

Taciane Macedo

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DE MICRORNAS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO PROCESSO DE METÁSTASE NO CÂNCER DE MAMA.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação PIO XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Barretos, SP
2014

Taciane Macedo

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DE MICRORNAS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO PROCESSO DE METÁSTASE NO CÂNCER DE MAMA.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação PIO XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Barretos, SP
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Vanessa Alves Zagatto CRB 8/8638

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

M113a Macedo, Taciane.

Avaliação *in vitro* do papel de microRNAs na regulação da expressão de genes associados ao processo de metástase no câncer de mama. / Taciane Macedo. - Barretos, SP 2014.

72 f. : il.

Orientadora: Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2014.

1.MicroRNAs. 2.Biomarcadores. 3.Expressão Gênica. 4.Neoplasias da Mama. 5.PCR em Tempo Real. 6.Western Blotting. I. Autor. II. Silveira, Márcia Maria Chiquitelli Marques.

CDD 579.25

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taciane Macedo

Avaliação *in vitro* do papel do microRNAs na regulação da expressão de genes associados ao processo de metástases em câncer de mama

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 14/02/2014

Banca Examinadora:

Prof. Dr. René Aloísio da Costa Vieira

Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Cancer de Barretos

Prof. Dr. Daniel Onofre Vidal

Instituição: Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular - Hospital de Cancer de Barretos

Prof.^a Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Orientador

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Presidente da Banca Examinadora

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2010/16796-0). E de bolsa de mestrado (processo número - 2012/17111-7).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Esta dissertação foi elaborada e se apresenta de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Dedico este trabalho

A Deus, por dar força a cada dia de minha vida. “Tudo posso, naquele que me fortalece.”

Aos meus pais, Sílmara e Guilherme por serem a minha maior inspiração em tudo que faço.

Ao meu namorado, Gabriel, por compreender a importância dessa conquista e sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

"A gratidão é a virtude das almas mais nobres" (Esopo). Este é o espaço que posso expressar esse sentimento a todos que contribuíram para a realização desse trabalho. Sem vocês isso não seria possível. Minha sincera gratidão.

Agradeço a **Deus**, por ter me amparado nas horas mais difíceis e jamais me deixando desanimar ou desistir. "Eu disse essas coisas para que em mim vocês tenham paz. Neste mundo vocês terão aflições; contudo, tenham ânimo! Eu venci o mundo".

A minha mãe, **Silmara Campos**, por ter feito o possível e o impossível para me oferecer a oportunidade de estudar, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos. Por ser meu guia e me mostrar que com esforço, tudo é possível. Como dizia Napoleão Bonaparte "A vitória cabe ao que mais persevera." E ela é o exemplo de batalhadora perseverante, que nunca desistiu e conseguiu realizar seu sonho.

Ao meu pai, **Guilherme Casteleti**, por sempre acreditar que eu era capaz, mesmo as vezes achando que eu não iria conseguir. Por sempre ter me apoiado na realização dos meus sonhos. A minha imensa gratidão.

Ao meu pai, **Luciano Macedo**, por torcer por mim, mesmo não entendendo nada do que eu estava fazendo.

Ao meu namorado, companheiro e acima de tudo amigo, **Gabriel Cypriano**, que foi umas das pessoas mais fundamentais nesta jornada. Sem seu amor, seu apoio, sua compreensão não teria chegado ao fim. Obrigada por sempre ir para Barretos de última hora, quando precisava do seu ombro apenas para chorar. Obrigada ainda por sempre respeitar meu silêncio e compartilhar meus sorrisos.

A todos meus familiares, avós, tios, tias, primos, primas, sogra, sogro e cunhados.

A melhor coisa que pode haver é pertencer a uma família. Chegar em casa e ser acolhido com naturalidade, um lugar de apoio, de encorajamento mútuo, consolo nas horas difíceis. Com certeza isso foi o que me impulsionou nas horas difíceis, porque sucesso todos podem conseguir pelo seu próprio esforço, mas amor de família são para poucos. Obrigada por serem meu alicerce nessa jornada. Amo muito vocês.

À minha orientadora, **Dra Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira**, que foi a pessoa mais importante na minha formação profissional. Sua confiança, apoio, incentivo e sabedoria me renderam um rico conhecimento científico e pessoal que levarei para sempre comigo. Obrigada por me ensinar tudo que sei hoje.

À **Dra Adriane Feijó Evangelista**, pela grande contribuição e análise dos dados estatísticos e principalmente pela paciência em me ensinar suas loucuras através do R. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e ajuda durante os experimentos no laboratório.

Ao **Dr. Daniel Vidal**, que foi fundamental para a elaboração desse trabalho pelo imenso aprendizado durante as discussões e reuniões científicas. Por sempre estar disponível para me atender com as minhas dúvidas e me acompanhar em experimentos na bancada.

À **Dra Viviane Aline O. Silva**, meus sinceros agradecimentos que me ajudou muito quando eu mais precisava. Sem sua ajuda eu não teria concluído essa dissertação. Seu conhecimento e paciência foram fundamentais. Obrigada por suas palavras de incentivos e por acreditar o quanto eu era capaz.

Ao **Ms Renato Oliveira**, que também foi uns dos responsáveis pela minha formação profissional. Quando entrei no laboratório estava perdida e você sempre estava disposto e paciente a me ajudar, tão paciente que suas explicações me davam sono com sua voz calma. Obrigada por sua grande amizade.

A cinco amigos que ganhei nesta jornada e que foram de total importância durante esta caminhada; à **Ms Ana Laura Rodrigues Bordinhão**, por sempre estar ao meu lado me incentivando e nunca deixando eu esmorecer. Obrigada por sua preocupação, pelos seus conselhos, pelas dicas de nutrição, pela companhia e acima de tudo obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que tem a minha sincera admiração, tanto no lado pessoal como no profissional. Você sempre será a pessoa que vou me espelhar. Ao **Ms Augusto Marino Ludvik**, por estar comigo desde o começo fazendo meus dias mais alegres, pelo aprendizado científico e de vida, em que chegamos a conclusão "quem nasce, nasce". Te vejo no Caribe. À **Ms Flávia Eguchi**, por sempre estar disposta a me ajudar e me contagiar com sua alegria. Obrigada pelas conversas, conselhos e risadas. À **Ms Leticia Yamane**, por fazer das minhas noites mais alegres, sem você não conseguiria ter ficado em Barretos uma semana. Obrigada por ser minha companheira de casa, por dividir aflições e vitórias.

Ao **Maicon Zanon**, ou seria ao meu irmão?!?! Sim ganhei um irmão de alma e fé. Obrigada pelas risadas que faziam doer a barriga, pelas noites no laboratório estudando, pelas palavras de conforto, pela ajuda na animação das aulas de bioestatística (Nunca será mais a mesma sem a nossa presença), pela pregação da palavra no laboratório, por me ensinar tanto sobre a vida. Você tem a minha admiração por sua vontade de vencer.

Sem vocês meus amigos eu não teria conseguido, e o que tenho a dizer a vocês é que a caminhada chegou ao fim e a estrada foi só flores, porque os espinhos vocês os retiraram.

Agradeço toda a **equipe do CPOM** pela maravilhosa convivência, (**Adriana (Dry), Adriana Lorenzi, Abel, Matias, Lídia, Alessandra, Natália, Aline, Rodolfo, Olga, Nathália, Marcela, André, André Lima, Manuela, Camila, Paula, Vânia, Cintia, Carolzinha, Aline e Marina**), em especial à **Dra Carolina Laus** que desde da minha iniciação científica estava disposta a me ajudar, à **Fernanda Cury**, pelas conversas compartilhadas no café.

Ao **programa de pós-graduação** do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, principalmente ao **coordenador Dr. Adhemar Longatto, ao diretor executivo do IEP Dr. André Carvalho**.

A todos os **pesquisadores do CPOM e IEP**, especialmente ao **Dr Rui Reis**, por fornecer as linhagens celulares que viabilizaram esse estudo.

À **Fapesp**, pelo auxílio financeiro do projeto e da bolsa de mestrado (processo 2012-17111-7).

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, críticas e sugestões.

Aos motoristas, **Fábio, Luis e Tião**, pelas infinitas caronas, sem a gratidão de vocês eu não seria capaz de vir para Barretos realizar esse trabalho.

Aos amigos de Catanduva, **Márcio, Lucas, Mariana, Carol, Thamires e João**, por sempre torcerem por mim.

Chego ao fim desta jornada imensamente grata a todos que me proporcionaram a ser uma pessoa mais sábia e melhor. Depois de tanto trabalho, contratempo, choros e mais choros e com certeza muitas alegrias e vitórias chego ao fim realizada. Obrigada a todos "Seja lá o que for que você faça, empregue toda tua energia e todo teu espírito nesta tarefa. Ninguém conquista um sonho sem persegui-lo, ninguém anda uma milha sem dar o primeiro passo. Se ao fim da estrada alguma sombra de arrependimento te atacar, ainda assim levante a cabeça, orgulhe-se por ter tentado, por ter buscado, por ter empregado todas as

tuas forças até o último instante. Tanto pior e sempre pior é arrepender-se daquilo que você não fez" (Augusto Branco).

Se você é...

*Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos
e alguns amigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.*

*Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo
Seja honesto e franco assim mesmo.*

*O que você levou anos para construir
Alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.*

*Se você tem paz e é feliz,
As pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.*

*Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.*

*Veja você que, no final de tudo
Será você ... e Deus.*

E não você ... e as pessoas!

Madre Teresa de Calcutá

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	MicroRNAs: caracterização e biogênese	01
1.2	MicroRNAs e câncer	03
1.3	Regulação da expressão gênica por microRNAs e metástase	04
1.4	Estudos funcionais <i>in vitro</i> utilizando microRNAs	06
1.5	O papel dos miRNAs, miR-183 e miR-494 no câncer	08
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	12
2.1	Justificativa	13
2.2	Hipótese	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos Específicos	15
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
4.1	Fluxograma de Trabalho	17
5	MATERIAS E METÓDOS	18
5.1	Aspecto Ético	19
5.2	Busca <i>in silico</i> para seleção de alvos do miR-183 e miR-494	19
5.3	Linhagens celulares tumorais de mama	20
5.4	Extração do RNA total	22
5.5	Avaliação da quantidade e qualidade do RNA total	22
5.6	Avaliação da expressão dos miRNAs, miR-183 e miR-494 nas linhagens tumorais	24
5.7	Superexpressão e silenciamento do miR-183 e miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário	25
5.8	Ensaio de proliferação, migração e invasão celular com <i>xCELLigence system</i>	27

5.9	Avaliação da expressão das proteínas por <i>Western Blot</i>	28
5.10	Análise Estatística dos Dados	31
6	RESULTADOS	32
6.1	Busca <i>in silico</i> para seleção de alvos do miR-183 e miR-494	33
6.2	Avaliação da integridade das amostras de RNA	34
6.3	Avaliação da expressão dos miRNAs, miR-183 e miR-494 nas linhagens tumorais por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	36
6.4	Ensaio funcionais de superexpressão e silenciamento do miR-183 e miR-494 em linhagens de carcinoma mamário humano	38
6.5	Avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão celular <i>in vitro</i> das linhagens tumorigênicas após a superexpressão do miR-183	41
6.6	Avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão celular <i>in vitro</i> das linhagens tumorigênicas após a superexpressão do miR-494	45
6.7	Avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão celular <i>in vitro</i> na linhagem tumorigênica MCF-7 após o silenciamento com o miR-183	48
6.8	Avaliação do padrão de expressão de proteínas alvos do miR-183 e miR-494 por <i>Western Blot</i>	49
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXOS	
	Anexo A- Carta de Aprovação do CEP	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs	01
Figura 2-	Fluxograma para preparação dos RNA <i>Nano Chip</i> .	24
Figura 3-	Transfecção Reversa utilizando <i>siPORT NeoFX Agent</i>	26
Figura 4-	Esquema de montagem de placas de proliferação, migração e invasão utilizando o sistema em tempo real, <i>xCELLigence system</i>	28
Figura 5-	Rede de interação do miR-494 e miR-183 com seus respectivos alvos preditos, obtida pela análise de bioinformática utilizando algoritmos de predição de alvos.	33
Figura 6-	Gel virtual das amostras de RNAs obtidos neste estudo mostrando RNAr 28S, RNAr 18S e RNAs 4-5S.	34
Figura 7-	Densitometria das amostras de RNAs mostrando as frações de RNAr 28S, RNAr18S e RNAs 4-5s. Amostras de linhagens celulares com RIN acima de 9.0.	35
Figura 8-	Valores de expressão do miR-183 (A) e miR-494 (B) obtidos por PCR em tempo real no painel de linhagens de câncer de mama.	37
Figura 9-	Avaliação quantificação relativa após a superexpressão <i>in vitro</i> do miR-183 na linhagem tumorigênica de mama, MDA-MB-231 ao longo do tempo.	38
Figura 10-	Avaliação da quantificação relativa após a superexpressão <i>in vitro</i> do miR-183 na linhagem tumorigênica de mama, MDA-MB-468 ao longo do tempo.	39
Figura 11-	Avaliação da quantificação relativa após a superexpressão <i>in vitro</i> do miR-494 na linhagem tumorigênica de mama, MDA-MB-468 ao longo do tempo.	40
Figura 12-	Avaliação da quantificação relativa após o silenciamento <i>in vitro</i> do (A) miR-183 e do (B) miR-494 na linhagem de carcinoma mamário humano MCF-7 ao longo do tempo.	41
Figura 13-	Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração(B) e invasão(C)	43

celular após a superexpressão *in vitro* do miR-183 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-231 ao longo do tempo ($p \leq 0,025$).

- Figura 14-** Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração(B) e invasão (C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-183 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-468 ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,025$). 44
- Figura 15-** Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração (B) e invasão (C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-494 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-231 ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,025$). 46
- Figura 16-** Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração (B) e invasão (C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-494 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-468 ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,025$). 47
- Figura 17-** Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração (B) e invasão (C) celular após a silenciamento *in vitro* do miR-183 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MCF-7 ao longo do tempo ($p \leq 0,025$). 49
- Figura 18-** Avaliação da expressão da proteína Rb1, após a superexpressão do miR-183 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). 50
- Figura 19-** Avaliação da expressão da proteína VEGF_{-165b} após a superexpressão do miR-183 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). 51
- Figura 20-** Avaliação da expressão da proteína Rb1 após a superexpressão *in vitro* do miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). 52
- Figura 21-** Avaliação da proteína VEGF_{-165b} após a superexpressão *in vitro* do miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama.	21
Tabela 2-	Classificação das linhagens celulares de carcinoma mamário humano aos subtipos moleculares correspondentes por painel imunocitoquímico.	21
Tabela 3-	Relação das proteínas utilizadas na técnica de <i>Western Blot</i>	30
Tabela 4-	Linhagens tumorigênicas de mama selecionadas para os ensaios funcionais de superexpressão e silenciamento.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Coleção de cultura Americana
AMOs	<i>anti-miRNA oligonucleotides</i>
AKT1	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	DNA Complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
EC	Estadio Clínico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
ERG	<i>V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1</i>
FIH-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor</i>
GIST	Tumor gastro intestinal
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HBP1	<i>HMG-box transcription factor 1</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factors</i>
HOXD10	<i>Homeobox D10</i>
IGF2BP1	<i>Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1</i>
KDa	Quilo Dalton
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
LNAs	<i>Locked nucleic acid</i>
M	Metastático
MEK	<i>MAP kinase-ERK kinase</i>

miRNAs	Micro ácido ribonucleico
NaCl	Cloreto de Sódio
NM	Não Metastático
Nt	Nucleotídeo
Opti-MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Media</i>
PBS	Solução Salina fosfatada tamponada
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAF	Serina / treonina quinase ativada pela proteína quinase RAS
RAS	GTPase
Rb1	Retinoblastoma
RE	Receptor de estrógeno
SFB	Soro fetal bovino
RMS	Rabdomiossarcoma
RP	Receptor de progesterone
Rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOX4	<i>SRY-related HMG-box gene 4</i>
TBST	Tampão Tris, Cloreto de Sódio, Tween
UTR	Região não traduzida
VEGF	<i>Vascular endothelial growth fator</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Graus Celsius
G	Gravidade (unidade de rotação em centrífuga)
B	Beta
>	Maior que
≥	Maior ou igual a
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
M	Micro
μL	Microlitro
mL	Mililitro
Ng	Nanograma
%	Porcentagem

RESUMO

Macedo. T. Avaliação do papel de microRNAs na regulação da expressão de genes associados ao processo de metástase no câncer de mama. **Dissertação (Mestrado)**.

Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2014.

JUSTIFICATIVA: Os estudos funcionais *in vitro* são fundamentais para a compreensão do papel dos microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs (14 a 20nt) não codificadores de proteínas que desempenham papel importante na regulação da expressão gênica. Metástase é o processo que frequentemente afeta o gerenciamento clínico de pacientes com câncer e ocorre em múltiplos passos sequenciais. No entanto, as bases moleculares das vias que regem estes passos ainda permanecem obscuras. Estudos recentes têm sugerido que determinados microRNAs (miRNAs) exercem um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Nossa hipótese é que estes miRNAs, previamente apontados na literatura como desregulados em tumores de pacientes com câncer de mama, exercem importante papel na regulação da expressão de genes chaves associados ao fenótipo metastático. **OBJETIVO:** Avaliar a viabilidade de linhagens celulares imortalizadas de carcinoma mamário, como modelos para estudos funcionais com os miRNAs, miR-183 e miR-494, previamente identificados como desregulados nesta neoplasia. **MATERIAL E MÉTODOS:** Inicialmente, a análise foi feita *in silico* para a seleção de genes alvo, utilizando algoritmos de predição. Logo em seguida avaliamos o padrão de expressão destes miRNAs em um painel de linhagens celulares de carcinoma mamário, por meio da tecnologia de PCR em Tempo Real. Através de ensaios funcionais *in vitro* (superexpressão e silenciamento) avaliamos o papel destes miRNAs na modulação da expressão de genes chaves para processo de metástase e o impacto desta modulação do comportamento de células neoplásicas, por meio da metodologia de sistema xCELLigence. **RESULTADOS:** Nossos resultados mostram que a superexpressão *in vitro* de miR-183 e miR-494 alterou significativamente o comportamento de linhagens de células de câncer de mama, no entanto esta alteração foi melhor observado no processo celular, tais como a proliferação e migração. Do mesmo modo, o silenciamento do miR-183 também foi capaz de modular o comportamento da linhagem MCF-7. Além disso, observou-se por meio de análise *in silico* que o miR-183 e miR-494 tem muitos alvos sendo alguns deles comuns a ambos. No entanto, dentre os diferentes alvos destes miRNAs só foi possível confirmar a modulação

negativa da presença da proteína Rb1 pela técnica de Western blot, após a superexpressão destes dos miRNAs *in vitro*.

CONCLUSÃO: Portanto, nossos achados mostram que a superexpressão e/ou o silenciamento do miR-183 e miR-494 parece ter um real impacto no comportamento celular de linhagens de carcinoma mamário quanto a capacidade de proliferação, migração e invasão celular *in vitro*.

Palavras Chaves: MicroRNA; Biomarcadores; Expressão Gênica; Neoplasias da Mama; PCR em Tempo Real; Western Blotting.

ABSTRACT

Macedo. T. Evaluation of the role of miRNAs in regulating the expression of genes associated with metastasis in breast cancer. **Dissertation (Master's degree)**.

Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2014.

BACKGROUND: Functional *in vitro* studies are critical to understanding the role of microRNAs (miRNAs) small RNAs (14 to 20nt) not encoding proteins that play important roles in regulating gene expression. Metastasis is the process that most often affects the clinical management of cancer patients and occurs in multiple sequential steps. However, the molecular basis of the pathways governing these steps still remain unclear. Recent studies have suggested that certain microRNAs (miRNAs) play an important role in the development and progression of breast cancer. Our hypothesis is that these miRNAs previously identified in literature as deregulated in tumors of patients with breast cancer, have an important role in regulating the expression of key genes associated with the metastatic phenotype. **AIM:** Assess the viability breast cancer cell lines as a model for functional studies of miR-183 and miR-494, previously identified as deregulated in this tumor. **MATERIAL AND METHODS:** Initially, the analysis was done *in silico* for selection of target genes using prediction algorithms. Shortly thereafter evaluate the expression pattern of these miRNAs in a panel of breast carcinoma cell lines, by means of the Real-Time PCR technology. Through *in vitro* functional assays (overexpression and silencing) evaluated the role of these miRNAs in the modulation of expression of key genes involved in metastasis and its impact behavior modulation of neoplastic cells, using the methodology of xCELLigence system. **RESULTS:** Our results show that *in vitro* overexpression of miR-183 and miR-494 significantly alter the behavior of cell lines of breast cancer, however this change was best observed in the cellular process, such as proliferation and migration. Similarly, the silencing of miR-183 was also able to modulate the behavior of the MCF-7 line. Furthermore, it was observed by *in silico* analysis that miR-183 and miR-494 have many targets and some are common to both. However, among the different targets of these miRNAs has only been possible to confirm the downregulation of the presence of Rb1 protein by Western blot, after overexpression of these miRNAs *in vitro*. **CONCLUSIONS:** Our findings show that

overexpressio of miR-183 and miR-494 seems to have a real impact on cell behavior in breast carcinoma lines as the ability of proliferation, cell migration and invasion *in vitro*.

