo precursor de mRNAs (Ambion, Austin, TX, USA). Os pré-microRNAs e seus controles foram diluídos em 50µL de meio OPTI-MEM I em diferentes tubos em uma concentração final de 20 nM (2,5 µL da solução de 20 µM). A seguir, 1,5 µL dos agentes de transfecção Lipofectamina RNAiMax (INVITROGEN, Calrsbad, CA, USA) foram diluídos em 50µL de meio OPTI-MEM I. Os reagentes utilizados nesta fase do estudo estão apresentados na (Tabela 1). Os anti-miRs são moléculas fita simples quimicamente modificadas e sintetizadas para se ligarem especificamente no miRNA de interesse e inibirem miRNA endógeno.

Tabela 1. Reagentes utilizados para a transfecção do anti-miR-21 e *scramble*.

Reagentes	Identificação dos Ensaios
Anti-miR-21	MH10206
Pré-miR-Precursor Negative Control	AM-17010 (AMBION)
OPTI-MEN I Reduced Serum Medium	31985-062 (Invitrogen)
Lipofectmina-RNAiMAX	13778-150 (Invitrogen)

As diluições do anti-miR e do agente de transfecção foram combinadas, misturadas e posteriormente incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para formação do complexo de transfecção. As células em suspensão foram transferidas e semeadas na cavidade dos poços em placa de cultura de 12 poços para sobreposição dos complexos de transfecção em um volume de 900 μ L de meio de cultura contendo 2×10^4 células/poço. A seguir foram dispensados 100 μ L do complexo de transfecção em cada poço, onde cada amostra do complexo de transfecção foi configurada e marcada de acordo com seus controles. Os experimentos foram realizados em triplicata. A confirmação de eficiência de transfecção foi realizada por qPCR.

3.3 Ensaio de migração pós transfecção de anti-miR-21 (wound healing)

Para avaliar o ensaio de migração, as células Caki-1 foram transferidas para placas de 12 poços com 2×10^4 células /poço. Após atingir a confluência, foi realizada a “ferida” (risco), com ponteira de 200 μ L com auxílio de régua. As células foram lavadas e os meios McCoy's 5a Medium Modified sem FBS foram adicionados a cada poço. A placa foi fotografada às 0h, 24h, 48h e 72h. As imagens foram analisadas com auxílio do software NIS Elements D 3.1 (Nikon). A porcentagem de fechamento das feridas foi calculada com base na área de risco em 0h, 24h, 48h e 72h usando a seguinte fórmula: $(A \text{ inicial} - A \text{ final}) / (A \text{ inicial}) \times 100 = \% \text{ de fechamento da ferida}$ (46).

3.4 Ensaio de Imunofluorescência

As células foram plaqueadas em lamínulas de 18mm em placas de 12 poços. 24 horas depois, foi realizada a fixação com paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos. Em seguida foi feita a lavagem com PBS 1x 3 vezes de 5 minutos. Foi feito o bloqueio com BSA 3% por 30 minutos, com posterior incubação com o anticorpo primário para MMP9, *overnight* em BSA 1% em PBS na concentração de 1:200 de anticorpo primário. No dia seguinte, foi feita a lavagem com PBS 3 vezes de 5 minutos e incubação com anticorpo secundário *rabbit alexa flúor 488* de cor verde por 2 horas. Após essa incubação, foi feita novamente a lavagem com PBS por 3 vezes de 5 minutos e novamente o bloqueio com BSA 3%. Após essa etapa, foi feita a incubação *overnight* com o segundo anticorpo primário RECK em solução de BSA 1% em PBS. No dia seguinte, foi feita a lavagem com PBS por 3 vezes de 5 minutos e as lamínulas foram retiradas da placa de 12 poços e adicionadas a lâminas de

microscopia com meio de montagem contendo DAPI. Esse protocolo foi feito com proteção à luz.

3.5 Extração de RNA total

Para extração de RNA e miRNA foi utilizado o kit de isolamento miRVana®miRNA (Ambion, Austin, Tx), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA, incluindo os miRNAs, e por isso o utilizamos para a extração do RNA das células. Foram adicionados 500µL do tampão de lise e 10% do volume total de aditivo para homogeneização na linhagem celular e logo após os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 500µL de fenol clorofórmio, e as amostras agitadas em vortex e centrifugadas na velocidade máxima (13.000rpm) 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 96% à temperatura ambiente. A solução então foi passada para o filtro (coluna GFX) e as amostras novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Neste momento, o filtro contém RNA. Nos 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 100µL de água livre de RNase pré-aquecida a 95°C, no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente o RNA foi centrifugado e armazenados a -20°C até sua utilização. A pureza e concentração do

RNA são mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (260/280nm) (ND1000, Wilmington, EUA).

3.6 Transcrição Reversa

O DNA complementar (cDNA) do miRNA foi obtido usando TaqMan® miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 500ng/μl de miRNA foi diluída em 20μl de água. Deste volume, 3μl são submetidos à transcrição reversa, onde foram adicionados 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 nuclease e 1μl de primer stem-loop com uma sequência específica para os miRNA, totalizando 10μl de cDNA. A reação foi realizada no equipamento PCR Veriti® (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C e 5 min a 85°C.