KEYWORDS: microRNAs; Biomarkers; Breast Neoplasms; Gene Expression; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Western Blotting.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 MicroRNAs: caracterização e biogênese

MicroRNAs, ou miRNAs, que são pequenos RNAs (19 a 24 nucleotídeos) não codificadores de proteínas originados de RNAs precursores em grampo com cerca de 60 a 110 nucleotídeos envolvidos na regulação pós-transcricional de genes codificantes¹. Os miRNAs tornaram-se um ponto crucial para melhor entendimento molecular do câncer humano há poucos anos atrás. MiRNAs maduros são resultantes de um processamento sequencial de transcritos primários (pri-miRNAs) mediado por duas enzimas ribonucleases III (RNase III), Drosha e Dicer. As formas maduras apresentam de 18 a 24 nucleotídeos e regulam negativamente a expressão proteica pelo pareamento com seu RNAm alvo levando a inibição da tradução ou degradação do RNAm alvo².

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs ocorre por interação (pareamento de bases) na região 3' não traduzida dos RNAm (3'UTR) e depende do grau de complementaridade com o RNAm alvo. O resultado dessa interação pode levar a inibição da tradução ou a degradação do RNAm³. O pareamento imperfeito com o RNAm leva a inibição da tradução do RNAm alvo, sendo este o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos (Figura 1).

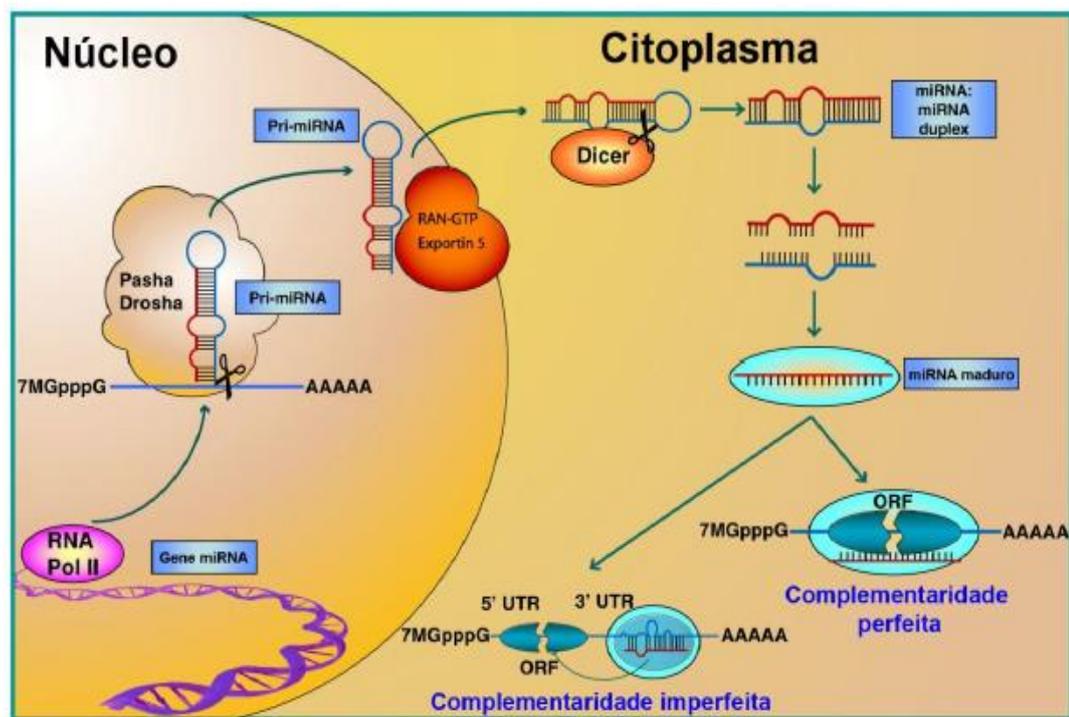


Figura 1- Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercidos pelo miRNAs. Adaptado de Kutanzi *et al.*, 2011⁴.

Recentemente alguns estudos relatam que os miRNAs também regulam a expressão gênica por se ligar a região 5'UTR de RNAs mensageiros alvos inibindo ou permitindo a tradução. Este novo mecanismo de regulação da expressão gênica pelos miRNAs foi demonstrado utilizando várias abordagens *in vitro*, *in vivo* e *in silico* e muitas ferramentas foram desenvolvidas no intuito de se predizer novos alvos e suas funções na região 5'UTR⁵.

O primeiro estudo que demonstrou o mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão gênica por meio da ligação do miRNA na região 5'UTR do RNAm alvo, foi realizado em *Drosophila melanogaster*. Neste trabalho os autores relataram que a interação do miRNA-2 com a região 5'UTR do gene β -globina humana inibe a tradução da proteína correspondente, porém essa inibição é somente em parte regulada pela ligação na 5'UTR devendo também ser resultado da ligação do miRNA com a região 3'UTR do RNAm alvo⁶.

Por meio de estudos utilizando ferramentas de bioinformática mostram que miRNAs que se ligam a região 5'UTR e não a 3'UTR de RNAs mensageiros alvos são apontados como ativadores ao invés de inibidores da expressão gênica⁵. Podemos citar como exemplo, o miR-122 apontado como superexpresso em carcinoma de fígado e considerado um regulador positivo da ativação do vírus da hepatite C. Isto porque, este miRNA se liga a região 5'UTR de seu RNAm alvo (Gene do vírus da hepatite C-HCV) e esta ligação permite o aumento da síntese proteica, sem alterar a estabilidade do RNA, mas facilitando a replicação do RNA viral⁷.

O fato dos miRNAs serem sequências pequenas e cujo mecanismo de ação não depende de pareamento completo com seus RNAm alvos, faz destas moléculas potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Isto porque um único miRNA pode regular muitos RNAm alvos, além de cooperarem no controle de um único RNAm⁸.

Embora estejamos no início do entendimento da biologia dos miRNAs e seu modo de ação o crescente número de estudos vem revelando a importância desses pequenos RNAs nos diversos processos biológicos. Além disso, a regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs está diretamente associada a regulação de processos biológicos importantes, de tal maneira que um desequilíbrio neste mecanismo de regulação pode ocasionar o aparecimento de diferentes patologias como o câncer⁹.

Diante deste panorama o processo de metástase tumoral encaixa-se perfeitamente como modelo de estudo para a identificação de miRNAs que possam estar relacionados tanto com a angiogênese quanto com a invasão e metástase.

1.2 MicroRNAs e câncer

Atualmente existe um grande acervo de trabalhos na literatura que apresentam evidências sobre a participação dos miRNAs em várias doenças humanas especialmente o câncer. Tem sido sugerido que assim como outras moléculas os miRNAs podem regular mecanismos importantes para a formação e progressão de um tumor¹⁰⁻¹².

Os miRNAs que atuam no processo neoplásico podem ser divididos em dois grupos, os oncomirs e os anti-oncomirs, que regulam negativamente os genes supressores de tumor e os oncogenes, respectivamente¹³. Podemos citar, por exemplo, um grupo de miRNAs, conhecidos como miR-17-92, que é considerado potencialmente oncogênico por estar frequentemente superexpresso em tumores sólidos¹⁴. Entretanto o miR-let7 é considerado um anti-oncomir, pois bloqueia a ação do oncogene RAS¹⁵.

Sabe-se que aproximadamente 50% dos miRNAs estão localizados em sítios frágeis ou em regiões associadas ao câncer¹⁶⁻¹⁸. Estudos que objetivam avaliar o perfil de expressão de miRNAs em larga escala mostram que esta moléculas podem ser consideradas biomarcadores moleculares pois apresentam assinaturas de expressão capazes de diferenciar, do ponto de vista molecular, uma célula normal de uma célula neoplásica facilitando assim a identificação de diversos tipos de câncer².

Os primeiros trabalhos a respeito do envolvimento dos miRNAs em tumores descreve a identificação de sequências que codificam o miR-15 e o miR-16 na região do cromossomo 13q14 que se apresentam deletadas em mais da metade dos casos de leucemia mielóide crônica¹⁶.

Desde então, a expressão alterada de miRNAs vem sendo observada em muitos tumores como mama, colorretal, próstata, pulmão e fígado. No câncer de mama, Iorio MV et al, 2005¹⁹ foi primeiro estudo avaliar a expressão de miRNAs em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama por meio da tecnologia de *microarray*. Os miRNAs identificados como desregulados quando comparados com indivíduos normais foram os miR-10b, miR-125b e miR-145 que foram identificados como superexpresso e os miR-21 e miR-155, os quais foram poucos expressos.

Um outro estudo avaliou 540 amostras de seis diferentes tumores sólidos (pulmão, colón, mama, estômago, pâncreas e próstata). Inicialmente foi feita uma comparação dos tecidos tumorais com os normais e identificaram 26 miRNAs superexpressos e 17 miRNAs poucos expressos. O miR-21 e o miR-17-5p foram superexpressos em todos os tipos de

cânceres. Já o miR-155 foi superexpresso no câncer de mama, pulmão e colón. O miR-106a foi superexpresso em câncer do colón, porém em câncer de mama o miR-106a foi pouco expresso²⁰.

O miR-21 é o miRNA mais estudado em câncer. Em câncer gástrico, o miR-21, promove a proliferação e invasão e inibe apoptose. Ele é superexpresso em tecidos de tumores gástrico quando comparado com o tecido normal. Além disso, os autores associaram a superexpressão do miR-21 no soro de pacientes com câncer, com aumento do tamanho e do avanço do estadio do tumor gástrico²¹. Estes resultados mostram que os miRNAs podem ser usados como potentes biomarcadores para câncer, já que são estáveis no sangue, resistem a vários ciclos de congelamentos e descongelamentos e são facilmente detectáveis no soro de pacientes com câncer²¹.

A expressão anormal de miRNAs no tumor, caracterizada por níveis diferentes de expressão do miRNA maduro ou sequências de miRNA precursor, ou “miRNoma” (conjunto de miRNAs do genoma), em comparação com as células normais, tem provado ser a principal anormalidade, nas células neoplásicas²².

1.3 Regulação da expressão gênica por microRNAs e metástase

Recentemente foi proposto que a patogênese do câncer envolve, entre outras macromoléculas, os miRNAs, cujos perfis de expressão estão associados com o prognóstico e os resultados terapêuticos em vários cânceres humanos. Embora a função dos miRNAs como oncogenes ou como supressores tumorais já tenha sido bem caracterizada, os mecanismos de mediação da metástase exercido pelos miRNAs foram abordados apenas recentemente²³.

Um crescente número de estudos demonstram que os miRNAs desempenham importante papel no início, progressão e conseqüente invasão e metástase entre os diferentes tipos de cânceres^{24, 1, 25}.

O envolvimento dos miRNAs no processo de metástase tumoral está sob intensa investigação nos últimos anos. O envolvimento dos miRNAs no aparecimento de metástases foi inicialmente descoberto por Ma et al²⁶ que encontraram o miR-10b como iniciador de invasão e metástase no câncer de mama. Pouco tempo depois Tavazzoie et al²⁷ revelam que

miR-335 suprime a metástase e migração por ter como alvo o fator de transcrição SOX4 e tenascin C, componentes da matriz extracelular.

Em conjunto, estes estudos revelaram um marco no balanço entre RNAs não codificadores como estimuladores e inibidores de metástase, de tal forma que, a identificação de diversos alvos poderia potencialmente representar uma ligação molecular entre o descontrole na expressão de determinado miRNA e um comportamento específico de determinado tumor. Estas são descobertas importantes não só porque abrem um novo campo de investigação, mas também, porque os autores descreveram as vias moleculares que estão envolvidas no processo de metástase do tumor mamário.

A superexpressão de miR-10b promove invasão e metástase. Sendo assim, o próximo passo foi comprometer-se com a difícil tarefa de descrever o caminho molecular que liga miR-10b ao processo metastático²⁶. Esses autores descobriram que o gene Twist, um fator de transcrição promotor de metástase, poderia induzir a expressão de miR-10b e que miR-10b é um elemento essencial no programa de indução de metástase induzido por Twist. Além disso, demonstraram que HOXD10, um fator de transcrição homeobox que promove ou mantém um fenótipo diferenciado em células epiteliais, é alvo de miR-10b e que HOXD10 é realmente pouco expresso em tumores metastáticos. Finalmente, os autores mostraram que RhoC, uma proteína G envolvida na metástase, que é reprimido por HOXD10, torna-se fortemente expresso em resposta a expressão de miR-10b.

O trabalho de Huang et al²⁸ revelou que miR-373 e miR-520 também são miRNAs promotores de metástases. Anteriormente o miR-373 foi associado ao câncer testicular, mas não a metástase. Portanto, o miR-10b, miR-373 e miR-520 não afetam a proliferação celular, mas promovem a migração e invasividade de células MCF-7 *in vitro*. Além disso, a superexpressão de miR-373 e miR-520 resultou no aparecimento de nódulos metastáticos em camundongos. Mostrando que estes miRNAs também são capazes de promover a invasão celular *in vivo*. Elucidando as vias moleculares envolvidas neste processo de metástase, os autores descobriram que as sequências denominadas “*seeds*” de miR-373 e miR-520 eram similares, sugerindo que eles poderiam regular um conjunto comum de genes alvos. Entre nove genes potencialmente alvos, o CD44 foi encontrado como sendo um alvo potencial de ambos miR-373 e miR-520. Com o intuito de se verificar a importância desses resultados em carcinomas primários de mama, foram avaliadas, amostras de mama normal em relação a amostras tumorais. Observou-se que miR-373 estava superexpresso no tumor,

em especial em tumores com metástase linfonodal. Além disso, uma correlação inversa com a expressão de CD44 foi identificada²⁹. Estes achados reforçam a importância dos estudos realizados em linhagens celulares de câncer de mama.

Vale ressaltar que estudos recentes estabeleceram uma ligação entre hipóxia (uma característica fundamental do microambiente tumoral) e um grupo de miRNAs, em parte explicada pela direta ativação transcricional do FIH-1 por miRNAs específicos. Perfis de expressão baseados em resultados de *microarrays* mostraram que miR-23, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, miR-107, miR-181, miR-210, e miR-213, são induzidos em resposta a baixa tensão de oxigênio³⁰.

O fator angiogênico VEGF é altamente expresso em vários tipos de tumores e regulado a jusante de uma ampla gama de estímulos tais como hipóxia, FIH, fatores de crescimento, citocinas e hormônios³¹. Sabe-se que a regulação da expressão de VEGF também ocorre em nível pós-transcricional por ação de miRNAs a exemplo dos miRNAs pouco ativos em condições de hipóxia, como miR-16, miR-15A, miR-20A e miR-20b que modulam os níveis de expressão de VEGF favorecendo assim o processo de angiogênese³². Isto cria um *feedback* positivo no qual microRNAs reprimidos em condições de hipóxia reforçam a expressão de VEGF que é um potente fator pró-angiogênico induzido nestas condições.

Sendo assim, o controle da angiogênese tumoral exercida pelos microRNAs ocorre por afetar a comunicação (“*cross-talk*”) entre as células tumorais e o endotélio vascular. Este é, portanto um paradigma entre células “normais”, tipos celulares não tumorais e endotélio em vários processos fisiológicos e patológicos.

Tal como acontece com todos os trabalhos de descoberta, esses estudos tiveram consequências significativas. Eles demonstraram que a combinação do perfil de expressão completo seguido de estudos funcionais que envolvem a superexpressão e repressão de miRNAs representam uma abordagem mais significativa para a obtenção de grandes avanços dentro da pesquisa a respeito do papel dos miRNAs nas doenças, incluindo as neoplasias²⁹.

1.4 Estudos funcionais *in vitro* utilizando microRNAs

Grandes avanços no entendimento da regulação da expressão gênica tem sido alcançados após a descoberta dos miRNAs. Recentemente estudos funcionais, que visam a utilização de inibidores de miRNAs *in vitro*, têm sido realizados a fim de validar estudos de

expressão gênica em larga escala. Esses estudos visam o melhor entendimento do papel dos miRNAs nas células e o impacto da modulação da expressão *in vitro* destas moléculas no comportamento celular em função da interação miRNA-RNA mensageiro alvo.

Os oligonucleotídeos que são complementares aos miRNAs maduros são chamados anti-miRs ou, do inglês *anti-miRNA oligonucleotides* (AMOs). A ligação aos miRNAs deve inibir ou inativar miRNAs oncogênicos nos tumores. A inativação tem sido realizada por meio de oligonucleotídeos antisense 2'-O-methyl ou *locked nucleic acid* (LNAs). Estes oligonucleotídeos inseridos nas células por meio de uma metodologia conhecida como transferência gênica. A transferência gênica pode ser realizada utilizando de vetores virais e não virais.

Os vetores virais incluem: retrovírus, lentivirus, adenovírus, vírus adeno associados e vetores virais híbridos. A transferência gênica utilizando este sistema é conhecida como transdução. Esses vetores virais são considerados o método mais eficiente de transferência gênica, porque eles são capazes de transferir seu material genético para a célula hospedeira. No entanto, há algumas limitações como a imunogenicidade das células infectadas com vírus, alteração da função da célula ou mesmo indução à mutagênese.

Por outro lado, a transferência gênica utilizando vetores não virais, são mais comumente conhecida como transfecção gênica. Utilizam vetores como fosfato de cálcio, DNA desnudo, lipossomas catiônicos e biobalística. A vantagem deste método é que são fáceis de utilizar, econômico e de baixa toxicidade. No entanto este método oferece a desvantagem de ter o efeito transiente sob a expressão do transgene e portanto pode ser menos eficiente quando se deseja avaliar um efeito ao longo do tempo, devido a expressão do transgene ser de curta duração³³⁻³⁵.

Um estudo recente mostra a importância dos AMOs no câncer de mama por meio da transfecção de células da linhagem MCF-7 com oligonucleotídeos anti-*miR-21*. Os achados mostram que a superexpressão do *miR-21* afeta tanto o crescimento celular *in vitro* como o crescimento celular em modelo animal³⁶.

O estudo de Hurteau et al³⁷ apontou a perda de expressão do *miR-200c* como iniciador de um fenótipo invasivo decorrente da modificação da expressão de E-caderina, além de alterações na morfologia celular e mudanças epigenéticas em células MCF-7 e MDA-MB-231. Além disso, Tsang et al³⁸ mostraram que o silenciamento de *let-7* induz a expressão de *caspase3*. O cluster miR-17-92 é visto como uma nova classe de oncogenes. O

silenciamento do miR-17-5p mostrou supressão do gene HBP1 envolvido na via da β -catenina, acarretando na modificação de função na migração e invasão das células MCF-7 e MDA-MB231³⁹

A superexpressão de miRNAs permite a identificação de fenótipos associados ao ganho de função enquanto que a inibição gênica permite a identificação de fenótipos associados à perda de função. Com a combinação dessas duas ferramentas, torna-se possível identificar não somente genes regulados por miRNAs mas também processos celulares afetados por miRNAs específicos.

Considerando a importância dos miRNAs na regulação da expressão de genes-chaves para o processo de desenvolvimento e progressão do câncer, abordagens eficazes que visam a elucidação do papel específico de miRNAs em tumores ainda é um desafio científico.

1.5 O papel dos miRNAs, miR-183 e miR-494 no câncer

O miR-183 é um membro de uma família de miRNAs (miR-183, miR-182 e miR-96) localizado no cromossomo 7q32 e segundo a literatura os miRNAs deste locus estão desregulados em vários tipos de tumores como hepático e colorretal bem como nas leucemias, câncer de pulmão, osteosarcoma e mama⁴⁰⁻⁴².

Um estudo demonstrou que a baixa expressão de miR-183 está associada com metástase pulmonar e que o aumento da expressão ectópica inibe este potencial invasivo das células de câncer de pulmão⁴³. Juntos estes dados sugerem que miR-183 tem um importante papel na cascata de metástase, possivelmente atuando como um supressor tumoral.

Considerando o descrito recentemente realizou-se um estudo a fim de investigar o papel de miR-183 na invasão e metástase de osteosarcoma por meios de ensaios funcionais utilizando linhagens celulares. Neste estudo os autores observaram que o aumento da expressão ectópica de miR-183 ocasionou a diminuição da expressão de Ezrin (importante proteína para o aparecimento de metástase em vários tumores sólidos) e significativamente inibiu a motilidade e invasão de células de osteosarcoma, sugerindo o potencial papel deste miRNA como supressor tumoral para o processo de metástase neste tipo de tumor⁴².