A síntese do cDNA do RNA foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems) que utiliza a Transcriptase reversa Multiscribe™ e primers randômicos. O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20μl e concentração de 500μl/ng. 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 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min) no termociclador Vertiti® (Applied Biosystems). Ao final das reações ambos os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso.

3.7 Análise de expressão do miRNA-21 por PCR em tempo real quantitativo.

As expressões dos RNAs estudados foram avaliadas a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no sistema ABI 7500 Fast RT-PCR no modo standard utilizando-se Master Mix PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA). As expressões dos RNA individuais foram analisadas usando primers de sequência específicas. 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 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 conforme tabela 2 e a sonda (com a marcação), 5µL do TaqMan Master Mix, 3,5µL de água nucleasse free 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. A B2M foi usada como controle endógeno na análise da expressão gênica, e RNU48 como controle endógeno para o miRNA (Tabela 2). Os dados foram analisados usando o Software DataAssist (Applied Biosystems, EUA). Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata. O nível de expressão dos genes alvo foram obtidos pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT (62).

Tabela 2. Sondas e ensaios a serem utilizados no estudo.

miRNA e Genes	Ensaio	Marca
miR-21	000397	Applied Biosystems
RNU48	001006	Applied Biosystems
RECK	Hs01019179_m1	Applied Biosystems
MMP-9	Hs00234579_m1	Applied Biosystems
B2M	Hs00187842_m1	Applied Biosystems

3.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão para as variáveis quantitativas. Variáveis categóricas apresentadas como porcentagens. A comparação entre os grupos foi realizada através de Test t de Student e Mann Whitney quando comparamos duas variáveis homogêneas ou não respectivamente.

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0. Em toda análise foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Padronização do Ensaio de Transfecção para anti-miR-21

Plaqueamos 20.000 células por poço da linhagem Caki-1 em uma placa de 12 poços. No dia seguinte, com essas células aderidas, realizamos a transfecção com anti-miR-21 para avaliação dos níveis de expressão.

Ao avaliarmos a expressão por qPCR do miR-21 na linhagem transfectada com anti-miR, observamos uma diminuição na linhagem Caki-1 quando comparada às células sem transfecção, observamos diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas em relação ao Scramble e ao Controle (Figura 5).

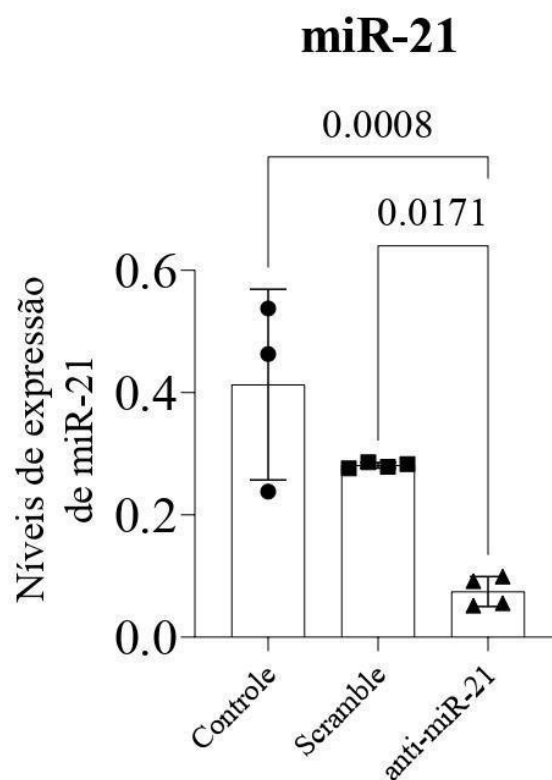


Figura 5. Gráfico representando estatisticamente a diferença entre as células da linhagem Caki-1 transfectadas com anti-miR-21, Scramble e o controle. Observamos que houve diminuição estatística significativa entre as células transfectadas com anti-miR-21 em relação ao Scramble ($p=0,0171$) e ao grupo Controle ($p=0.0008$).

Em relação à expressão dos genes alvo, observamos aumento significativo da expressão de RECK, entretanto não observamos diferença estatística em relação ao gene MMP9 (Figura 6).