Por outro lado no sarcoma sinovial, rhabdomyosarcoma (RMS) e câncer de cólon, o miR-183 parece estar superexpresso quando comparado com tecido normal dos respectivos

tipos tumorais citados acima. Ensaios funcionais mostram que a inibição do miR-183 acarreta em alteração tanto da expressão do gene *EGR1*, quanto da proteína EGR1 tendo como resultado a diminuição da capacidade de migração celular *in vitro* em linhagens de câncer de cólon e de sarcoma sinovial⁴⁴.

No contexto do câncer de mama, existe um trabalho recente em que foi possível identificar miRNAs com padrões de expressão diferentes entre os vários subtipos histológicos do câncer de mama. Nestes trabalhos observou-se que o miR-183 apresentou-se superexpresso em amostras de epitélio normal em relação a tumores com hiperplasia ductal atípica normal mantendo este padrão (superexpressão) nas fases posteriores, ou seja, durante a progressão do tumor. Estes achados sugerem que este miRNA, juntamente com outros miRNAs, pode ter um papel importante na iniciação e progressão o câncer de mama invasivo⁴⁵.

Hannafon et al ⁴⁶ avaliaram o perfil de expressão de 365 miRNAs em amostras de epitélio normal oriundos de mamoplastia e compararam com o perfil de expressão em amostras de câncer de mama ductal *in situ*. Eles observaram que miR-183 foi diferencialmente expresso em amostras de câncer de mama ductal *in situ* e que a sua inibição *in vitro*, resultou na superexpressão de seu alvo EGR1, sabidamente conhecido como supressor tumoral. Também foi observado que o aumento da expressão de miR-183 foi associado à inibição da migração celular em linhagens de carcinoma de mama.

Assim como a superexpressão do miR-183 está relacionado com câncer, a família deste miRNA, que é composta pelo miR-96 e miR-182, está superexpressa em amostras de tecido e soro de pacientes com câncer de pulmão quando comparado com o tecido adjacente. Além disso, este estudo mostrou que a superexpressão do miR-183 e do miR-182 está associada com algumas características clínicas, tais como a presença de metástase linfonodal metastático, invasão de membrana pulmonar, tamanho do tumor e o avanço do estadió clínico, sugerindo que eles podem ter um importante papel na regulação da invasão, metástase e progresso do câncer pulmonar. E, por fim, mostraram que a superexpressão da família do miR-183, tanto no tecido como no soro, está associada a diminuição da sobrevida global de pacientes com câncer de pulmão⁴⁷.

De igual modo, um estudo do tipo meta-análise avaliou sistematicamente o nível de expressão da família do miR-183 em vários tipo de cânceres. A família do miR-183 parece estar superexpresso em 14 tipos de cânceres, funcionando como oncogenes no

desenvolvimento da carcinogênese e na regulação da progressão do câncer. No câncer de próstata e colorretal este estudo também demonstrou que a família do miR-183 apresenta-se superexpresso. Já no câncer de mama, estômago e pancreático os autores não conseguiram resultados concordantes da expressão da família do miR-183 nestes tipos tumorais⁴⁸.

Além do miR-183 estar diferencialmente expresso em câncer de mama feminino, estudo avaliou um painel de miRNAs em amostras de câncer de mama masculino e observou que o miR-183 é altamente expresso no câncer de mama masculino quando comparado com amostras de tecidos normais. Outros miRNAs, tais como miR-21, miR-519d, miR-197 e miR-493-5p, foram identificados como superexpressos, e o miR-145 e miR-497 como pouco expressos, revelando que alguns destes miRNAs tinham suas alterações específicas do câncer de mama masculino⁴⁹.

Em relação ao miR-494 existem poucos trabalhos na literatura que mostram a associação da expressão deste miRNA com o surgimento e progressão de alguns tipos de tumores. Um estudo mostrou que a superexpressão de miR-494 levou à inibição de KIT, uma proteína oncogênica, a qual levou a diminuição da proliferação celular e ativação da apoptose em linhagem celular de GIST⁵⁰. Igualmente, foi possível observar que a superexpressão do miR-494 levou à inibição da proliferação e indução da senescência em linhagem de câncer pulmonar através da ligação com seu alvo direto, IGF2BP1⁵¹.

Por outro lado, a expressão do miR-494 em células supressoras derivadas da linhagem mielóide promoveu o crescimento tumoral e facilitou a metástase⁵².

Haga et al⁵³ observou que o miR-494, localizado em uma região do genoma denominada DLK1-DIO3, é pouco expresso na linhagem celular de carcinoma mamário denominada MDA-MB-231. Já na linhagem epitelial de mama denominada MCF10A este miRNA foi superexpresso. Além disso, a expressão do miR-494 foi avaliada em amostras de câncer de mama ductal e normal, foi observado o mesmo perfil de expressão das linhagens celulares de carcinoma mamário. Embora todos os mecanismos de ação não estejam bem elucidados, os autores sugeriram que o miR-494 pode levar a inibição da transição epitélio-mesenquimal e proliferação.

Além da literatura demonstrar o envolvimento dos miRNAs, miR-183 e miR-494 com a metástase, um estudo do nosso grupo realizou uma análise em larga escala por meio da tecnologia de *microarrays* em que foi possível determinar assinaturas de expressão

diferencial de miRNAs durante a progressão do câncer de mama. Neste trabalho foram avaliados 64 pacientes portadoras de câncer de mama em que se comparou o perfil de expressão de miRNAs em tumores que recorreram versus os que não recorreram. Por meio de uma análise de risco relativo para o desenvolvimento de metástase à distância os autores mostraram que a indução da expressão do miR-183 separadamente, ou em conjunto com o miR-494 e miR-21 foi associada a um pior prognóstico em mulheres com câncer de mama em estadio clínico II. Este estudo mostrou que estes miRNAs seriam potenciais biomarcadores para a metástase a distância do câncer de mama⁵⁴. Este estudo apontou dois novos candidatos a biomarcadores (miR-183 e miR-494) de metástase para o câncer de mama uma vez que o miR-21 já vem sendo considerado um oncomir pela literatura.

O miR-21 desempenha um papel fundamental no início, progressão e metastização do câncer. Ele é superexpresso em 6 cânceres sólidos como, pulmão, mama, estômago, próstata, cólon e pâncreas⁵⁵.

Zhu et al⁵⁶ confirmaram que o miR-21 é um miRNA oncogênico, devido a inibição do miR-21 *in vivo* que levou a diminuição do crescimento tumoral. Do mesmo modo, eles observaram em uma linhagem de câncer de mama (MCF-7), a supressão do miR-21 levou a inibição do crescimento tumoral e esse mecanismo pode ser explicado em parte pela regulação direta de TPM1 por miR-21.

Além disso, o miR-21 está sendo descrito na literatura como potencial biomarcador. Si et al⁵⁷, mostraram que há uma correlação significativa na expressão do miR-21 do soro com o tecido, sugerindo que o miR-21 isolado de soro pode refletir na maior parte dos padrões de expressão característicos do tecido.

Considerando o exposto e o potencial papel dos miRNAs na progressão do câncer de mama, torna-se evidente a necessidade da melhor elucidação do papel tanto do miR-183 quanto do miR-494 na progressão do câncer de mama para meio de estudos funcionais *in vitro*.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO

2.1 Justificativa

As neoplasias de mama são a principal causa de mortalidade por câncer entre mulheres. As metástases são as causas de cerca de 90 % das mortes em pacientes com neoplasias malignas, de tal forma que os processos de invasão e metástase desempenham importante papel na disseminação do câncer.

O processo de invasão é o primeiro passo na progressão do câncer e envolve a disseminação de células neoplásicas além do sítio primário. Evidências indicam que os microRNAs (miRNAs) regulam a expressão de diferentes genes (regulação pós-transcricional) associados com invasão, migração e metástase tumoral.

Porém estudos que objetivam a avaliação funcional de microRNAs associados com o processo de carcinogênese do câncer de mama são ainda pouco conclusivos.

Portanto estudos funcionais utilizando o cultivo de linhagens celulares *in vitro*, capazes de mensurar o papel de miRNAs apontados como biomarcadores de metástase são de real importância afim de se elucidar o impacto da expressão diferencial destes marcadores na carcinogênese da mama.

2.2 Hipótese

Nossa hipótese é que linhagens celulares de câncer de mama expressam RNAs mensageiros que são alvos de miRNAs e que estes uma vez desregulados poderão influenciar nos processos de proliferação, migração e invasão celular *in vitro* que estão diretamente associados ao fenótipo metastático.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel *in vitro* dos microRNAs hsa-miR-183 e hsa-miR-494, previamente descritos na literatura como candidatos a marcadores de metástase, por meio de ensaios funcionais em linhagens celulares de carcinoma mamário.

3.2 Objetivos específicos

1. Selecionar *in silico* genes alvos relacionados ao processo de metástase do miR-183 e miR-494 utilizando algoritmos de predição de alvos *miRanda*, *RNAhybrid*, *TargetScan* e *miRWalk*.

2. Avaliar a expressão dos miRNAs em um painel de linhagens celulares de carcinoma mamário humano utilizando a técnica de PCR em Tempo Real.

3. Realizar a caracterização funcional do miR-183 e miR-494 por meio da superexpressão e silenciamento *in vitro* destes miRNAs em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

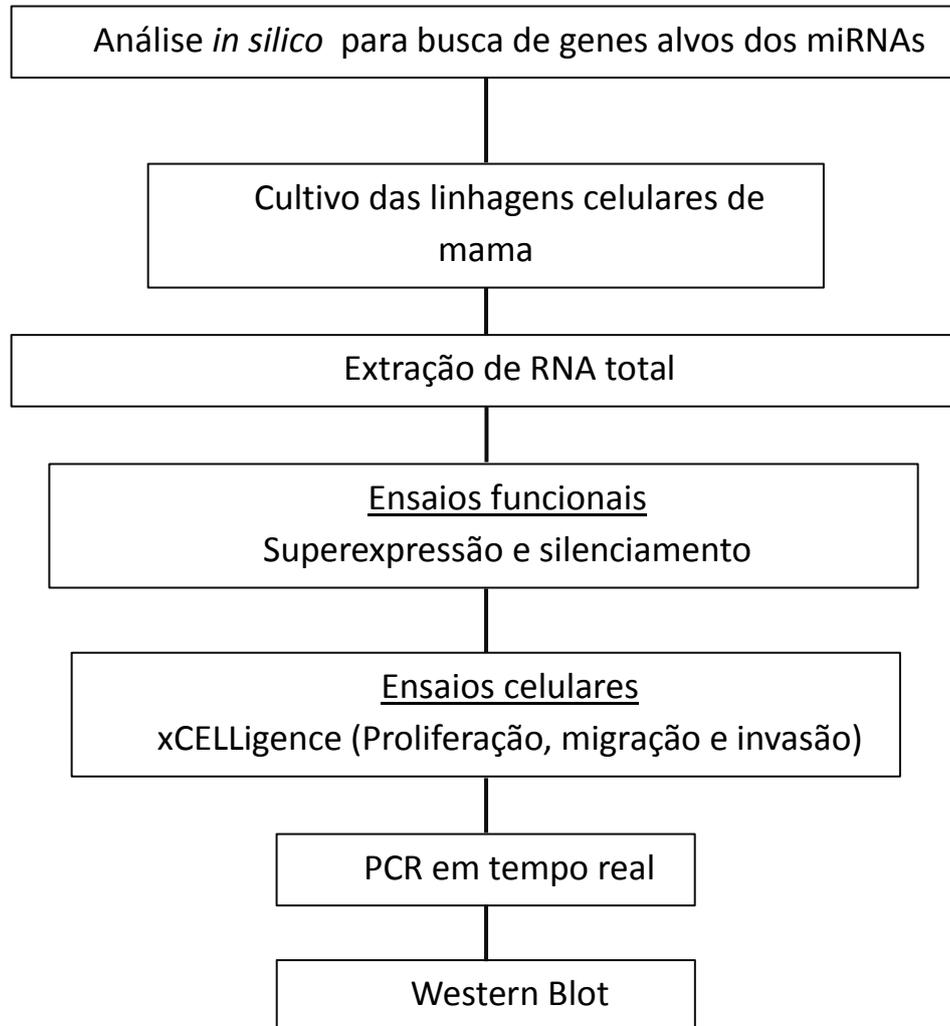
4. Avaliar a expressão dos miRNAs e proteínas-alvo após os ensaios funcionais utilizando a técnica de PCR em Tempo Real e *Western Blot*, respectivamente, a fim de avaliar a eficiência da transfecção *in vitro* e a expressão dos alvos correspondentes.

5. Mensurar o impacto desta intervenção na capacidade de proliferação, migração e invasão celular destas linhagens por meio de ensaios celulares *in vitro*.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Fluxograma de trabalho



MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspecto Ético

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII, SP, Brasil (CEP: 593/2012) apenas para ciência da instituição citada, já que o estudo utiliza linhagens estabelecidas imortalizadas e dispensa autorização do uso de amostras biológicas.

5.2 Busca *in silico* para seleção de alvos do miR-183 e miR-494

Um dos subprojetos do nosso grupo analisou o perfil de expressão de miRNAs utilizando a tecnologia de *microarrays* em amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma mamário invasor em diferentes estádios clínicos. Os resultados mostraram miRNAs diferencialmente expressos entre tumores metastáticos e não metastáticos cujos níveis de expressão foram associados a um pior prognóstico. Destes, dois miRNAs (hsa-miR-183 e hsa-miR-494) foram selecionados para avaliação funcional *in vitro* em linhagens tumorigênicas da mama, pois regulam a expressão de vários genes, entre eles os que codificam o fator endotelial vascular e metaloproteinases de matriz, ambos associados ao fenótipo metastático.

Para busca e seleção dos genes alvos foi feita uma análise criteriosa de sequência usando os parâmetros de avaliação de conservação, cálculo de estabilidade termodinâmica RNAm por energia livre de Gibbs (MFE), além dos sítios de conservação na região 3'UTR. Tais parâmetros foram avaliados por meio da utilização de algoritmos amplamente utilizados para predição e validação de genes alvos de miRNAs. São eles: *miRanda* (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), *miRWalk* (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/micrornapredictedtarget.html>), *RNAhybrid* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>), *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>).

Foram selecionados genes preditos para cada miRNA avaliado, dos quais as funções estavam associadas aos processos biológicos, tais como proliferação, migração, invasão e apoptose e que apresentaram a maior probabilidade de ter uma sequência alvo para o miR-183 ou miR-494. Na lista inicial de genes alvos preditos foram considerados apenas aqueles observados em três ou mais algoritmos diferentes de predição de genes alvos para miRNAs.

5.3 Linhagens celulares tumorais de mama

Nesse trabalho foi utilizado um painel de linhagens celulares tumorigênicas de mama: MCF-7 (tipo luminal A), T47D (tipo luminal A), SK-BR3 (tipo HER2), BT-20 (tipo HER2), Hs578T, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (tipo triplo negativo), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rui Manuel Reis, da Universidade do Minho, Portugal e atual coordenador do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos. Na tabela 1, apresenta um resumo destas características que permite a classificação destas linhagens dentre os subtipos moleculares do câncer de mama (“luminal A, luminal B, HER2 overexpressing e triplo negativa”) baseada na expressão dos receptores hormonais (estrógeno (RE) e progesterona (RP)) e antígeno HER2. Todas estas informações foram obtidas partir da ATCC (*The Global Bioresource Center* <http://www.atcc.org/>), COSMIC (*Catalogue of somatic mutations in cancer* <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>). Além disso, um estudo recente do nosso grupo realizou a avaliação da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67, receptores hormonais RE, RP e produto do oncogene *HER2* no painel de linhagens celulares de carcinoma mamário humano utilizadas neste trabalho para melhor caracterizar os nossos clones (tabela 2)⁵⁸.

Tabela 1- Características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama.

Linhagem	Tipo histológico	***Receptores	**Mutações	***Subtipo Molecular
MCF-7	Ductal	*RE+/RP+/HER2-	CDKN2A;PIK3CA	Luminal não HER
T47D	Ductal	RE+/RP+/HER2-	P53/PI3KCA	Luminal não HER
BT-20	Ductal	RE-/RP-/HER2+	CDKN2A;PIKCA; TP53	HER-2 overexpressing
SK-BR3	Ductal	*RE-/RP-/HER2+		HER-2 overexpressing
Hs578T	Dcutal	RE-/RP-/HER2-	CDKN2A;PIKR1; HRAS;TP53	Triplo negativa
MDA-MB-231	Ductal	*RE-/RP-/HER2-	CDKN2A;BRAF; KRAS;TP53;NF2	Triplo negativa
MDA-MB-468	Ductal	RE-/RP-/HER2-	PTEN;RB1;SMAD4;TP53	Triplo negativa

* Subik K, 2010

** COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer

*** Monografia:⁵⁸**Tabela 2-** Classificação das linhagens celulares de carcinoma mamário humano aos subtipos moleculares correspondentes por painel imunocitoquímico.

Linhagem celular	RE	RP	HER2	KI67	Porcentagem para KI67	Subtipo molecular
T47D	+	+	-	+	100%	Luminal A
MCF-7	+	+	-	+	95%	Luminal A
MCF7AZ	+	+	-	+	90%	Luminal A
H5578T	-	-	-	+	90%	Triplo negativo
BT-20	-	-	+	+	90%	HER2 +
MDA-MB-468	-	-	-	+	100%	Triplo negativo
MDA-MB-231	-	-	-	+	100%	Triplo negativo
SKBR-3	-	-	+	+	30%	HER2 +

Fonte: Referência⁵⁸.

Todas as linhagens celulares deste estudo foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado (SBF). As células foram colocadas em frascos de cultivo

com 25 cm² de área cultivável a uma temperatura de 37° C em uma atmosfera com 5% de CO² para obtenção de uma monocamada celular confluenta.

5.4 Extração do RNA total

Para a extração de RNA total, cerca de 5×10^4 células foram semeadas e cultivadas até atingir 80% de confluência. As células foram inicialmente lavadas duas vezes com PBS 1X (*Gibco, Invitrogen*) e então ressuspensas em 1 ml de Trizol (*Ambion*) para posterior incubação no gelo por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 200µl de NaCl 0,9% estéril, clorofórmio 100% (*Merck Millipore*) e as amostras foram então submetidas a centrifugação a 4°C por 15 minutos a 1200xg. O sobrenadante, o qual contém o RNA total obtido, foi transferido para um novo tubo eppendorf estéril com auxílio de uma pipeta e foi adicionado 500 µl de isopropanol 100% gelado (*Merck Millipore*) e incubado *overnight* a -20°C para precipitação do RNA total. Após a incubação foi realizada uma centrifugação a 4°C por 10 minutos e 1200xg. Após a centrifugação o isopropanol foi descartado. O *pellet* ou botão de RNA total foi lavado com 1 ml de etanol 75% (*Merck Millipore*) gelado e em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação novamente a 4°C por 5 minutos e 7500xg. Estes passos de lavagem foram repetidos três vezes e o excesso de etanol foi retirado. O tubos então foram deixados invertidos na bancada por cerca de 25 minutos para total evaporação do etanol restante. Finalmente o pellet ou botão de RNA total foi dissolvido com 15 µl água estéril livre de RNase. O RNA total extraído foi armazenado em freezer a -80°C até o momento de sua utilização.

5.5 Avaliação da quantidade e qualidade do RNA total

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (*NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA*) sendo que 1U A₂₆₀ corresponde a 40ug de RNA/mL. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes (A₂₆₀/A₂₃₀ ~1,8) e de proteínas (A₂₆₀/A₂₈₀ = 1,8-2,0).

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluidica (*On-Chip electrophoresis*) utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent*

(*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) e com os RNA Nano Chips (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) (Figura 3).

Antes de iniciar o preparo do gel para eletroforese, todos os reagentes, que até o momento estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. Para limpeza dos eletrodos, aplicou-se cerca de 400µL de RNaseZap (*Life Technologies*), seguido de água no cartucho de lavagem e o mesmo foi inserido no aparelho com a tampa abaixada por 1 minuto. Em seguida o cartucho foi retirado e a tampa aberta para secagem dos eletrodos durante a preparação do chip.

Decorrido o tempo de 30 minutos de descongelamento dos reagentes, iniciou-se o preparo do gel, em que adicionou-se 650µL do RNA Nano gel (*Agilent Technologies*) numa coluna com filtro fornecida pelo próprio kit e centrifugou-se por 10.000g, durante 15 minutos em temperatura ambiente. O gel foi aliquoteado em tubos de 0,2mL com 45µL cada e armazenados a -30 ° C até o momento de uso. Em uma alíquota de 45µL em um tubo 0,2µL livre de nuclease, foi adicionado 2µL de RNA 6000 Nano Dye (*Agilent Technologies*), levou-se ao vórtex por 10 segundos e depois centrifugou-se a 13.000g por 10 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano chip que foi colocado no *priming station* (*Agilent Technologies*) (Figura 2 etapa 1) com os ajustes corretos para leitura de RNAs. Primeiramente adicionou-se 9µL da mistura do gel/dye na região G indicada no chip e, com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station*, distribuiu-se o gel por todo o chip. Em seguida, adicionou-se outros 9µL da mistura nos demais pontos indicados com a letra G. Adicionou-se 9µL da Nano RNA conditioning solution (*Agilent Technologies*) na posição marcada como CS e ainda 1µL de marcador ou ladder (*Agilent Technologies*) na posição indicada e 5µL de RNA Nano Marker (*Agilent Technologies*) em cada uma das 11 posições para amostras, bem como na posição do marcador. Por último, as amostras foram denaturadas a 70°C por 2 minutos para evitar formação de estruturas secundárias e adicionou-se 1µL de cada amostra nos respectivos poços marcados de 1 a 11. Com a ajuda do vórtex IKA MS3 (Manca, Hong Kong, CHIN), agitou-se o chip horizontalmente a 2.200 rpm por 1 minuto e, em seguida, colocou-se o chip no bioanalisador (Figura 2 etapa 2). Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* (*Agilent Technologies*) obteve-se o resultado por meio da análise do eletroferograma e densitometria dos géis (Figura 2 etapa 3). A figura 2 mostra

o fluxo de trabalho para preparação dos chips e posterior análise da eletroforese microfluidica no *Bioanalyzer*.



Figura 2- Fluxograma para preparação do RNA *Nano Chip*. Utilização do equipamento *Bioanalyzer 2100 Agilent*, para avaliação das amostras de RNA total.

5.6 Avaliação da expressão dos miRNAs miR-183 e miR-494 nas linhagens tumorais

A avaliação do padrão de expressão tanto do miR-183 quanto do miR-494 foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real. Esta técnica é dividida em duas etapas: transcrição reversa e a reação de PCR em tempo real.

A transcrição reversa, conhecida como síntese do cDNA, foi realizada utilizando-se o kit *TaqMan Small RNA Assays (Life Technologies)*, conforme orientação do fabricante. As reações de síntese dos cDNAs foram preparadas a partir de 10ng de RNA total em 5 μ l, 0,15 μ l de dNTP (100mM), 1 μ l de enzima *Multiscribe (50 U/ μ L) (Life Technologies)*, 1,5 μ l de 10x *RT buffer (Life Technologies)*, 0,19 μ l de *Rnase inhibitor (20 U/ μ L) (Life Technologies)*, 3 μ l do primer do microRNA de interesse, 4,16 μ l de água RNase-free (*Life Technologies*). A reação de transcrição reversa foi possível com o auxílio de um termociclador (*MasterCycle-Eppendorf*) em que as amostras foram submetidas as seguintes ciclos de temperatura: 16°C por 30 minutos, 42°C durante mais 30 minutos e finalmente a 85°C durante 5 minutos. Logo em seguida o cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

A segunda etapa consiste da reação de PCR em tempo real, em que os cDNAs obtidos foram misturados em placas de 96 poços a : 5 μ l de 1x *TaqMan Universal PCR Master Mix II (Life Technologies)*, 2,5 μ l de água RNase-free (*Life Technologies*) e 0,5 μ l da sonda *TaqMan (125nM)* com o primer específico de cada miRNA (*Life Technologies*) correspondente ao

primer utilizado na primeira etapa. O volume final da reação foi otimizado para 10 μ l e os experimentos foram realizados em triplicata técnica. Logo em seguida as placas foram inseridas no aparelho *7900 HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA)* e submetida às seguintes condições de ciclagem: Estágio 1, 10 minutos a 95°C; Estágio 2, 40 repetições de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

5.7 Superexpressão e silenciamento do miR-183 e miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário

A fim de avaliar o papel dos miRNAs no fenótipo metastático, realizamos ensaios funcionais de superexpressão e silenciamento do mi-183 e miR-494 utilizando como modelo linhagens celulares de carcinoma mamário humano. Primeiramente foi realizada uma seleção das linhagens celulares de carcinoma mamário humano que apresentaram os maiores e os menores níveis de expressão do miR-183 ou miR-494.

Nestas linhagens foram realizados a expressão ectópica e o silenciamento do miR-183 e do miR-494 por meio de oligonucleotídeos, *mirVana Mirna mimics e Anti-miR™ miRNA Inhibitors* respectivamente (*Life Technologies*). A transfecção *in vitro* foi realizada utilizando-se o kit *siPORTNeoFX Transfection Agent (Ambion)*, o qual é conhecido por realizar a transfecção reversa, ou seja, simultaneamente ocorre a transfecção e o cultivo celular, como mostrado na figura 3 (*Life Technologies*).

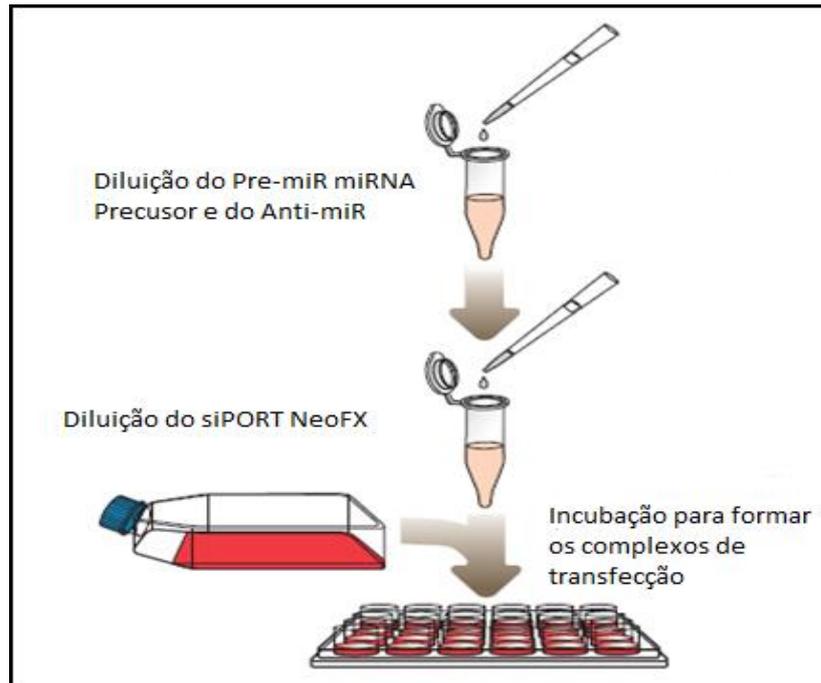


Figura 3- Transfecção Reversa utilizando *siPORT NeoFX Agent*. Adaptado de *Life Technologies*.

O ensaio de transfecção foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração utilizada dos precursores e inibidores foi de 20nM e a transfecção foi testada em três tempos: 24, 48 e 72 horas.

As células foram soltas utilizando 500ml de tripsina (*Gibco, Invitrogen*) por 3 minutos antes da transfecção e mantidas em banho-maria a 37°C. Enquanto isso realizou-se a diluição de 5ul do agente de transfecção em 95 µl de meio *Opti-MEM* (*Life Technologies*), 2,5 µl inibidores ou mimics em 97,5 µl de meio *Opti-MEM* (*Life Technologies*) e foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita novamente outra diluição utilizando de 450 µl do agente de transfecção anteriormente diluído em 450 µl de meio *Opti-MEM* e 150 µl do inibidor ou precursor anteriormente diluído em 150 µl do agente de transfecção também diluído anteriormente. Foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a formação dos complexos de transfecção. Esta mistura de agente de transfecção e inibidor ou mimic foi adicionado em uma placa de 6 *wells* junto com 5×10^5 de células. As placas contendo as células transfectadas foram incubadas em estufas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Ao final, foi realizada a extração do RNA total utilizando o reagente Trizol (*Ambion*) e a expressão dos miRNAs e do genes alvos foram avaliados por PCR em Tempo Real utilizando o equipamento HT 7900 (*Life Technologies*).

5.8 Ensaio de proliferação, migração e invasão celular com *xCELLigence system*

A capacidade de proliferação, migração e invasão das linhagens celulares de carcinoma mamário antes e após os ensaios funcionais com os miRNAs foi analisada *in vitro* em tempo real utilizando a metodologia *xCELLigence system* (Roche Applied Science).

O princípio básico deste sistema é monitorar o estado biológico das células em tempo real por meio da impedância do eletrodo, ou seja, o número de células, a viabilidade, morfologia e grau de adesão de células que em contato com os eletrodos irão afetar o ambiente local iônico levando a um aumento na impedância do eletrodo (Roche Applied Science). Para os ensaios de viabilidade celular foram utilizadas placas denominadas E-Plate (Roche Applied Science) 16 e para os ensaios de migração e invasão celular as placas CIM-Plate 16 (Roche Applied Science) que contem insertos e uma barreira de matrigel somente para os ensaios de invasão celular.

Um dia antes do ensaio, 100µl de matrigel (BD biosciences) foi diluído em 900µl de meio sem SFB (Gibco, Invitrogen) e adicionado 50µl na câmara superior da placa CIM-Plate 16 e imediatamente foram removidos 30 µl, permanecendo apenas 20µl de matrigel em cada poço da câmara superior. A placa foi armazenada na estufa a 37°C até no momento de sua utilização. No dia seguinte, na câmara inferior foi adicionado 160µl meio de cultura suplementado com 10% SFB que atua como um quimioatrativo para a migração e/ou invasão das células em cultura (Figura 4 etapas 2 e 3). Em seguida a câmara superior foi encaixada na câmara inferior e adicionado 30µl de meio sem SFB (Figura 5 etapas 4 e 5). Já na placa E-Plate 16 foram adicionados 100µl meio de cultura suplementado com 10% SFB (1) (Figura 5). As placas foram levadas ao aparelho *RTCA DP Analyzer* e ficaram incubadas por 1 hora a 37°C para permitir que a superfície da membrana se equilibre com meio.

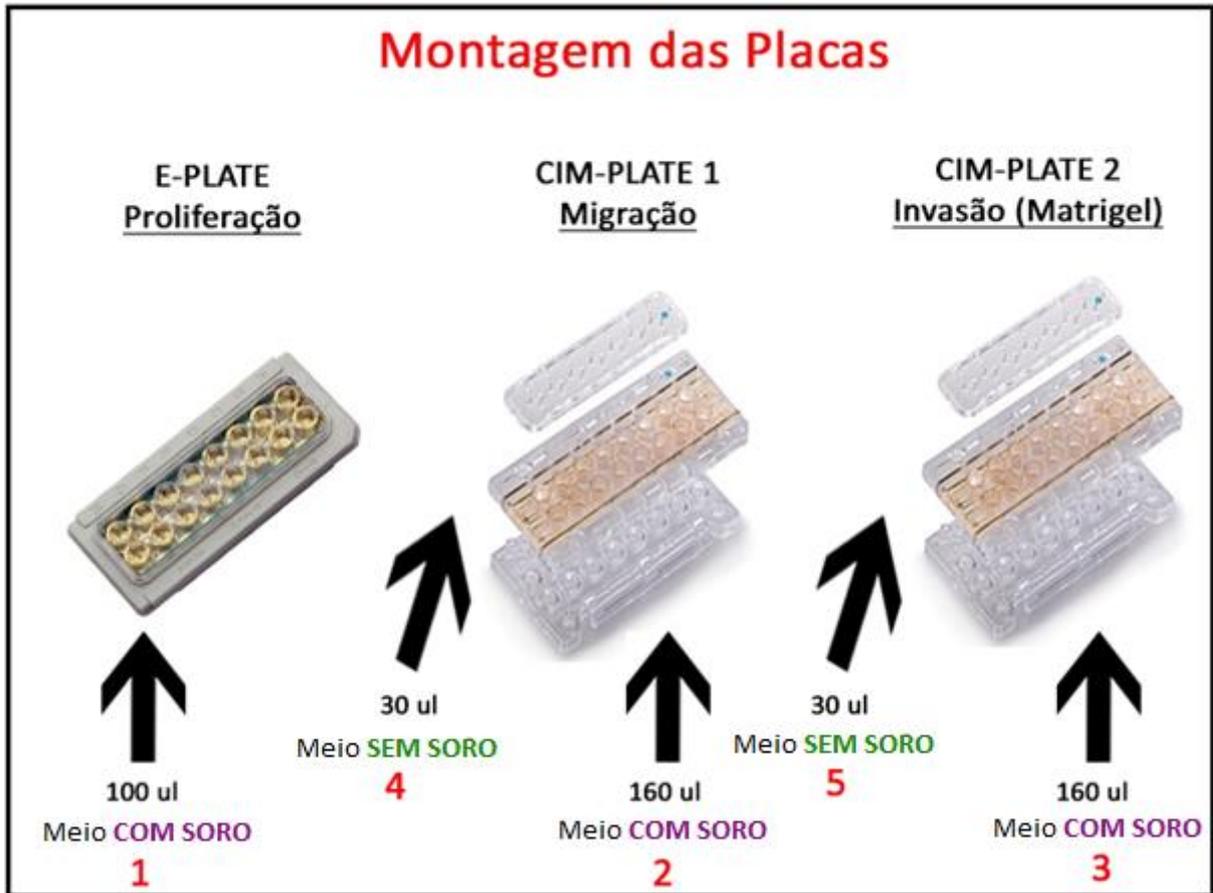


Figura 4- Esquema de montagem das placas de proliferação, migração e invasão utilizando o sistema em tempo real, *xCELLigence system*.

Em seguida 2×10^4 das linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-468 e MCF-7 foram semeadas na câmara superior das placas CIM-Plate e para placa E-Plate 6×10^3 e 8×10^3 das linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-468 respectivamente e 8×10^3 da linhagem MCF-7. As placas foram acondicionadas novamente ao aparelho *xCELLigence* e mantidas em estufa a 37°C por 48 horas para ensaios de invasão e migração e por 7 dias para os ensaio de proliferação. Os resultados obtidos no *xCELLigence* são plotados sob a forma de gráfico gerados ao final das leituras de cada ensaio onde é possível de avaliar o index de proliferação, migração e invasão celular ao longo do tempo.

5.9 Avaliação da expressão das proteínas por *Western Blot*

As células transfectadas com os miRNAs foram homogeneizadas em 70 μl de tampão RIPA (50 mM Tris (pH7.6–8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10mM NaF, 10 mM *sodium pyrophosphate*, 1% NP-40) contendo 10 μl de cada inibidor de protease (EDTA, PMSF,

Aprotinina, Leupeptina e DTT), e então incubadas no gelo por 1 hora. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação de 13000 rpm a 4°C por 15 minutos. Após a quantificação das proteínas usando o reagente Bradford (*SIGMA-ALDRICH*), quantidades semelhantes de proteína total de cada amostra foram utilizadas para o ensaio de acordo com a protocolo do fabricante (*SIGMA-ALDRICH*). Para a separação das proteínas, foi utilizado SDS-PAGE 15%, a corrida foi feita em sistema *BIORAD* por aproximadamente 2 horas submetidas a uma voltagem de 110V. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi feita pelo sistema *Trans-Blot® Turbo Transfer System* (*BIORAD*) por 30 minutos, com voltagem de 25V. Posteriormente, o bloqueio da membrana foi realizado em tampão TBST 1X (3 Tris-HCl, pH 7.6, Tween 20 0.1% (*SIGMA-ALDRICH*)) com 5% de leite molido por 1 hora à temperatura ambiente e, então, lavou-se a membrana por imersão e agitação com TBST 1X. Logo após a lavagem, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo primário diluído em TBST 1x com 5% de BSA (*SIGMA-ALDRICH*) (tabela 3). A incubação foi realizada por 1 hora sob agitação e então a membrana foi lavada 3 vezes com TBST 1X por 5 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora e a membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência ECL (*GE Healthcare*). A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada no sistema de fotodocumentação *Image Quant LAS 4000 mini* e posteriormente as bandas marcadas foram analisadas e quantificadas utilizando o software *Image J*, obtendo o índice de densidade óptica de cada anticorpo utilizado. A normalização foi feita utilizando os endógenos β -actina e β -tubulina.

Tabela 3- Relação das proteínas utilizadas na técnica de *Western Blot*

Proteína	Anticorpo Primário	Fabricantes e		KDa	Diluição	Anticorpo Secundário
		códigos dos anticorpos				
Rb1	Rb	Santa Cruz Biotechnology sc-102		106	1:500	Anti-Mouse Cell Signaling Technology 7076P2
Erg	Erg-1/2/3	Santa Cruz Biotechnology sc-353		1: 38 2: 49 3: 55	1:500	Anti-Mouse Cell Signaling Technology 7076P2
VEGF 165B	Mouse Monoclonal VEGF 165B	Abcam Ab14994		23	1:500	Anti-Mouse Cell Signaling Technology 7076P2
MAPK (Erk1/2)	Monoclonal MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling Technology 137F5		42	1:500	Anti-Rabbit Cell Signaling Technology 7074P2
β - Tubulina	Monoclonal β - Tubulin	Cell Signaling Technology 2146S		55	1:5000	Anti-Rabbit Cell Signaling Technology 7074P2
β - Actina	Monoclonal β - Actin	Cell Signaling Technology 8H10D10		45	1:5000	Anti-Mouse Cell Signaling Technology 7076P2
Akt (pan)	Akt	Cell Signaling Technology C67E7		60	1:500	Anti-Rabbit Cell Signaling Technology 7074P2

5.10 Análise Estatística dos dados

A expressão relativa de cada microRNA foi calculada pela análise comparativa do gene alvo com o do controle interno RNU 48 *Control miRNA Assay* (Life Technologies, USA), utilizando o método comparativo de $\Delta\Delta CT^{59}$, no programa R versão 3.0.1 (<http://www.r-project.org>) para determinação das respectivas quantificações relativas. Como normalizador, utilizamos o valor máximo de expressão do grupo que recebeu apenas o agente de transfecção.

A diferença estatística dos miRNAs entre as linhagens foi calculada usando o teste Kruskal–Wallis e *Mean-Whitney-U-test*. Utilizamos como valor de corte o p valor $\leq 0,025$. A análise estatística foi realizada por meio do ambiente estatístico-matemático R. O ambiente R é uma linguagem de programa, de domínio público, livre, que pode ser utilizado para análise de dados em geral.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Busca *in silico* para seleção de alvos do miR-183 e miR-494

A primeira etapa deste trabalho consistiu em realizar a busca *in silico* de RNAm alvos para estes dois miRNAs utilizando os algoritmos descritos na metodologia deste projeto. As análises *in silico* apontaram inicialmente 3975 alvos para miR-183 e 5629 alvos para o miR-494. A partir destes selecionamos 6 alvos principais para cada miRNA baseado na sua função biológica para o início e progressão da tumorigênese.

A Figura 5 ilustra a rede de interação do miR-183 e miR-494 com os seus principais genes alvos obtidos pelos programas *miRanda*, *miRWalk*, *RNAhybrid* e *TargetScan*, *DIANAmT*, *miRDB*, *PITA* e *RNA22*.

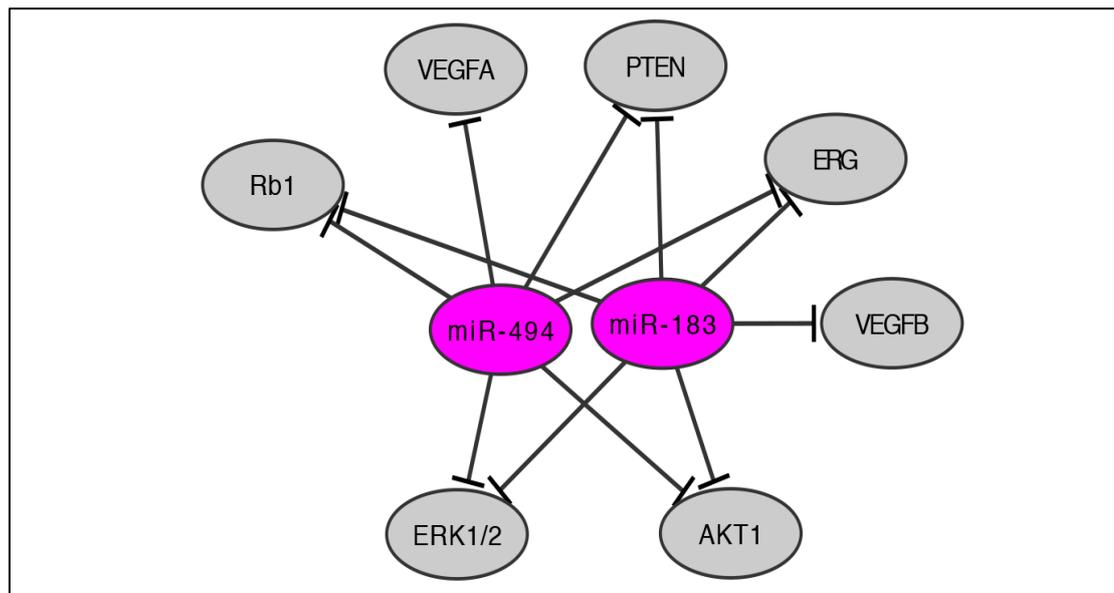


Figura 5- Rede de interação do miR-494 e miR-183 com seus respectivos alvos preditos, obtida pela análise de bioinformática utilizando algoritmos de predição de alvos.