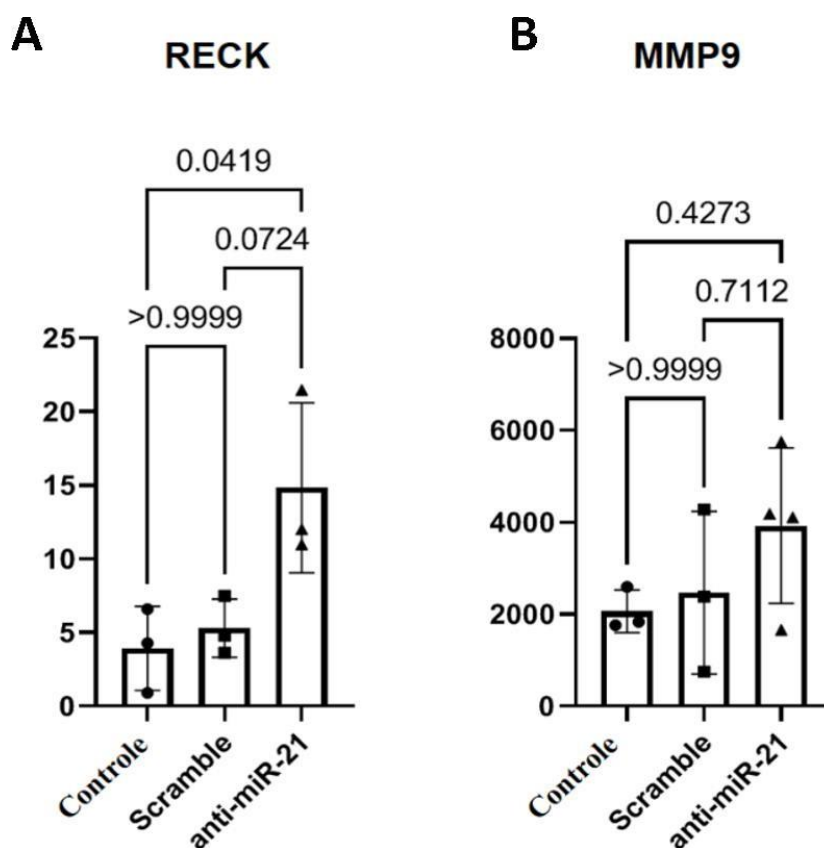


Figura 6. Representação estatística da expressão dos genes alvos do miR-21 após o tratamento com anti-miR-21. A) Demonstração gráfica do aumento da expressão do gene supressor de tumor RECK em relação ao controle ($p=0.0419$). B) Demonstração gráfica da expressão de MMP9 em relação ao controle e Scramble, os quais não apresentaram diferença estatística.

Realizamos o ensaio de migração celular para observar uma possível alteração neste processo celular e com base nas fotos que tiramos em 0h, 24h, 48h e 72h dos poços com células transfectadas e com células sem transfecção, conseguimos identificar um fechamento significativo da “ferida” nos grupos de 48h e 72h, os quais apresentaram uma diminuição importante deste processo celular (Figura 7 e 8).

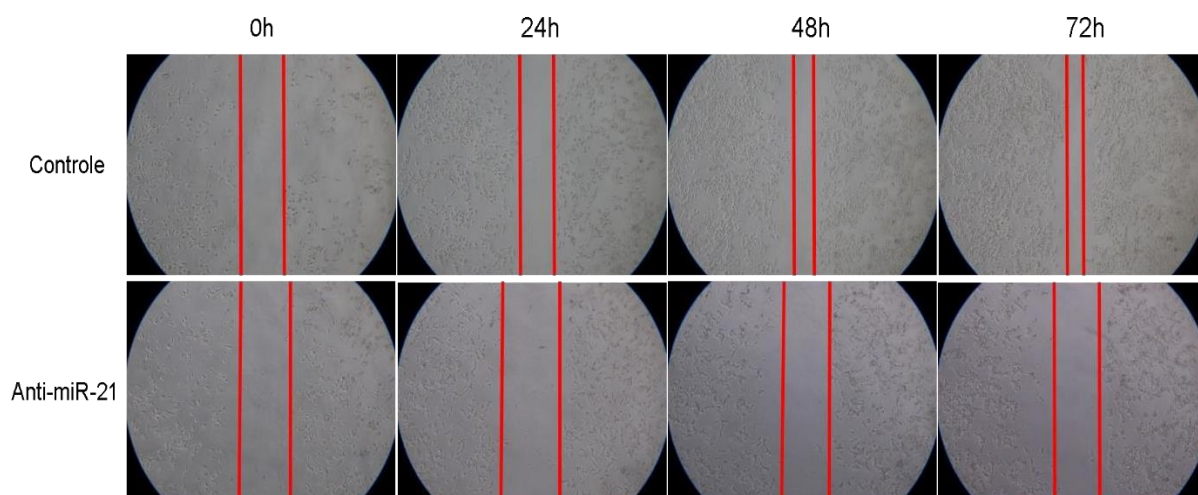


Figura 7. Fotos do ensaio de migração da linhagem Caki-1. Realizadas em 0h, 24h, 48h e 72h dos grupos Controle e Anti-miR-21.

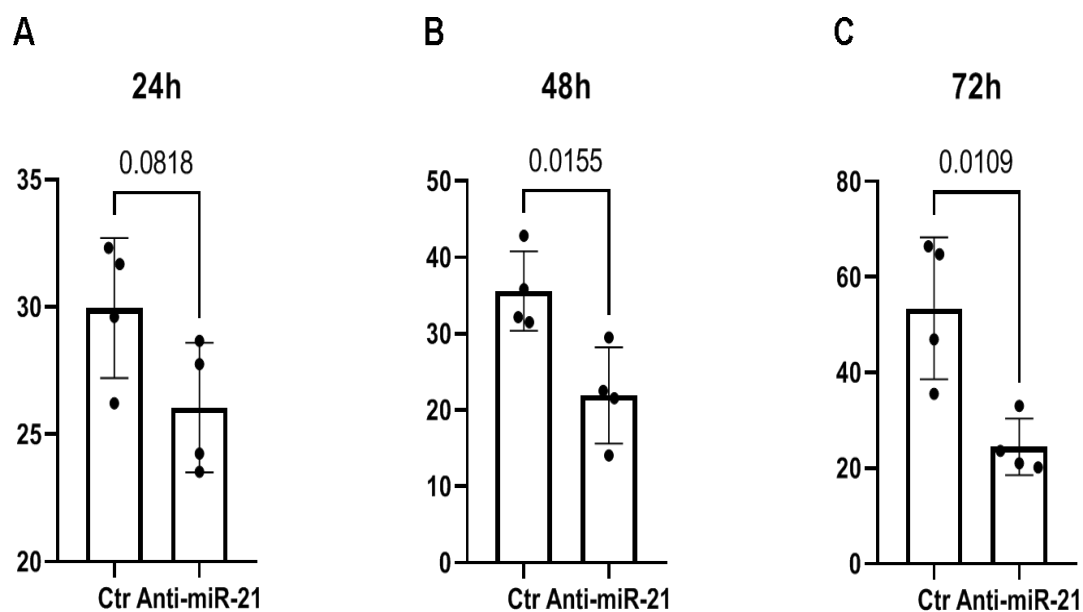


Figura 8. Gráficos do ensaio de migração da linhagem Caki-1. (A) Gráfico de migração de 24 horas, não evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0818$). (B) Gráfico de migração de 48 horas, evidenciando diminuição estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0155$). (C) Gráfico de migração de 48 horas, evidenciando diminuição estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0109$).

Realizamos o ensaio de imunofluorescência na linhagem Caki-1, na qual identificamos aumento significativo de RECK em relação ao controle e diminuição significativa de MMP9 em relação ao controle (Figura 9 e 10).

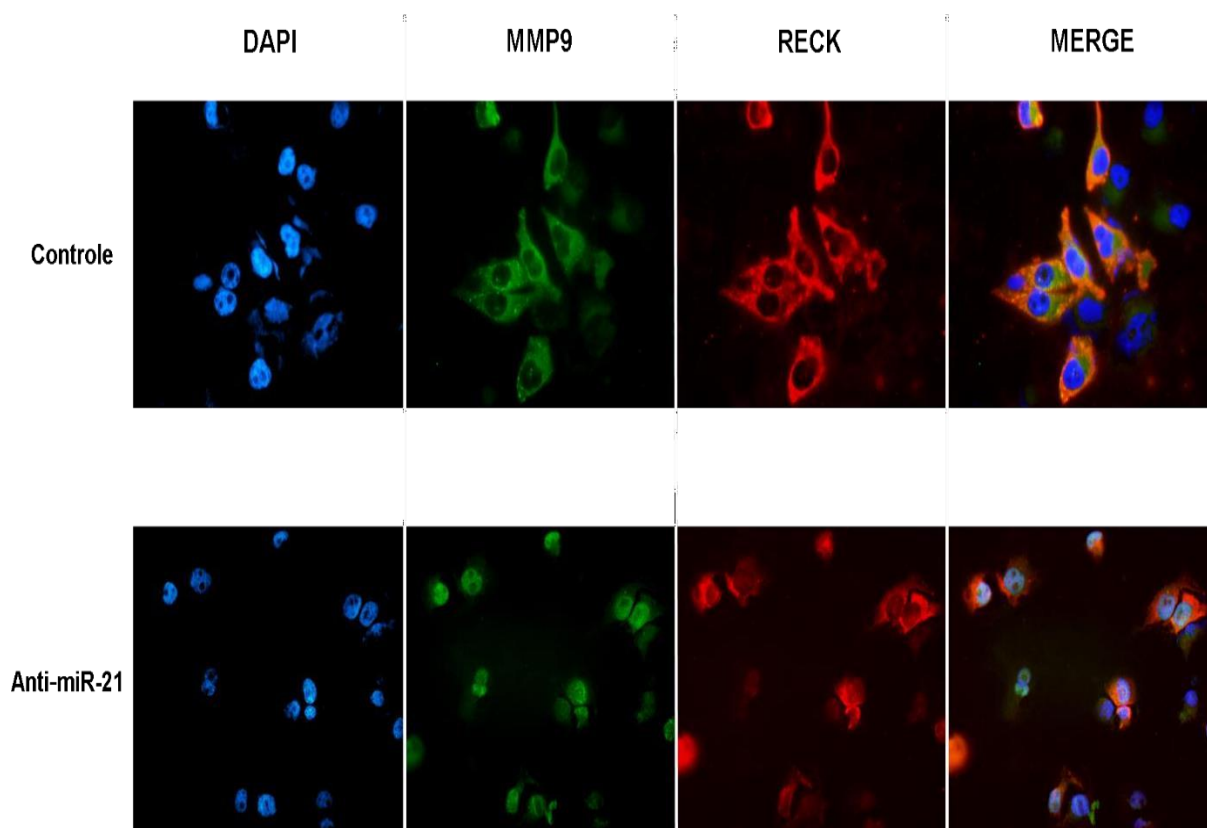


Figura 9. Imunofluorescência de MMP9 (verde) e RECK (vermelho) em amostras transfectadas com anti-miR-21 em linhagem celular Caki-1.