Nossos resultados mostraram que miR-494 apresenta 6 importantes alvos para o processo de carcinogênese, são eles: AKT1, PTEN, VEGFA, ERK1/2, RB1, ERG1/2/3.

Similarmente para o miR-183 foi possível observar que este parece regular importantes genes alvos para o processo de carcinogênese como: VEGFB, PTEN, AKT1, ERK1/2, ERG1/2/3 e RB1.

6.2 Avaliação da integridade das amostras de RNA

As amostras de RNA total das linhagens celulares foram analisadas por eletroforese microfluidica utilizando o aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*. As figuras 6 e 7 mostram respectivamente a integridade das amostras que pode ser observada pela imagem do gel virtual e pelos gráficos de densitometria, nas quais podem ser observadas as frações de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAs 4-5S e também de RNAs de baixo peso molecular exibindo perfil de excelente integridade.

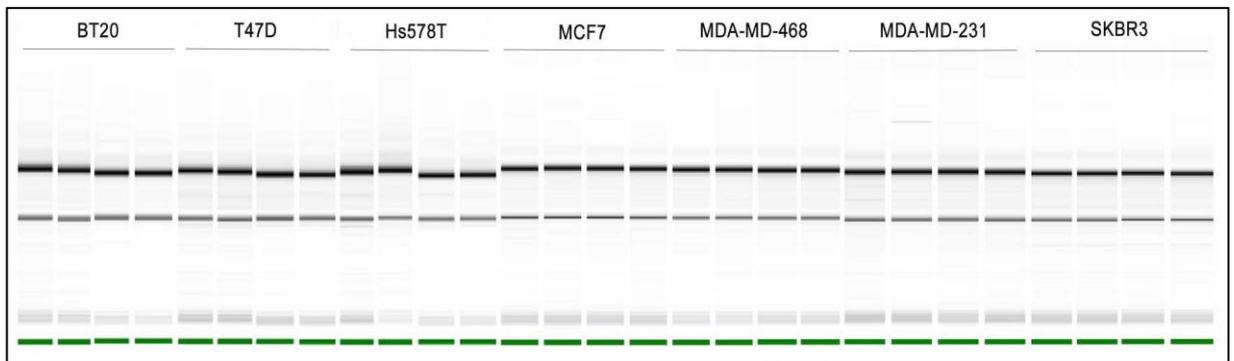


Figura 6- Gel virtual das amostras de RNAs obtidos neste estudo mostrando RNAr 28S, RNAr 18S e RNAs 4-5S.

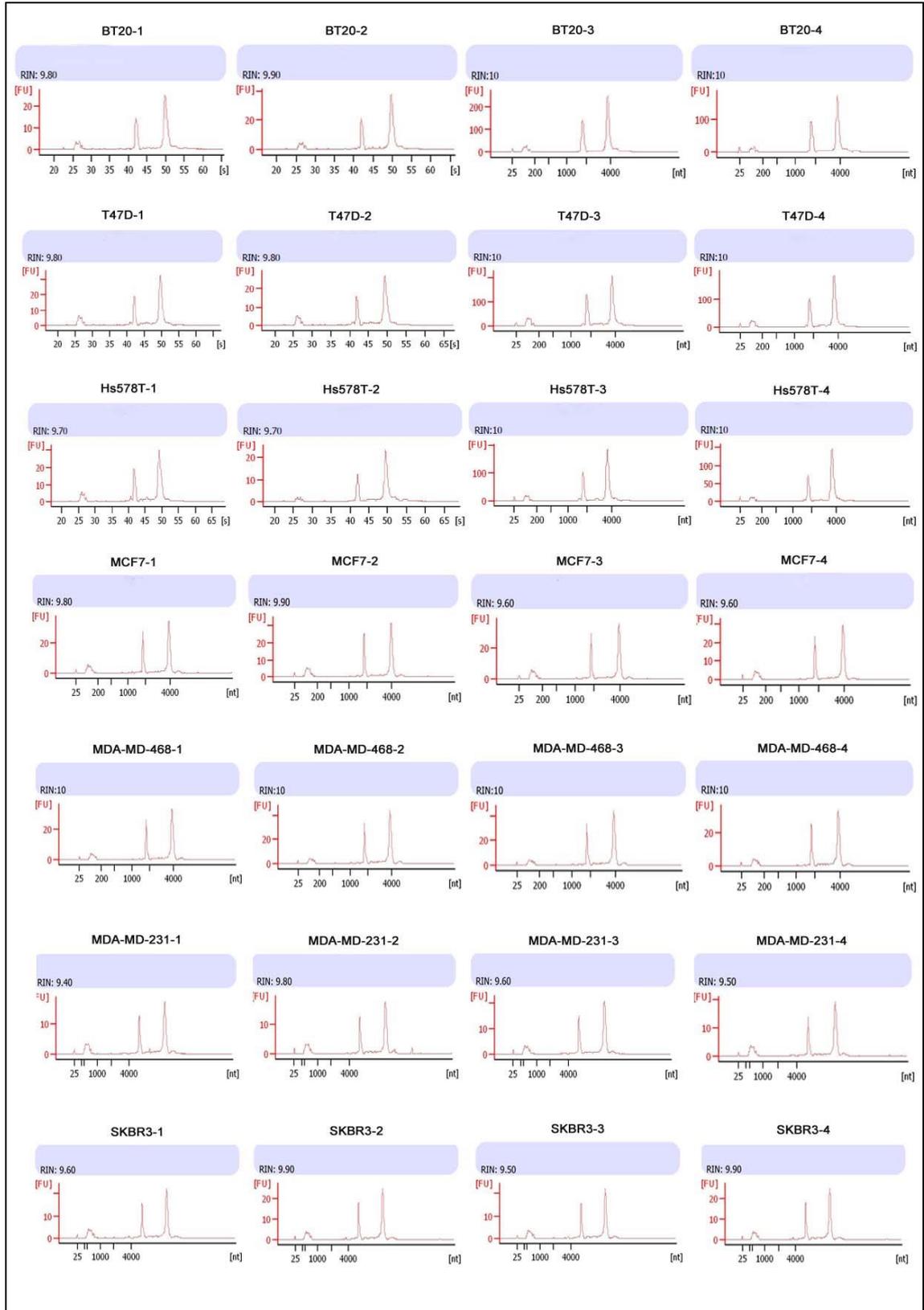


Figura 7- Densitometria das amostras de RNAs mostrando as frações de RNAr 28S, RNAr18S e RNAs 4-5S. Amostras de linhagens celulares com RIN acima de 9.0.

Foi possível observar que todas as amostras exibiram excelente qualidade após extração do RNA total comprovada pelo número de RNAs íntegros (RIN) obtido pela análise com o *bioanalyzer* (RIN acima de 9.0).

6.3 Avaliação da expressão dos miRNAs miR-183 e miR-494 nas linhagens tumorais por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Em seguida por meio a técnica de PCR em Tempo Real realizamos a avaliação da expressão do miR-183 e miR-494 nas seguintes linhagens celulares de carcinoma mamário humano: MCF7, BT-20, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D, Hs578T e MCF7-AZ (Figura 8).

A busca do miRNA a ser utilizado como endógeno normalizador foi realizada pela utilização do programa *NormFinder* que busca o endógeno de menor variação, ou seja, mais estável, entre as amostras. Selecionamos assim o RNU48, com o valor de 0,026 pois foi o que apresentou menor variabilidade entre as amostras.

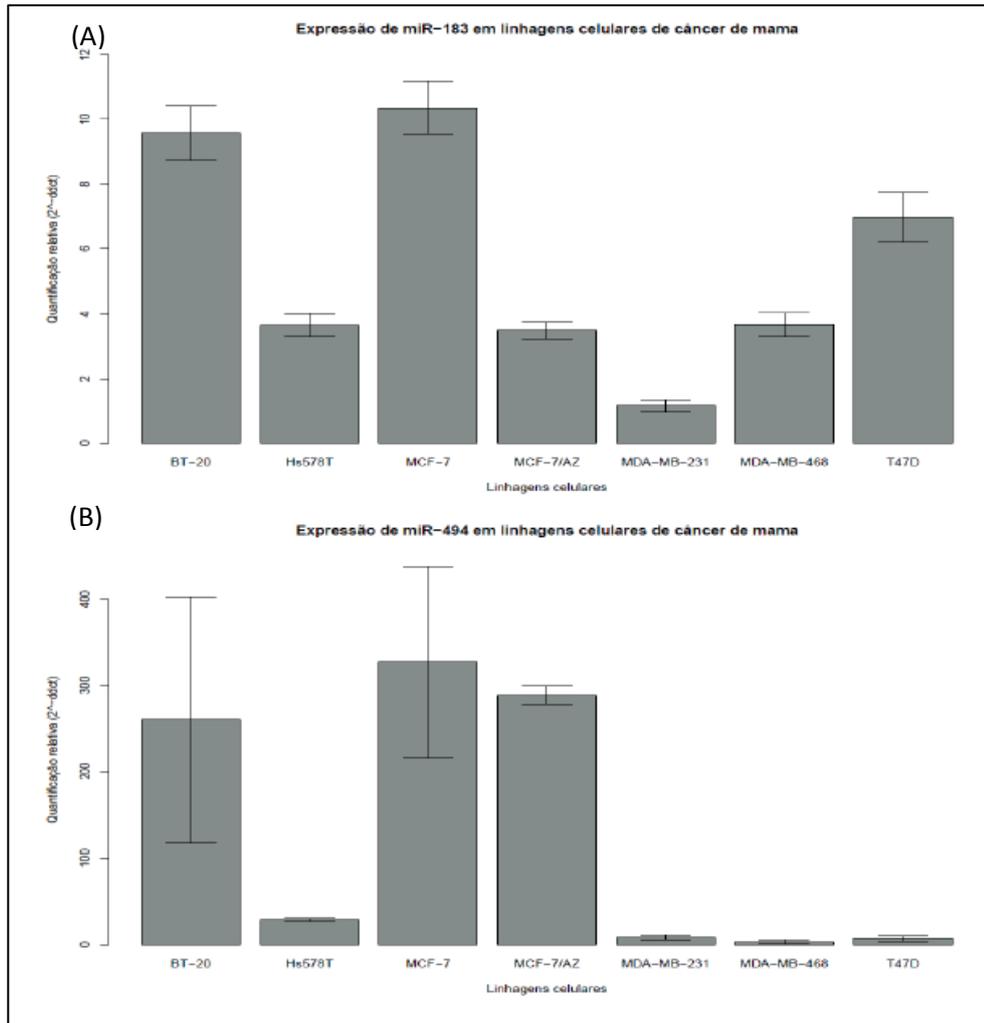


Figura 8- Valores de expressão do miR-183 (A) e miR-494 (B) obtidos por PCR em tempo real no painel de linhagens de câncer de mama.

Finalmente, a partir da comparação do nível de expressão de cada miRNA nas diferentes linhagens celulares selecionamos duas linhagens que apresentavam a menor expressão de cada miRNA para os ensaios de superexpressão e uma linhagem que apresentava a maior expressão de cada miRNA para os ensaios de silenciamento (tabela 4).

Tabela 4- Linhagens tumorigênicas de mama selecionadas para os ensaios funcionais de superexpressão e silenciamento.

	miR-183	miR-494
Superexpressão	MDA-MB-231 e MDA-MB-468	MDA-MB-231 e MDA-MB-468
Silenciamento	MCF-7	MCF-7

6.4 Ensaios funcionais de superexpressão e silenciamento do miR-183 e miR-494 em linhagens de carcinoma mamário humano.

Após a seleção de linhagens para os ensaios funcionais, avaliamos em que momento ocorre a superexpressão e o silenciamento de cada miRNA na linhagens selecionadas. Para tal, realizamos os ensaios nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção tanto com os anti-miRs quanto com os mimics em uma concentração de 20nM.

Nossos resultados mostraram que em apenas 24 horas, pode ser visualizada a superexpressão do miR-183 em relação ao agente de transfecção e o miRNA irrelevante, em ambas as linhagens selecionadas (figura 9 e 10).

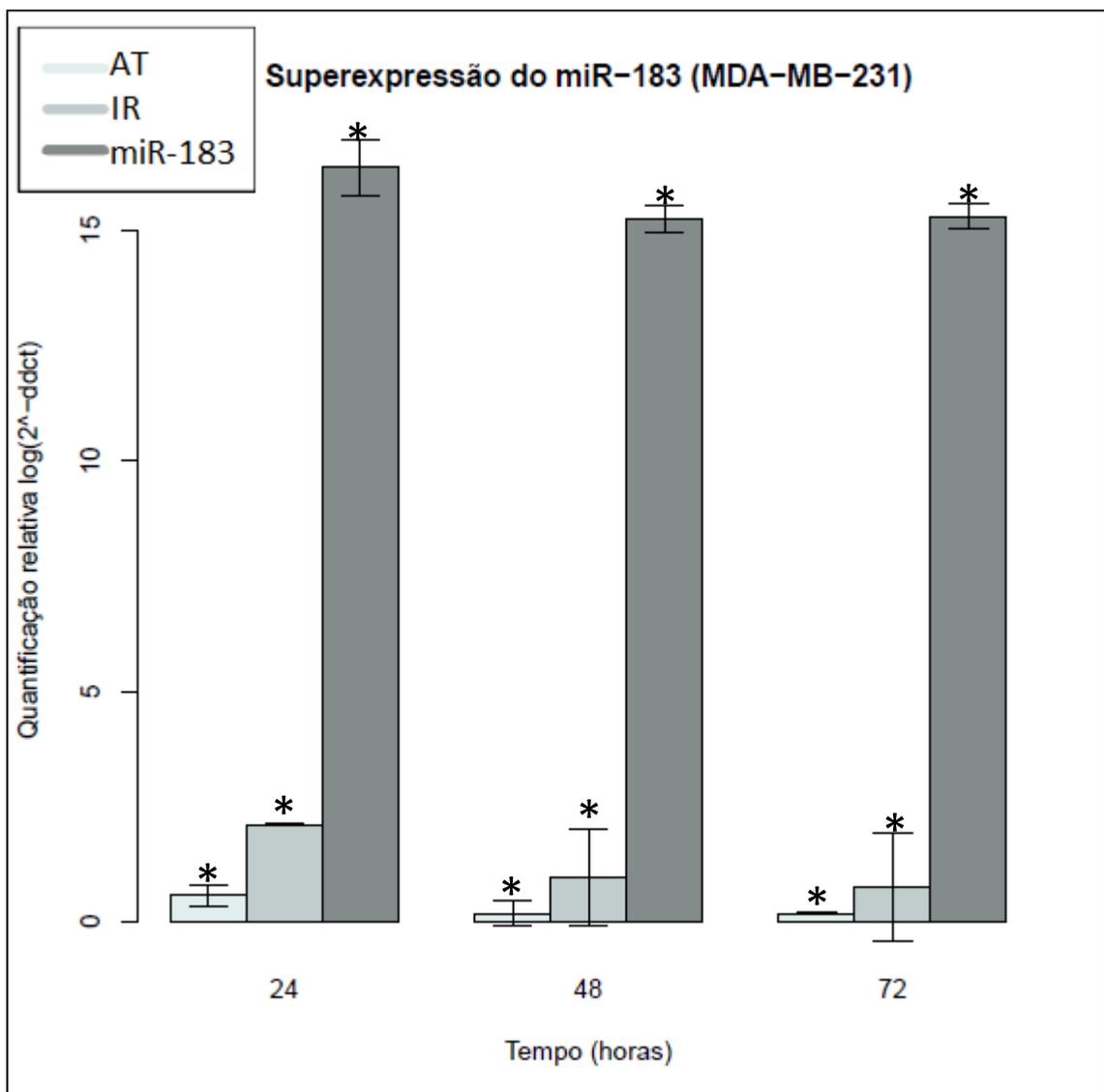


Figura 9- Avaliação quantificação relativa após a superexpressão *in vitro* do miR-183 na linhagem tumorigênica de mama, MDA-MB-231 ao longo do tempo.

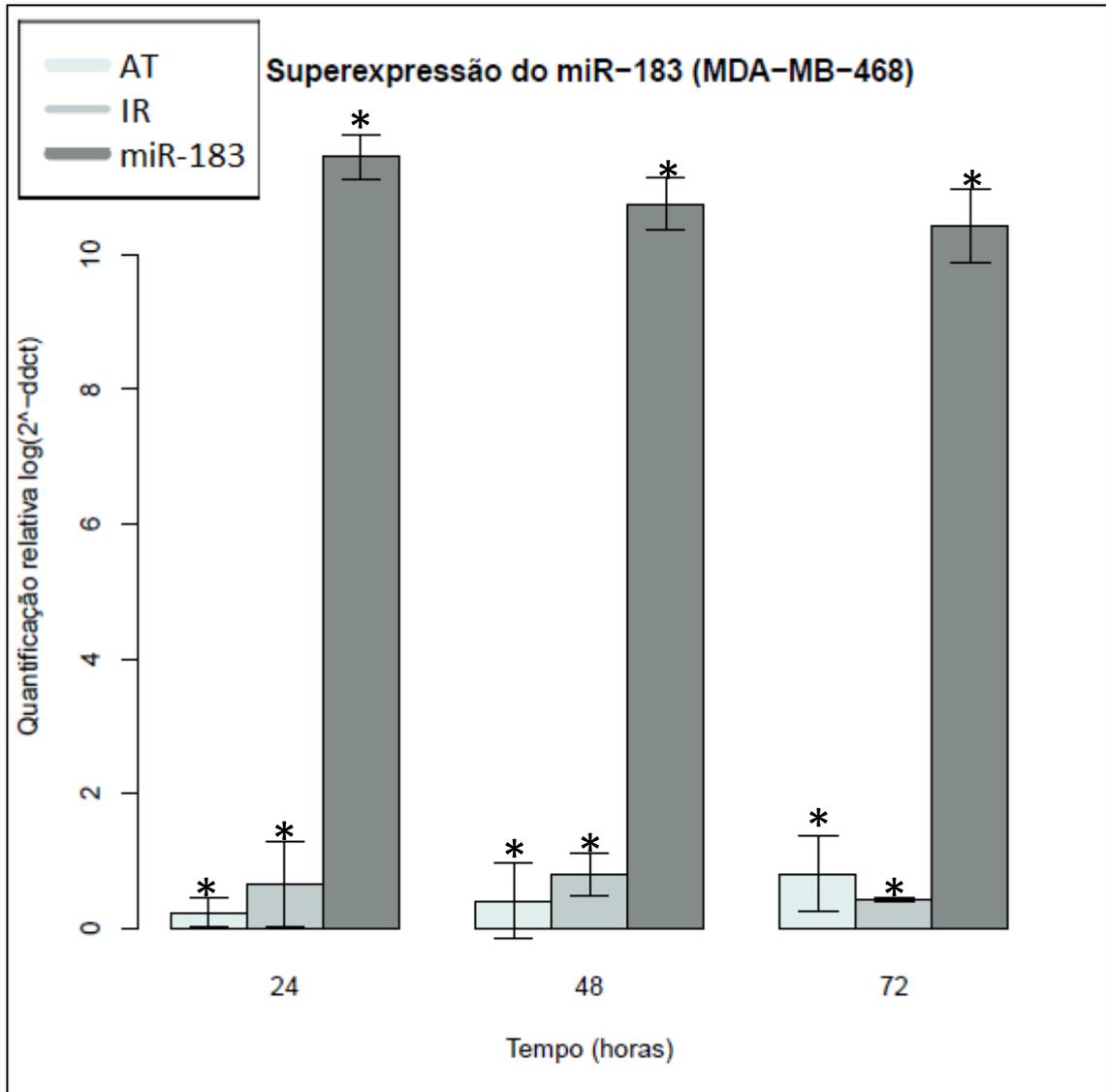


Figura 10- Avaliação da quantificação relativa após a superexpressão *in vitro* do miR-183 na linhagem tumorigênica de mama, MDA-MB-468 ao longo do tempo.

Nossos resultados mostraram que utilizando a técnica de PCR em tempo real foi possível confirmar que após a transfecção *in vitro* houve um aumento de cerca de 10 vezes no nível de expressão do miR-183, em relação as células transfectadas com os controles (agente de transfecção e miRNA irrelevante) após 24hs com significância estatística ($p \leq 0,05$).

Em paralelo realizamos ainda os ensaios de transfecção para superexpressão do miR-494 também na linhagem celular de carcinoma mamário humano MDA-MB-468 (Figura 11).