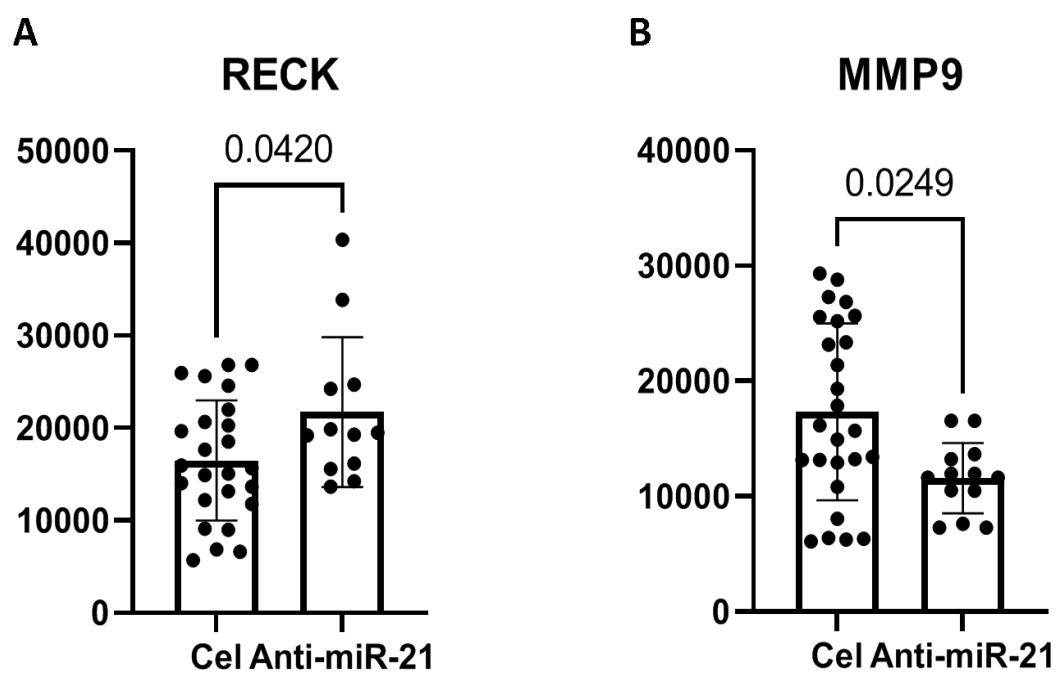


Figura 10. Gráficos do ensaio de imunofluorescência em linhagem Caki-1. (A) Gráfico de expressão de RECK, evidenciando aumento estatisticamente significativo entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0420$). (B) Gráfico de expressão de MMP9, evidenciando diminuição estatisticamente significativa entre os grupos Anti-miR-21 e controle ($p=0.0249$).

5. Discussão

O estudo dos miRNAs tem sido destaque em múltiplas pesquisas que discutem a relevância desses pequenos RNAs não codificantes em diversas neoplasias, sendo encontrados significativamente superexpressos ou subexpressos em diversos tumores, quando superexpressos são denominados oncomiRs. Cada miRNA pode regular diversos genes-alvos distintos, e sua inibição ou expressão aumentada pode acarretar efeitos oncogênicos (47).

No presente estudo delineamos uma pesquisa acerca da avaliação da inibição do miR-21 em uma linhagem de carcinoma renal de células claras metastáticas, pois este oncomiR é evidenciado como forte candidato a biomarcador de diagnóstico, tratamento e prognóstico, como citado por Yuhe Guo, *et al.* (48).

O miR-21 é encontrado hiperexpresso no CRCC, estando relacionado com o pior prognóstico da doença. O miR-21 exerce uma função regulatória, regulando diretamente RECK, um gene supressor de tumor, que por sua vez regula a MMP9, uma metaloproteinase de matriz, envolvida em processos como invasão celular, remodelamento da matriz e angiogênese em tumores (39).

Em nosso laboratório, já foram realizados estudos prévios sobre o papel da RECK, MMP-9 e miR-21 no câncer de próstata (49). Dessa forma, decidimos aplicar esse conhecimento e investigar a relevância deste oncomiR no carcinoma renal de células claras, aqui em nosso estudo realizamos uma transfecção com um antagomiR sintético para suprimir a ação do miR-21, numa tentativa de diminuir os efeitos tumorigênicos.