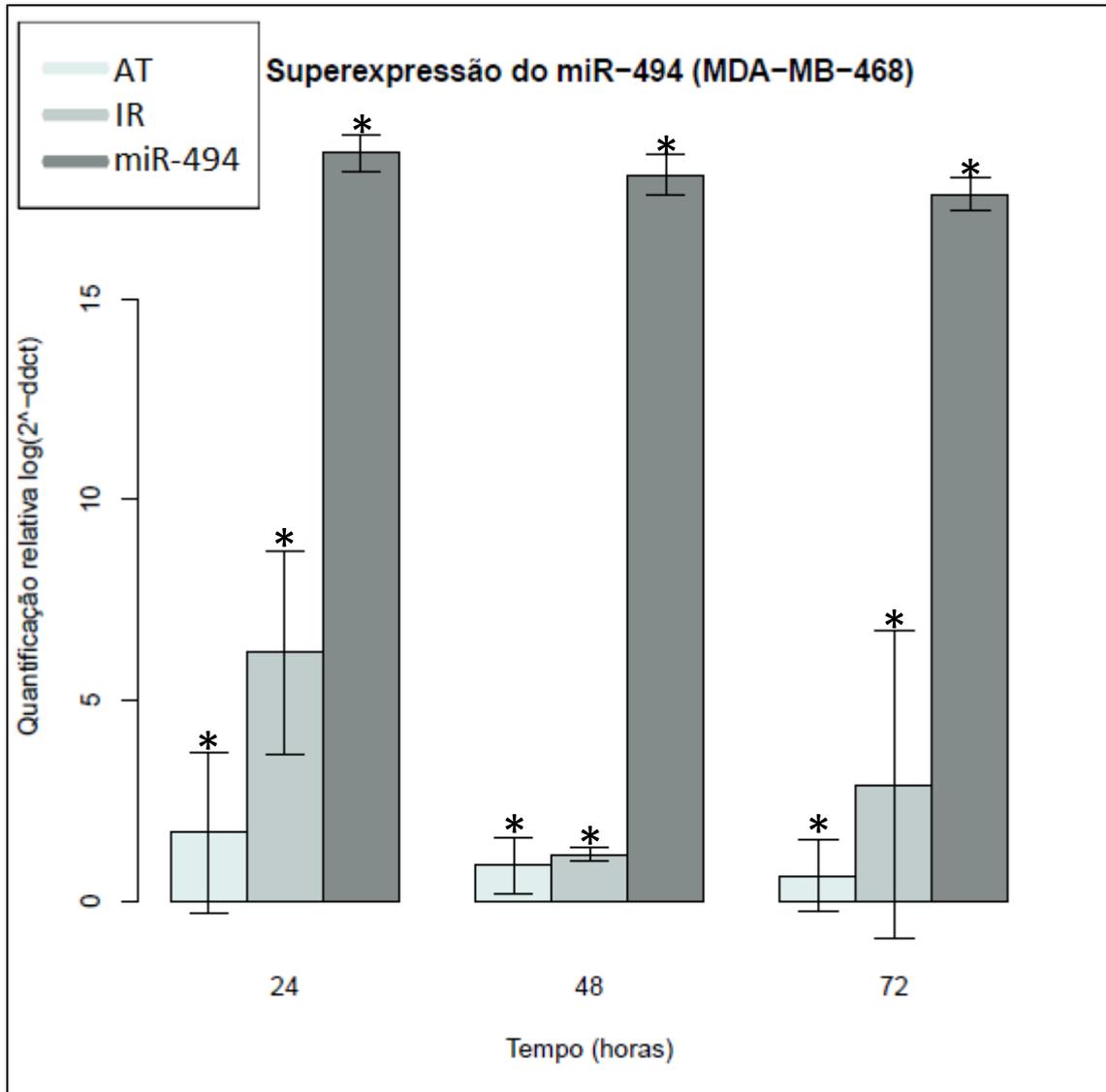


Figura 11- Avaliação da quantificação relativa após a superexpressão *in vitro* do miR-494 na linhagem tumorigênica de mama, MDA-MB-468 ao longo do tempo.

De maneira semelhante ao miR-183 nossos resultados mostraram que foi possível observar um aumento de cerca de 10 vezes o nível de expressão do miR-494 nesta mesma linhagem após 24hs de transfecção com significância estatística ($p \leq 0,05$).

Realizamos em seguida os ensaios de transfecção *in vitro* na linhagem MCF-7 para silenciamento tanto do miR-183 quanto do miR-494 .

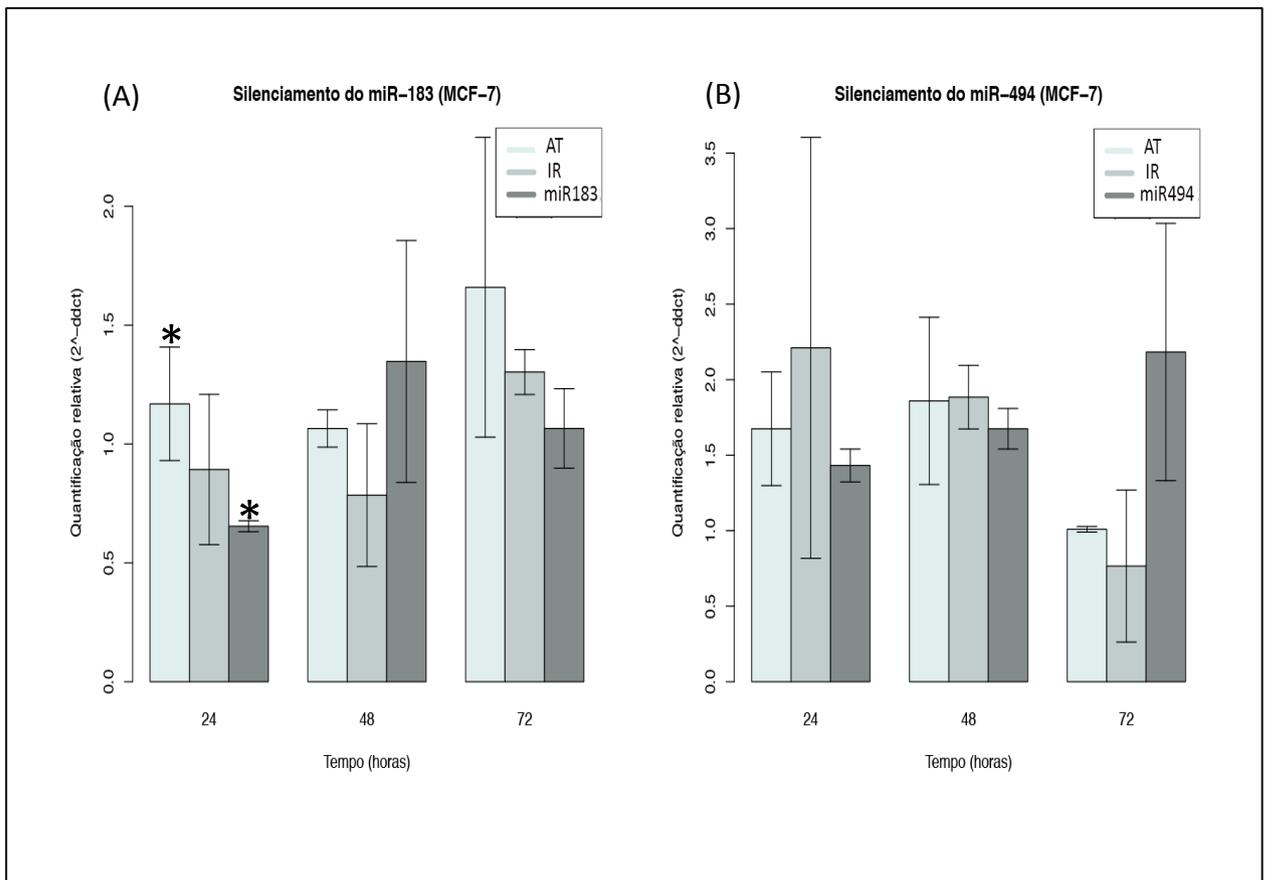


Figura 12- Avaliação da quantificação relativa após o silenciamento *in vitro* do (A) miR-183 e do (B) miR-494 na linhagem de carcinoma mamário humano MCF-7 ao longo do tempo. AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Anti-miR de interesse.

Nossos resultados mostraram que quando realizamos os ensaios de transfecção para o silenciamento do miR-183 não tiveram diferenças tão significativas para a diminuição da expressão deste miRNA. Podemos ver que houve uma discreta redução da expressão do miR-183 em 24 horas somente em relação ao agente de transfecção, com significância estatística. Além disso, nossos resultados mostraram que para o miR-494 o silenciamento *in vitro* não foi significativo ao longo do tempo (figura 12).

6.5 Avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão celular *in vitro* de linhagens tumorigênicas de mama após a superexpressão do miR-183.

A fim de avaliarmos o impacto da superexpressão *in vitro* no comportamento celular das linhagens tumorigênicas de mama, realizamos os ensaios de proliferação, migração e invasão celular *in vitro* em tempo real utilizando a plataforma *xCelligence System*. Os ensaios de proliferação celular foram acompanhados durante 0, 12, 24, 48 e 72 horas após a transfecção *in vitro*. Já os ensaios de migração e invasão celular foram acompanhados durante 0, 6, 12, 18 e 24 horas também após a transfecção *in vitro*.

A figura 13 mostra em A que a superexpressão do miR-183, na linhagem MDA-MB-231 resultou em um aumento na capacidade de *in vitro* proliferação após 12, 24 e 48 horas da transfecção *in vitro* com significância estatística.

Em relação capacidade de migração *in vitro*, a figura 13 B mostra que após a superexpressão *in vitro* do miR-183 houve um aumento a partir de 6 horas pós-transfecção, quando comparada com as células transfectadas apenas com agente de transfecção ou irrelevante.

Finalmente quando mensuramos o impacto da superexpressão do miR-183 na invasão *in vitro* nesta mesma linhagem, observamos que não houve diferenças significativas para a célula (Figura 13C).

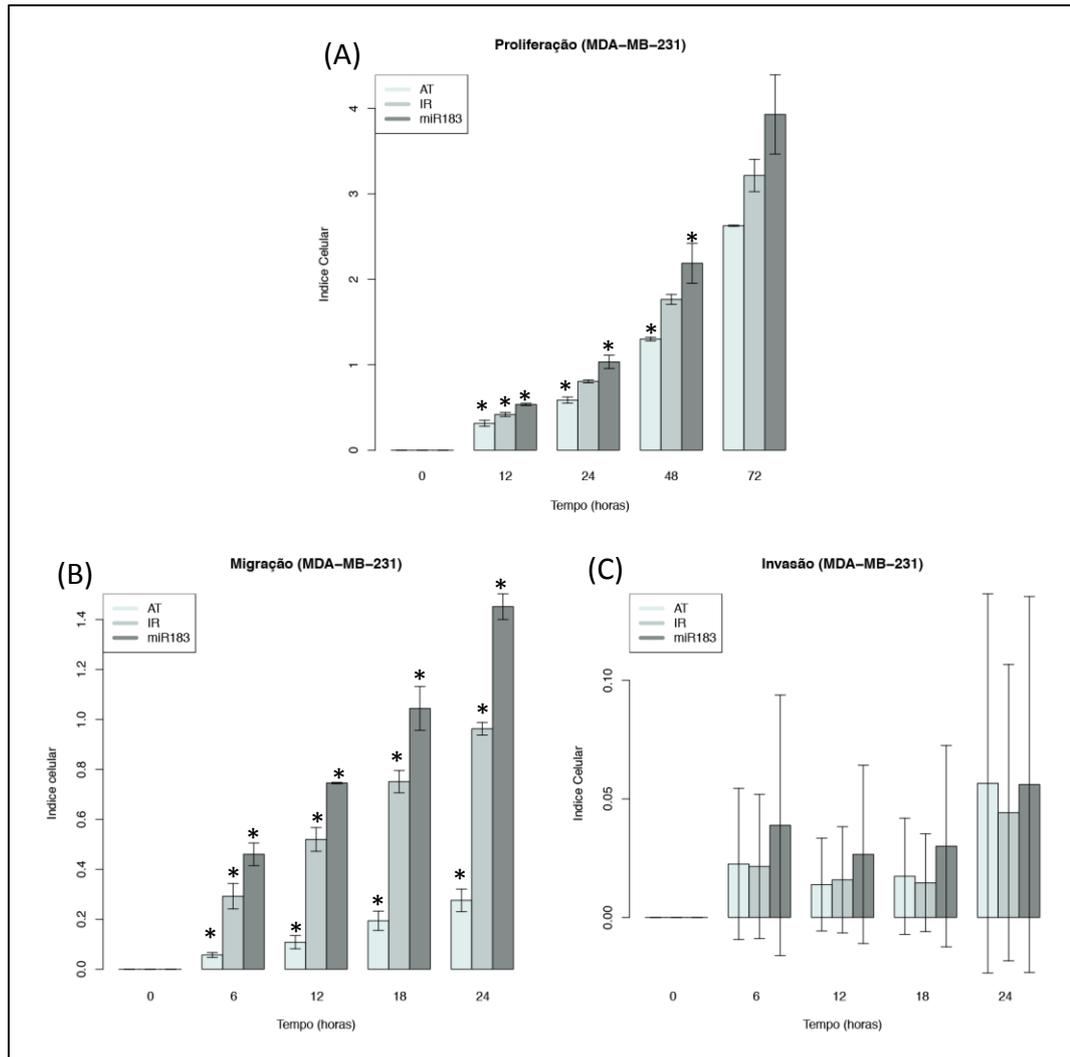


Figura 13- Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração(B) e invasão(C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-183 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-231 ao longo do tempo ($p \leq 0,025$). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

A fim de melhor elucidar o potencial papel do miR-183 na carcinogênese da mama, realizamos estes mesmos ensaios celulares utilizando outra linhagem tumorigênica de mama, a linhagem MDA-MB-468.

Nossos resultados mostraram que a superexpressão deste miRNA *in vitro* levou a diminuição da capacidade de proliferação celular após 48 horas de transfecção (Figura 14A). Observamos ainda que o aumento da expressão deste miRNA ocasionou uma diminuição na capacidade de migração celular a partir de 12 horas pós-transfecção com significância estatística. No entanto este efeito pode ser melhor observado após 18 horas se estendendo

até 24 horas após a transfecção *in vitro* (Figura 14B). Finalmente, nossos resultados mostraram que o aumento da expressão deste miRNA também ocasionou um aumento na capacidade de invasão *in vitro* da linhagem MDA-MB-468 após 18 horas de transfecção *in vitro* (Figura 14C). Este resultado é bastante interessante e peculiar para esta linhagem pois diferente da linhagem MDA-MB-231 o aumento da expressão deste miRNA parece exercer grande impacto no comportamento destas células no que diz respeito tanto a proliferação quanto migração e invasão celular *in vitro*.

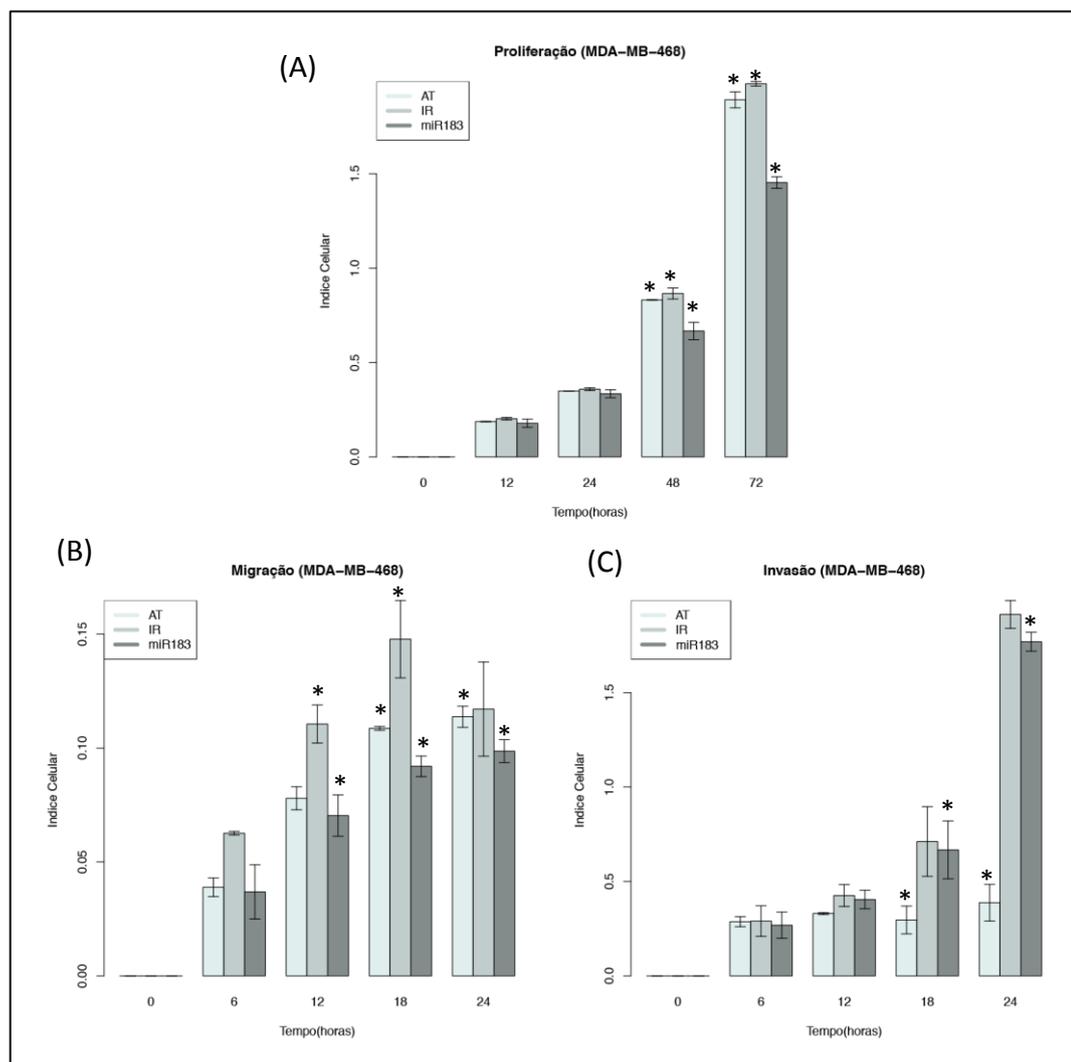


Figura 14- Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração(B) e invasão (C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-183 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-468 ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,025$). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

6.6 Avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão celular *in vitro* de linhagens tumorigênicas de mama após a superexpressão do miR-494.

Considerando o potencial papel do miR-494 na carcinogênese da mama também realizamos ensaios funcionais *in vitro* para avaliar o impacto do aumento da expressão deste miRNA no comportamento celular de linhagens tumorigênicas da mama.

Nossos resultados mostraram que curiosamente o aumento da expressão do miR-494 *in vitro* ocasionou uma diminuição na capacidade de proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 apenas após 24 horas de transfecção *in vitro* quando comparado com as células transfectadas apenas com o agente de transfecção (Figura 15A). No entanto observamos que o aumento da expressão deste miRNA foi associada a uma maior capacidade de migração celular após 12 horas de transfecção (Figura 15B). Além disso, a superexpressão do miR-494 levou a uma diminuição significativa na capacidade de invasão celular *in vitro* após 18 e 24 horas de transfecção nas células da linhagem MDA-MB-231 (Figura 15C).

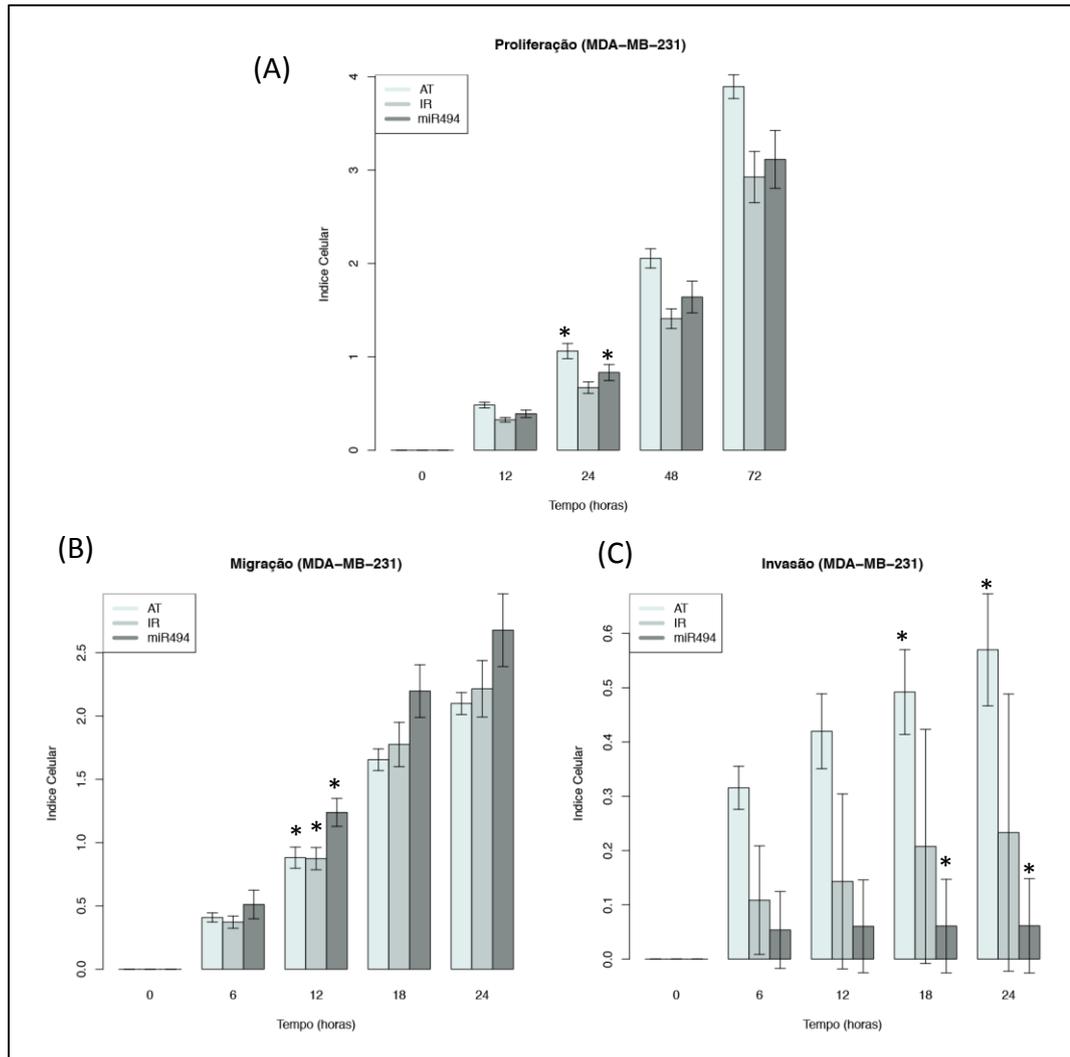


Figura 15- Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração (B) e invasão (C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-494 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-231 ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,025$). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

A fim de melhor elucidar o potencial papel do miR-494 na carcinogênese da mama, realizamos estes mesmos ensaios celulares utilizando outra linhagem tumorigênica de mama, a linhagem MDA-MB-468.

Nossos resultados mostraram que o aumento da expressão do miR-494 levou a um aumento significativo na capacidade de proliferação celular desta linhagem inicialmente avaliado após 12 de horas de transfecção (Figura 16A). Este resultado foi observado ainda após 24 horas de transfecção quando comparado aos dois controles (agente de transfecção e irrelevante).

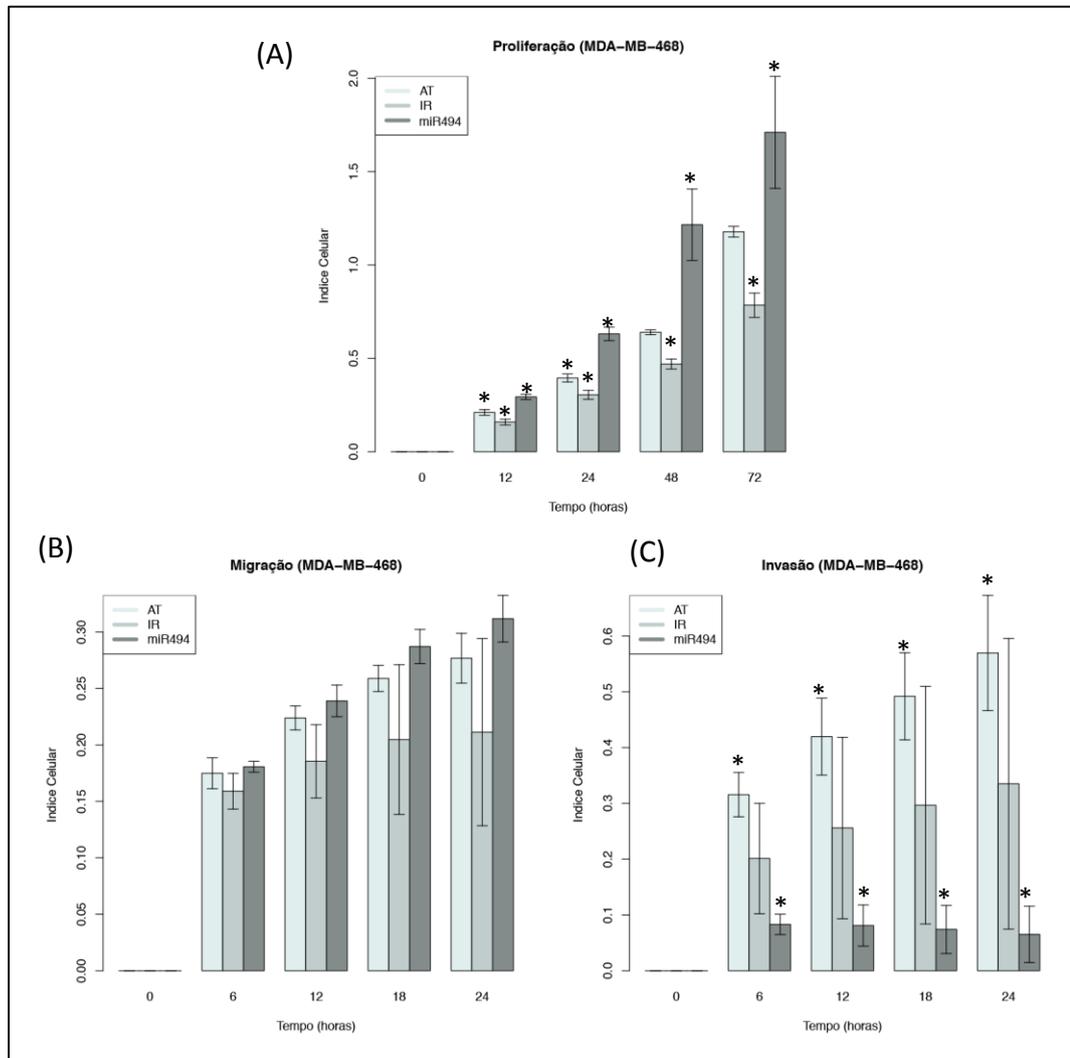


Figura 16- Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração (B) e invasão (C) celular após a superexpressão *in vitro* do miR-494 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MDA-MB-468 ao longo do tempo, com significância estatística ($p \leq 0,025$). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

No entanto nossos resultados também mostraram que o aumento da expressão deste miRNA não teve nenhum impacto significativo na capacidade de migração celular *in vitro* após a transfecção (Figura 16B). Nossos resultados mostraram ainda que houve uma significativa diminuição na capacidade de invasão celular *in vitro* da linhagem MDA-MB-468 inicialmente após 6 horas de transfecção e mantido ainda até 72 horas da superexpressão *in vitro* (Figura 16C).

6.7 Avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão celular *in vitro* da linhagem tumorigênica de mama MCF-7 após o silenciamento com o miR-183.

Considerando o potencial papel do miR-183 na carcinogênese da mama procuramos mensurar o efeito do silenciamento deste miRNA em uma linhagem celular de carcinoma mamário humano. Para isto realizamos também ensaios celulares para avaliar o impacto desta intervenção no comportamento celular *in vitro* quanto à capacidade de proliferação, migração e invasão das células neoplásicas de mama.

Nossos resultados mostraram que a diminuição da expressão do miR-183 *in vitro* não teve nenhum impacto significativo tanto na capacidade de proliferação quanto de invasão celular *in vitro* na linhagem de carcinoma mamário humano MCF-7 (Figura 17A e C).

No entanto o silenciamento *in vitro* deste miRNA parece aumentar a capacidade de migração celular desta linhagem especialmente após 18 e 24 horas da transfecção *in vitro* (Figura 17B).

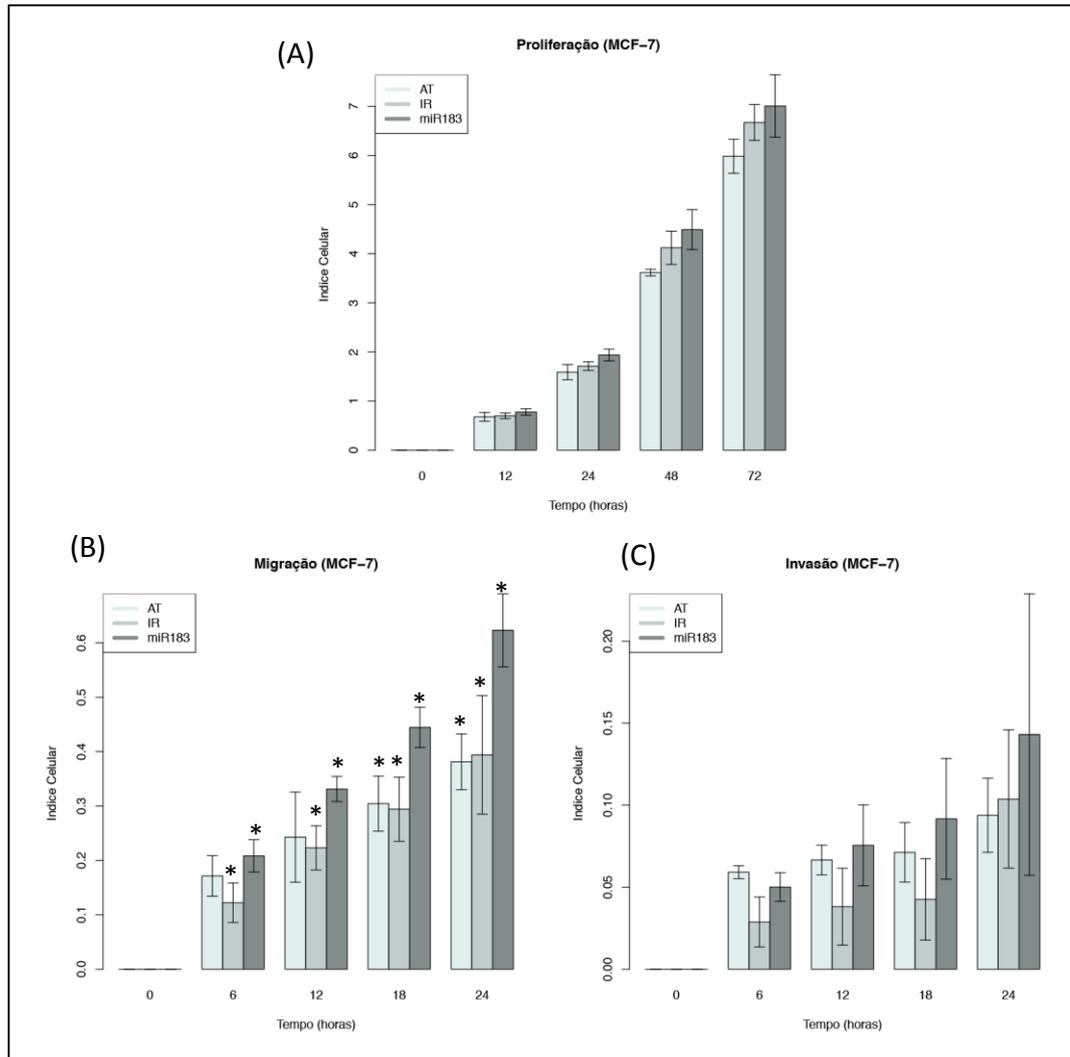


Figura 17- Avaliação da capacidade de proliferação (A), migração (B) e invasão (C) celular após a silenciamento *in vitro* do miR-183 na linhagem celular de carcinoma mamário humano na MCF-7 ao longo do tempo ($p \leq 0,025$). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Anti-miR de interesse

6.8 Avaliação do padrão de expressão de proteínas alvos do miR-183 e miR-494 por *Western Blot*

Como já discutido, os miRNAs são importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em que o mecanismo mais comum é o bloqueio da tradução de proteínas que são produtos de RNAm alvos dos miRNAs.

Sendo assim, neste trabalho também avaliamos a expressão de proteínas alvos do miR-183 e miR-494 após a transfecção *in vitro* destes miRNAs.

Baseado em nossos resultados de busca *in silico* de alvos preditos para estes miRNAs, selecionamos duas proteínas. São elas: Rb1 e VEGF-_{165b}. Consideramos como alteração aumento ou diminuição de 50% na expressão da proteína.

Nossos resultados mostraram que após a superexpressão do miR-183 não houve alteração significativa na expressão da proteína Rb1 tanto na linhagem MDA-MB-231 quanto na linhagem MDA-MB-468 entre 24 e 48 horas, em relação as células transfectadas apenas com os controles, porém em 72 horas podemos ver a diminuição significativa da expressão da proteína Rb1 na linhagem MDA-MB-231 (Figura 18A) e na linhagem MDA-MB-468 houve um aumento da expressão da proteína Rb1 (figura 18B).

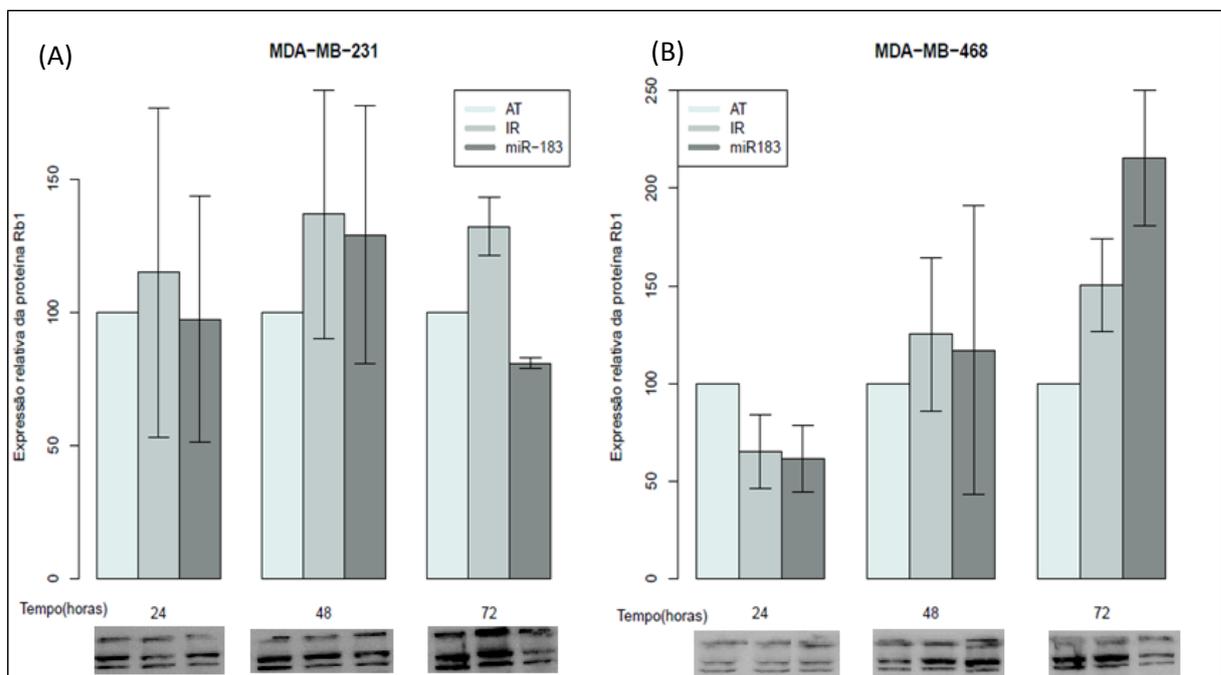


Figura 18- Avaliação da expressão da proteína Rb1, após a superexpressão do miR-183 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

No entanto observamos que a superexpressão do miR-183 na linhagem tumorigênica de mama MDA-MB-231, ocasionou um discreto aumento (cerca de 20 vezes) na expressão da proteína VEGF-_{165b} após 24 horas que se manteve até 72 horas após a transfecção, quando comparado com os controles (Figura 19A). Por outro lado, este efeito não pode ser observado na linhagem MDA-MB-468 em que a superexpressão deste miRNA parece não alterar a expressão de VEGF-_{165b} (Figura 19B).

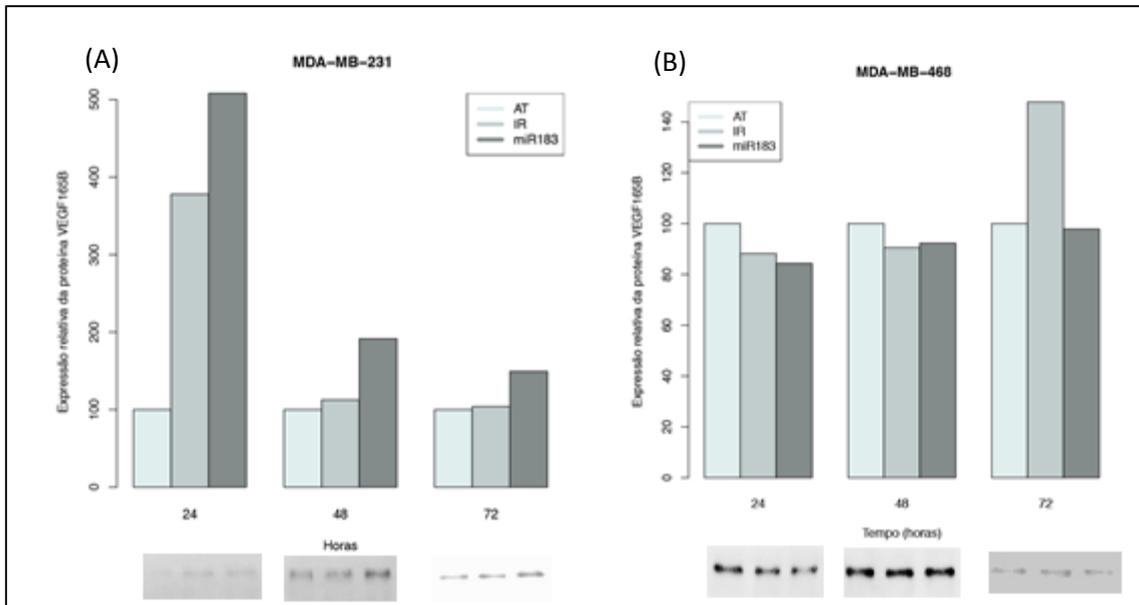


Figura 19- Avaliação da expressão da proteína VEGF_{-165b} após a superexpressão do miR-183 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

Realizamos em paralelo a avaliação da expressão destas mesmas proteínas, Rb1 e VEGF_{-165b}, após a superexpressão *in vitro* do miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 e MDA-MB-468.

Nossos resultados mostraram que a superexpressão do miR-494 foi semelhante ao miR-183, pois ocasionou uma significativa diminuição na expressão da proteína Rb1 na linhagem MDA-MB-231 em 72 horas (Figura 20A). Por outro lado, na linhagem MDA-MB-468 observamos que a superexpressão deste miRNA, parece não ter efeito sob a modulação na expressão da proteína Rb1 em 72 horas (Figura 20B).

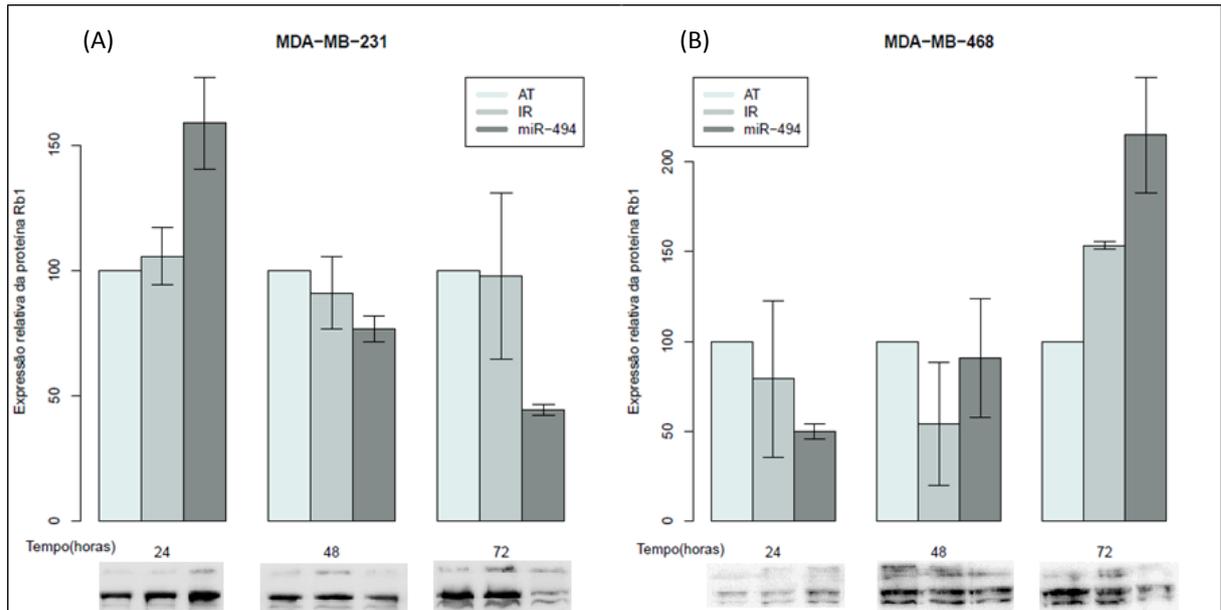


Figura 20- Avaliação da expressão da proteína Rb1 após a superexpressão *in vitro* do miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Mimic de interesse

Considerando ainda o papel da família VEGF para progressão do câncer e o fato deste ser um alvo predito e validado para o miR-494, neste trabalho avaliamos por fim a modulação da proteína VEGF_{-165b} após a superexpressão *in vitro* do miR-494 nas mesmas linhagens tumorigênicas de mama avaliadas para o miR-183.