Foram transfectadas células de CRCC utilizando o anti-miR-21, que atua como um inibidor do miR-21, servindo de instrumento em estudos de perda de função. O miR-21 apresentou uma subexpressão em relação aos grupos controles

não tratados com anti-miR-21, demonstrando um resultado relevante e esperado no presente estudo sobre a eficácia da transfecção. Posteriormente, após a validação da transfecção pela técnica de qPCR, foi avaliada a expressão de genes alvo do miR-21, denominado RECK e também do gene MMP9 por ser um alvo direto de RECK. No CRCC, o gene supressor de tumor RECK encontra-se expresso em baixos níveis, já a MMP9 em níveis mais elevados. Após o tratamento com anti-miR-21, houve a reversão à nível de expressão da RECK, alvo direto do miR-21 e regulador de invasões tumorais, resultando em uma superexpressão. Por sua vez, não conseguimos demonstrar uma diminuição de MMP9, como esperávamos inicialmente, podendo sugerir um mecanismo regulatório da célula de tentar aumentar a expressão de MMP9 devido ao aumento da expressão de seu inibidor RECK (39).

Foi visto que o miR-21 está envolvido no crescimento celular e na inibição da apoptose e em relação ao CCR, a expressão deste miRNA foi descrita como significativamente maior em células claras e subtipos papilares de CCR em comparação ao cromóforo, oncocitoma e tecidos renais saudáveis. Além disso, a análise de predição de alvo realizada por Faragalla, H. *et al.*, evidenciou alguns alvos de miR-21 preditos com uma potencial associação direta com a patogênese de CRCC, como o supressor de tumor da doença de VHL, a família de proteínas egl-nine, fosfatase e homólogo e tensina e esclerose tuberosa 1 e 2 (38).

A inativação de tais supressores de tumor pelo miR-21 pode desencadear o aumento da tumorigenicidade. Ainda neste estudo foi demonstrado que este miRNA pode servir como um marcador prognóstico para o CRCC. Foi identificado um aumento estatístico significativo na expressão de miR-21 nos estágios finais do tumor (estágios II e III) em comparação com o estágio inicial (estágio I). Um maior

nível de expressão de miR-21 também foi associado a maiores graus e tamanhos de tumor (38).

Além de todas as funções apresentadas anteriormente, o miR-21 também pode apresentar papel de regulador chave para algumas moléculas, como na inativação do supressor de tumor da VHL, um evento precoce presente na patogênese do CRCC, que pode ocorrer devido à superexpressão do miR-21 (38).

Tara Akhtarkhvari *et al.*, propuseram uma revisão da literatura sobre a subexpressão do miR-21 como uma estratégia promissora para reverter a resistência à quimioterapia. Os mesmos relatam que o miR-21 está envolvido em todas as fases da carcinogênese em diversos tipos de câncer e apontaram um estudo em que a aplicação de anti-miR-21 poderia superar a resistência a medicamentos em linhagem celular de câncer de cólon, além disso também evidenciaram que ainda não há ensaios clínicos definidos sobre esta manipulação do miR-21 para reverter a resistência à quimioterapia (50).

Marine Goujon *et al.*, utilizaram 52 amostras primárias de pacientes acometidos por CRCC e propuseram algumas evidências de que o miR-21 representa um alvo terapêutico atraente no câncer renal, dado o seu papel central e multifacetado nos eventos moleculares e celulares associados à progressão do câncer renal e à resistência aos medicamentos, considerando o perfil de doença metabólica que o câncer de rim apresenta (51).

Em nosso estudo, inicialmente tentamos padronizar a transfecção de anti-miR-21 em linhagem celular de CRCC metastático, a Caki-1. Ao avaliarmos o *knockdown* por transfecção de anti-miR-21 observamos resultados promissores na diminuição da expressão deste oncomiR nesta linhagem metastática.

Entretanto, ao avaliar a expressão dos genes alvo não identificamos diferença estatística na expressão de MMP9, o que consideramos um resultado controverso, porém ainda sim identificamos o aumento de expressão de RECK, correspondendo aos resultados esperados. Consideramos este resultado relevante pois a literatura demonstra que a diminuição da expressão de RECK está associada ao aumento do grau dos tumores de CRCC (39).

Após essa etapa, realizamos ensaios de migração celular, para verificar se as células transfectadas para inibição de miR-21 perdem ou reduzem sua capacidade migratória, e observamos uma diminuição significativa de tal mecanismo celular. Realizamos também o ensaio de imunofluorescência, para verificar a presença de RECK e MMP9 nas células com transfecção e sem transfecção e observamos um aumento significativo de RECK e uma diminuição significativa de MMP9 nos grupos tratados com transfecção de anti-miR-21, em relação às células sem transfecção.

Consideramos nossos resultados *in vitro* promissores, pois o miR-21 pode apresentar um papel importante para a progressão do câncer de rim metastático. Além disso, nossos achados corroboram com dados da literatura que mostram que o miR-21 foi aumentado em amostras de CRCC, sugerindo que o miR-21 é um regulador crítico no desenvolvimento do CRCC humano (53). Além disso, muitos autores relatam que o miR-21 diminuído está associado à diminuição da progressão de outros tipos de câncer, como o câncer de ovário, leucemia mieloide crônica e carcinoma de nasofaringe (54-56).

Ao longo do período de desenvolvimento do projeto encontramos algumas limitações, como a dificuldade a princípio de adquirirmos a linhagem celular CAKI-1, dificuldades na fase de padronização da transfecção, assim como na validação, na

qual realizamos diversas repetições para obtermos um resultado efetivo, ressaltamos que parte da execução desta dissertação aconteceu durante a pandemia onde houve não só atrasos na entrega dos insumos como também rodízio de acadêmicos em nosso laboratório. Utilizamos uma única linhagem celular, pois tivemos grande dificuldade de obter outra linhagem e quando recebemos a doação a mesma não foi efetiva em seu cultivo em nosso laboratório. Em relação aos achados de expressão do miR-21 e seus genes alvos, tivemos que realizar diversas repetições das análises devido à alta variabilidade de expressão do nosso controle. Algumas limitações se deram por fatores financeiros, inicialmente gostaríamos de comprar mais kits para avaliação de outros genes alvo e também realizar outros experimentos celulares para avaliar o impacto da inibição deste miRNA, o que não foi possível dentro do nosso prazo. Porém, ressaltamos que este projeto continuará sendo desenvolvido em nosso laboratório com outras técnicas de inibição e avaliando de modo mais significativo o impacto biológico da mesma.

Podemos então concluir que com a técnica de transfecção de anti-miR-21, foi possível, efetuar a diminuição deste oncomiR, assim como o aumento de seu principal gene alvo RECK. Alguns autores relatam que futuramente, com mais estudos, poderemos projetar novos inibidores como alvo, para tratamento do câncer (57). Nosso trabalho demonstra que essa ferramenta de transfecção pode contribuir com o *knockdown* do miR-21 no CRCC e retardar sua migração celular.

6. Conclusão

Concluimos que a metodologia utilizada para padronização da transfecção de anti-miR-21 foi efetiva, pelos resultados promissores da expressão do miR-21 pela análise, no qual as células transfectadas com anti-miR-21 apresentaram diminuição estatisticamente significativa em relação às células não transfectadas.

As células transfectadas com anti-miR-21 apresentaram um aumento de expressão gênica do seu principal alvo direto RECK, porém não apresentou diferença estatística entre MMP9 e controle, na linhagem Caki-1.

A transfecção de anti-miR-21 diminuiu a migração celular na linhagem Caki-1, além de apresentar um aumento significativo da expressão proteica de RECK por ensaio de imunofluorescência, bem como a diminuição da expressão de MMP9 pelo mesmo ensaio.

7. Referências Bibliográficas

1. Hancock SB, Georgiades CS. Kidney Cancer. *Cancer J*. 2016;22(6):387-92.
2. Linehan WM, Schmidt LS, Crooks DR, Wei D, Srinivasan R, Lang M, et al. The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer Discov*. 2019;9(8):1006-21.
3. Cancer Stat Facts: Kidney and Renal Pelvis Cancer SEER2020 [Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>].
4. Xu W, Atkins MB, McDermott DF. Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2020;17(3):137-50.
5. Câncer INd. Ministério da Saúde amplia tratamento para câncer renal: INCA; 2019 [Available from: <https://www.inca.gov.br/noticias/ministerio-da-saude-amplia-tratamento-para-cancer-renal>].
6. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1):17-48.
7. Lane BR, Babineau D, Kattan MW, Novick AC, Gill IS, Zhou M, et al. A preoperative prognostic nomogram for solid enhancing renal tumors 7 cm or less amenable to partial nephrectomy. *J Urol*. 2007;178(2):429-34.
8. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2010;7(5):245-57.
9. (US) OotSG, (US) OoSaH. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. 2004.
10. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005;114(1):101-8.
11. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008;371(9612):569-78.
12. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Moore SC, Schatzkin A, et al. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am J Epidemiol*. 2008;168(3):268-77.
13. Choi MY, Jee SH, Sull JW, Nam CM. The effect of hypertension on the risk for kidney cancer in Korean men. *Kidney Int*. 2005;67(2):647-52.
14. Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC, et al. A prospective study of body mass index, hypertension, and smoking and the risk of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control*. 2005;16(9):1099-106.
15. Vatten LJ, Trichopoulos D, Holmen J, Nilsen TI. Blood pressure and renal cancer risk: the HUNT Study in Norway. *Br J Cancer*. 2007;97(1):112-4.
16. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008;167(4):438-46.
17. Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:145-73.
18. Clague J, Lin J, Cassidy A, Matin S, Tannir NM, Tamboli P, et al. Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(3):801-7.
19. Montironi R, Cheng L, Scarpelli M, Lopez-Beltran A. Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital System: Clinical Implications of the 4th Edition of the WHO Classification and Beyond. *Eur Urol*. 2016;70(1):120-3.
20. Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol*. 2003;170(6 Pt 1):2163-72.
21. Maher ER, Neumann HP, Richard S. von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(6):617-23.
22. Linehan WM, Bratslavsky G, Pinto PA, Schmidt LS, Neckers L, Bottaro DP, et al. Molecular diagnosis and therapy of kidney cancer. *Annu Rev Med*. 2010;61:329-43.
23. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 1993;260(5112):1317-20.

24. Braga EA, Fridman MV, Loginov VI, Dmitriev AA, Morozov SG. Molecular Mechanisms in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Role of miRNAs and Hypermethylated miRNA Genes in Crucial Oncogenic Pathways and Processes. *Front Genet.* 2019;10:320.
25. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982;6(7):655-63.
26. Dall'Oglio MF, Antunes AA, Sarkis AS, Crippa A, Leite KR, Lucon AM, et al. Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. *BJU Int.* 2007;100(3):552-5.
27. Nishida J, Momoi Y, Miyakuni K, Tamura Y, Takahashi K, Koinuma D, et al. Epigenetic remodelling shapes inflammatory renal cancer and neutrophil-dependent metastasis. *Nat Cell Biol.* 2020;22(4):465-75.
28. Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A, et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3714-21.
29. Jones J, Libermann TA. Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 2):685s-92s.
30. Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P. Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2006;49(4):633-43.
31. Rini BI. Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma Current opinion in urology2006 [Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/16905977Available> from: <https://doi.org/10.1097/01.mou.0000240304.96131.44>].
32. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer.* 2007;109(11):2257-67.
33. Owens B. Kidney cancer. *Nature.* 2016;537(7620):S97.
34. Perlmutter MA, Lepor H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev Urol.* 2007;9 Suppl 1:S3-8.
35. Masko EM, Alfaqih MA, Solomon KR, Barry WT, Newgard CB, Muehlbauer MJ, et al. Evidence for Feedback Regulation Following Cholesterol Lowering Therapy in a Prostate Cancer Xenograft Model. *Prostate.* 2017;77(5):446-57.
36. Nilsson EM, Laursen KB, Whitchurch J, McWilliam A, Ødum N, Persson JL, et al. MiR137 is an androgen regulated repressor of an extended network of transcriptional coregulators. *Oncotarget.* 2015;6(34):35710-25.
37. Spadaccino F, Gigante M, Netti GS, Rocchetti MT, Franzin R, Gesualdo L, et al. The Ambivalent Role of miRNAs in Carcinogenesis: Involvement in Renal Cell Carcinoma and Their Clinical Applications. *Pharmaceuticals.* 2021;14(4):322.
38. Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A, Khalil B, White NM, Mejia-Guerrero S, et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *J Mol Diagn.* 2012;14(4):385-92.
39. Gorka J, Marona P, Kwapisz O, Rys J, Jura J, Miekus K. The anti-inflammatory protein MCP1P1 inhibits the development of ccRCC by maintaining high levels of tumour suppressors. *Eur J Pharmacol.* 2020;888:173591.
40. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-74.
41. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1370.
42. Reis STd. Avaliação de polimorfismos dos genes das metaloproteinases da matriz no câncer de próstata. *Biblioteca Digital USP2009 21/01/2009.* 93 p.
43. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(13):3666-70.

44. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence*. 2012;3(1):1.
45. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
46. Yue PY, Leung EP, Mak NK, Wong RN. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J Biomol Screen*. 2010;15(4):427-33.
47. Jorge AL, Pereira ER, Oliveira CS, Ferreira EDS, Menon ETN, Diniz SN, et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *Einstein (Sao Paulo)*. 2021;19:eRB5996.
48. Guo Y, Li X, Zheng J, Fang J, Pan G, Chen Z. Identification of a novel immune-related microRNA prognostic model in clear cell renal cell carcinoma. *Transl Androl Urol*. 2021;10(2):888-99.
49. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may act as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC Urol*. 2012;12:14.
50. Akhtarkhavari T, Bahrami AR, Matin MM. Downregulation of miR-21 as a promising strategy to overcome drug resistance in cancer. *Eur J Pharmacol*. 2022;932:175233.
51. Goujon M, Woszczyk J, Gaudelot K, Swierczewski T, Fella S, Gibier JB, et al. A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- α in Clear Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3).
52. Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance. *Drug Resist Updat*. 2013;16(3-5):47-59.
53. Zhang H, Guo Y, Shang C, Song Y, Wu B. miR-21 downregulated TCF21 to inhibit KISS1 in renal cancer. *Urology*. 2012;80(6):1298-302.e1.
54. Huo W, Zhao G, Yin J, Ouyang X, Wang Y, Yang C, et al. Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *J Cancer*. 2017;8(1):57-64.
55. Zhang Y, Wang LY, Li JZ, Jiang PF, Hu JD, Chen BY. [CRISPR/Cas9-mediated microRNA-21 knockout increased imatinib sensitivity in chronic myeloid leukemia cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2021;42(3):243-9.
56. Xiao Z, Chen Y, Cui Z. MicroRNA-21 depletion by CRISPR/Cas9 in CNE2 nasopharyngeal cells hinders proliferation and induces apoptosis by targeting the PI3K/AKT/MOTOR signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;13(4):738-45.
57. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem*. 2020;194:112260.