Nossos resultados mostraram que o aumento da expressão deste miRNA na linhagem MDA-MB-231, acarretou em um aumento significativo da proteína VEGF_{-165b} nas células, após 24 e 48 horas da transfecção *in vitro*, quando comparado com os controles (Figura 21A).

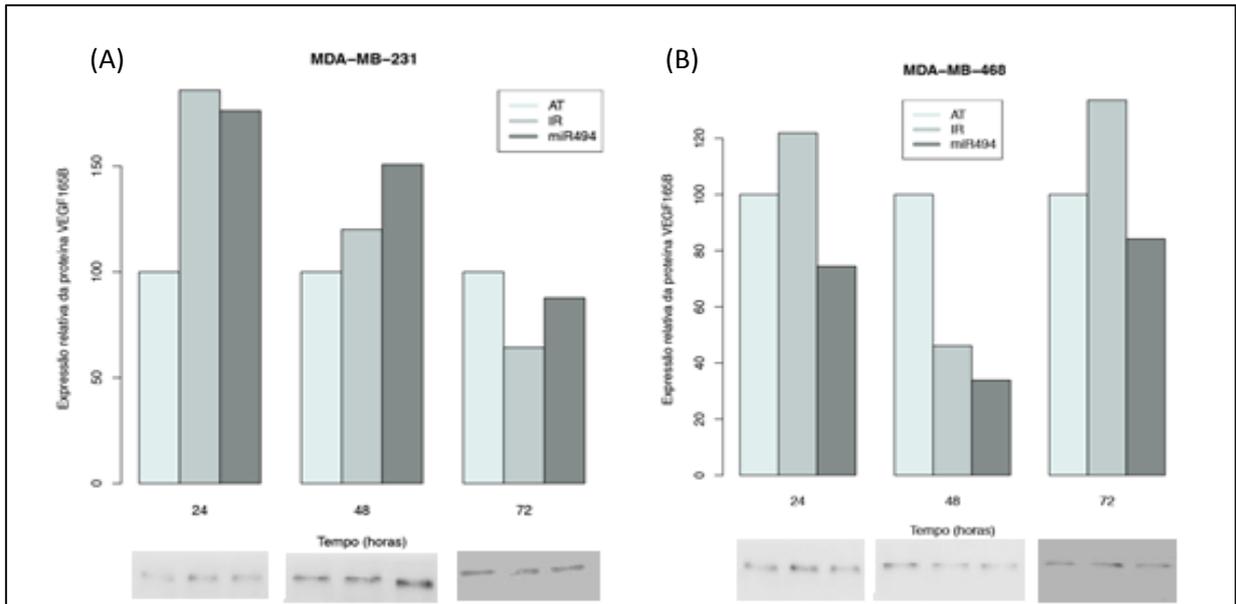


Figura 21- Avaliação da proteína VEGF_{165b} após a superexpressão *in vitro* do miR-494 nas linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 (A) e MDA-MB-468 (B). AT: Agente de Transfecção, IR: miRNA Irrelevante (Controle negativo) e miR: Anti-miR de interesse

Além disso, foi possível mostrar neste trabalho que o aumento da expressão do miR-494 na linhagem MDA-MB-468 acarretou em uma significativa diminuição da proteína VEGF_{165b} melhor evidenciado após 24 e 48 da transfecção *in vitro* (Figura 21B).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, vários trabalhos estão sendo dedicados para melhor elucidar a função dos miRNAs nas neoplasias devido ao claro e importante papel regulatório que estas moléculas desempenham para o início e progressão do câncer. Sabidamente o controle pós-transcricional da expressão gênica exercido pelos miRNAs ocorre preferencialmente, mas não exclusivamente, pela sua ligação na região 3'UTR de RNAm alvos por meio da complementariedade de bases. O fato de um mesmo miRNA poder se ligar a vários alvos diferentes e de vários miRNAs atuarem na regulação de um mesmo alvo, faz destas moléculas grandes reguladores pós-transcricionais da expressão de vários genes importantes para o desenvolvimento de doenças, em especial o câncer.

Deste modo, estudos funcionais *in vitro* que visam a melhor caracterização do papel dos miRNAs no câncer, são ferramentas de importância peculiar para o melhor entendimento da bases moleculares da expressão gênica. Sendo assim, neste trabalho, avaliamos a expressão de dois miRNAs apontados como potenciais biomarcadores para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama: o miR-183 e miR-494.

Iniciamos este trabalho fazendo uma busca *in silico* dos principais alvos preditos e validados para estes dois miRNAs de interesse. Para busca e seleção dos genes alvos destes dois miRNAs realizamos uma análise criteriosa de sequência usando os parâmetros de avaliação de conservação, cálculo de estabilidade termodinâmica RNAm por energia livre de Gibbs (MFE) além dos sítios de conservação na região 3'UTR. Tais parâmetros foram avaliados por meio da utilização de algoritmos amplamente utilizados para predição e validação de genes alvos de miRNAs, são eles: miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), miRWalk (<http://www.umh.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/micronapredictedtarget.html>), RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>).

Nossos resultados mostraram que existem cerca de 3975 alvos para miR-183 e 5629 alvos para o miR-494 preditos pelos algoritmos de predição. Dentre esses alvos, refinamos nossa análise selecionando apenas os principais alvos associados ao processo de metástase e que eram preditos e/ou validados para três ou mais algoritmos de predição.

Esta nova análise nos apontou seis alvos que estão fortemente associados ao processo metastático para cada miRNA: AKT1, PTEN, ERK1/2, RB1, VEGF-A e VEGF-B.

O gene AKT1 (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) é sabidamente descrito como importante na regulação de várias vias de sinalização de metabolismo celular, proliferação e angiogênese⁶⁰. O gene PTEN (Fosfatase homóloga a tensina) atua como importante supressor tumoral, é a segunda proteína frequentemente mutada em câncer, regulando negativamente a via de sinalização AKT levando a redução da proliferação^{61, 62}.

Outro gene predito como alvo foi o ERK1/2 (Quinases reguladoras de sinal extracelular), que desempenha papel fundamental na regulação da proliferação celular, na diferenciação, na sobrevivência e na apoptose de vários tipos de câncer⁶³. O gene que codifica a proteína RB1 (Retinoblastoma 1), desde a sua descoberta, esta proteína tornou-se uma das proteínas mais estudadas, pois desempenha um papel crítico na regulação de várias vias que regem carcinogênese, através da regulação do ciclo celular, a apoptose, senescência, e manutenção do genoma⁶⁴.

O gene ERG (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*) também apontado como alvo do miR-183 e miR-494, desempenha um papel importante no crescimento de vários tumores humanos, principalmente em próstata em conjunto com a via PI3K⁶⁵ e VEGF-A (Fator de crescimento endotelial vascular A). Além disso, estimula a vasculogênese e a angiogênese levando a estimulação da proliferação, invasão e migração de células endoteliais e aumento da permeabilidade microvascular⁶⁶. Finalmente, o gene VEGF-A (Fator de crescimento endotelial vascular A) foi predito como alvo apenas para miR-494 e o VEGF-B (Fator de crescimento endotelial vascular B), é alvo somente do miR-183. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha papel chave na angiogênese tumoral, estimulando a proliferação, migração e sobrevivência celular das células endoteliais⁶⁷.

O mecanismo de atuação do VEGF ocorre por meio da ligação aos receptores tirosina quinase específicos: VEGFR-1/Fit-1, VEGFR-2/kdr e VEGFR-3. Sabe-se que o aumento da expressão do VEGF e seus receptores têm sido associados à progressão, metastização e pior prognóstico em diversos tumores malignos⁶⁸. Sabe-se ainda que o VEGF-A é composto por duas isoformas que resultam de *splicing* alternativo, VEGF-B₁₈₆ e VEGF-B₁₆₇ e contribui para angiogênese tumoral^{69, 70}.

A maior parte sobre o conhecimento de câncer de mama baseia-se em estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando linhagens de carcinoma mamário. As linhagens fornecem uma fonte ilimitada para estudos, devido ao fato que elas são fáceis para manusear quando comparadas ao de um animal⁷¹.

Sendo assim, após a seleção dos genes alvos preditos para o miR-183 e miR-494 por meio da técnica de PCR em Tempo Real, realizamos um *screening* em um painel de sete linhagens celulares de carcinoma mamário humano a fim de selecionar as linhagens modelos para os ensaios funcionais. Após a análise dos dados de expressão destes dois miRNAs, selecionamos as linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-231, MDA-MB-468 e MCF-7 para os ensaios funcionais. Estas linhagens apresentam características fenotípicas bem distintas que as classificam em Luminal não HER (MCF-7), e do tipo triplo-negativo (MDA-MB-231 e MDA-MB-468) de acordo com a expressão para receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e antígeno HER2.

Os modelos experimentais em que e utilizam linhagens celulares imortalizadas são uma importante ferramenta para os estudos funcionais *in vitro*, pois possibilitam a investigação científica de doenças como o câncer. O câncer de mama é uma doença bastante heterogênea e que apresentam diferenças clínicas e moleculares, e é subdividido em quatro subtipos moleculares conhecidos como luminal A e B, Basal-like e HER-2 +⁷².

As diferenças entre eles estão na expressão de marcadores como RE, RP e HER-2. O basal-like não tem a expressão destes três marcadores, HER-2 tem os dois receptores hormonais negativos e HER-2+ e o luminal A e B apresentam RE e RP +, porém diferem na expressão de HER-2, que é negativo no luminal A e positivo no luminal B. No entanto nem todos os luminais B têm estas características, somente 30% dos luminais B são HER-2+⁷³. O que distingue um luminal do outro é a porcentagem de expressão do KI67, um marcador de proliferação celular. Portanto, para ser considerado luminal A, index de expressão do KI67 tem que ser menor que 14% e o luminal B tem que ter um index maior ou igual a 14%⁷⁴.

Segundo Subik et al, 2010⁷⁵ as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468 são caracterizadas como basal-like porque são negativas para o receptor de estrógeno, progesterona e HER-2, e positiva para EGFR e ck5/6, já a MCF-7 é considerada luminal A, pois, esta linhagem é positiva para os receptores de estrógeno e progesterona e negativa para HER-2.

A fim de proporcionar melhor controle sobre a reprodutibilidade dos resultados experimentais, um estudo do nosso grupo fez a caracterização das linhagens celulares de carcinoma mamário utilizadas nesse trabalho, por meio da avaliação da expressão dos receptores hormonais, do antígeno HER-2 e do KI67 utilizando as técnicas de IHC e ICQ. Os resultados obtidos foram que a MDA-MB-231 e MDA-MB-468 foram consideradas triplo-negativas, porque fizemos apenas a expressão dos receptores hormonais, do antígeno HER-2 e KI67. Portanto não podemos dizer que a nossa linhagem é basal-like porque não avaliamos a expressão de EGFR e ck5/6. Já a linhagem MCF-7 foi caracterizada como luminal A, porém com uma porcentagem de 95% de KI67, ou seja, uma porcentagem maior que 14%, o que é contraditório com estudo citado anteriormente. Provavelmente para uma melhor caracterização da linhagem MFC-7 os genes CCNB1, MKI67 , e MYBL2 teriam que ser avaliados, porque segundo Cheang et al⁷⁴ estes genes tem maior expressão em luminal B do que A. Portanto em nosso estudo a linhagem MCF-7 foi considerada luminal não HER.

Sendo assim, por meio da técnica de PCR em tempo real nossos resultados mostram que as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468 apresentaram baixa expressão do miR-183 e miR-494, portanto foram selecionadas para os ensaios de superexpressão. Similarmente ao nosso trabalho, Haga e Phinney⁵³ avaliaram a expressão do miR-494 na linhagem MDA-MB-231 por PCR em tempo real e obtiveram o mesmo nível de expressão que o nosso trabalho.

Por outro lado, também utilizamos neste trabalho a linhagem MCF-7, pois a partir do PCR em Tempo Real foi possível mostrar alta expressão de ambos os miRNAs e portanto selecionamos esta linhagem para os ensaios de silenciamento *in vitro*. Luo *et al*⁷⁶, avaliaram perfil de expressão de miRNAs em linhagens de câncer de mama e observou que o miR-183 é menos expresso em linhagens mais invasiva como a MDA-MB-231 quando comparado com as células menos invasiva como MCF-7 e MDA-MB-468 e também células não invasivas MCF-10A.

Neste trabalho a linhagem tumorigênica de mama MDA-MB-468 apresentou baixa expressão do miR-183 em relação as demais linhagens do painel avaliado, no entanto quando comparada com a MDA-MB-231 sua expressão foi maior. A superexpressão das linhagens tumorais foram eficientes com uma concentração de 20 nM em 24 horas e se manteve em 48 e 72 horas.

Lowery et al⁷⁷, por meio de ensaios de transfecção *in vitro* também realizaram a superexpressão do miR-183. Estes autores utilizaram o mesmo agente de transfecção do

nosso trabalho com a mesma concentração (20nM) porém na linhagem de carcinoma mamário humano denominada T47D e observaram que o maior nível de expressão foi obtido em 72 horas. Podemos dizer que isto comprova a eficiência do nosso ensaio de superexpressão que em apenas 24 horas obtivemos a superexpressão *in vitro* deste miRNA nas linhagens selecionadas.

Para os ensaios *in vitro* que objetivaram o silenciamento dos miRNAs na linhagem MCF-7, foram realizados os mesmos procedimentos já padronizados para a superexpressão, em que foi possível mensurar o silenciamento do miR-183 em 24 horas. Para o miR-494 na linhagem MFC-7 não conseguimos resultados promissores. Segundo Esau CC, 2008⁷⁸ a inibição do miRNA alvo pode ocorrer pela degradação do miRNA ou somente pela inibição do miRNA realizada pelo oligonucleotídeo, e por vezes avaliar o grau de inibição do miRNA pode ser um desafio, mesmo se os níveis de microRNA forem um reflexo preciso da atividade miRNA.

Uma técnica comum para avaliação da atividade do miRNA é a utilização de um gene repórter, conhecido como ensaio de luciferase. É um ensaio confiável e sensível para avaliação da atividade miRNA em cultura celular. Além da dificuldade de encontrar um eficaz método de avaliação da inibição do miRNA, o fato de que famílias de miRNA que regulam o mesmo alvo pode muitas vezes dificultar os ensaios *in vitro*. Muitas vezes estes miRNAs têm a mesma sequência *seed*, mas pode ter um ou mais nucleotídeos diferentes, no entanto eles podem regular os mesmos genes alvos, podendo levar a necessidade da inibição de toda a família de miRNA para efeitos fenotípicos possam ser observados⁷⁹. Isto poderia justificar a baixa inibição do miR-183 nas linhagens celulares de carcinoma mamário, já que o miR-183 pertence a uma família de miRNAs composta do miR-96 e do miR-182.

Por outro lado, o excesso de anti-miR em amostras de RNA, independente do mecanismo de ação pode também interferir na detecção do ensaio de silenciamento, por exemplo, no anelamento do primer ou na extensão em miRNA por qPCR. Além disso, o uso de anti-miRs como ferramentas de estudos em que se quer avaliar inibição da função de um miRNA, pode acarretar no risco de afetar outros miRNAs do que o miRNA pretendido. Por isso, uma avaliação adequada dos efeitos funcionais após inibição miRNA e a compreensão do efeito de interações indesejáveis entre o oligonucleotídeo anti-miR e ácidos nucléicos endógenos, é de fundamental importância para estudos de perda de função e para o desenvolvimento de terapias com miRNAs⁷⁹.

A avaliação da capacidade de proliferação, migração e invasão de células neoplásicas é essencial para auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares que regem estes processos. A fim de avaliar a capacidade de proliferação, migração e invasão celular após a modulação da expressão do miRNA-183 e miR-494, utilizamos uma nova metodologia conhecida como, *xCELLigence RTCA technology (Roche Applied Science)*. Esta tecnologia xCELLigence, surgiu como uma abordagem não-invasiva, com objetivo de avaliar a proliferação, migração e invasão celular em tempo real, por meio da detecção da impedância. Limame R et al⁸⁰ fizeram uma análise comparativa entre o sistema xCELLigence e as metodologias convencionais para realização de ensaios celulares.

Os autores concluíram que esta nova tecnologia, xCELLigence, é um método eficaz para monitorar processos celulares e tem forte correlação com os métodos convencionais, tais como, teste SRB para avaliação da proliferação e citotoxicidade e ensaios Transwell para avaliação da migração e invasão. Por outro lado, essas correlações foram mais fortes em determinado tipo celular, o que pode dificultar a análise de resultados quando se utiliza diferentes tipos celulares. Além disso, o sistema xCELLigence facilmente detectava sinais fracos, mostrando a forte sensibilidade desta metodologia. No entanto, pequenas diferenças de manuseio durante a preparação de um experimento pode resultar em diferenças de sinal entre repetições técnicas e isso será refletido em variações crescentes com o tempo. Portanto, o aumento da sensibilidade, necessita de condições experimentais padronizadas e experiência do usuário, para minimizar incrementos de variância no xCELLigence.

Nossos resultados utilizando esta plataforma, mostraram que após a superexpressão do miR-183 e do miR-494 nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468 houve diferenças no comportamento celular.

A expressão ectópica do miR-183 na linhagem MDA-MB-231 levou um aumento da proliferação e migração ao longo do tempo, porém na proliferação em 24 e 48 horas esse aumento foi somente em relação ao agente de transfecção. Já na migração o aumento foi ao longo do tempo, sendo que em 24 horas pudemos observar o maior índice celular, porém o miR-183 não afeta a invasão. Na linhagem MDA-MB-468 o resultado observado foi ao contrário, a superexpressão do miR-183 inibiu a proliferação a partir de 48 horas e na migração a partir de 12 horas em relação ao miRNA irrelevante e em 24 em relação ao agente de transfecção. Por outro lado houve um aumento na invasão a partir de 18 horas.,

Lowery,2010⁷⁷ observou que a superexpressão do miR-183 na linhagem de carcinoma

mamário T47D, levou a diminuição da migração e não afetou a proliferação e nem apoptose. Já na linhagem MDA-MB-231 a superexpressão do miR-183 levou um aumento da migração, porém não teve diferença na migração quando comparado com controle negativo. Do mesmo modo, a superexpressão do miR-183 em linhagens de osteosarcoma com alta capacidade invasiva (F5M2) levou a inibição da migração e invasão das células, que em partes concorda com os nossos resultados obtidos na linhagem MDA-MB-468⁴².

A superexpressão do miR-494 diminuiu a proliferação na linhagem MDA-MB-231 em 24 horas, no entanto foi significativo apenas em relação ao agente de transfecção e não ao miRNA irrelevante, o mesmo aconteceu com a capacidade de invasão celular em que houve diminuição foi significativo em 18 e 24 horas somente em relação ao agente de transfecção. Observamos ainda houve aumento na capacidade de migração celular após a superexpressão deste miRNA *in vitro*, em 12 horas.

Diferente da linhagem MDA-MB-231, a superexpressão do miR-494 aumentou a capacidade de proliferação celular da linhagem tumorigênica MDA-MB-468 a partir de 12 horas, porém em 48 e 72 horas esse aumento foi em relação ao miRNA irrelevante. Já a superexpressão do miR-494 diminuiu a invasão a partir de 6 horas em relação ao agente de transfecção, sem acarretar efeitos na capacidade de migração celular.

Concordando com os nossos resultados obtidos com a superexpressão do miR-494 na linhagem MDA-MB-231, um estudo recente observou que expressão ectópica do miR-494 em uma linhagem de câncer de pulmão (A549) inibiu a proliferação celular e induziu a senescência⁵¹. Do mesmo modo, a expressão do miR-494 em GIST levou a diminuição da proliferação celular pela inibição do alvo KIT⁵⁰.

Os resultados obtidos tanto com a superexpressão do miR-183, quanto com a superexpressão do miR-494 são um pouco contraditórios entre as linhagens. O que poderia explicar esta diferença é a existência de características específicas de cada linhagem, principalmente devido ao diferente tipo de câncer de mama, pois a linhagem MDA-MB-231 é considerada carcinoma ductal invasiva, já a MDA-MB-468 é um carcinoma mamário⁷¹. Além disso, como sabemos estas linhagens possuem genótipos diferentes em que carregam mutações específicas em genes muito importantes para o controle da proliferação celular e apoptose como CDKN2A, BRAF, KRAS, TP53, NF2, PTEN, RB1, SMAD4 e TP53⁸¹.

Como não conseguimos sucesso no silenciamento *in vitro* do miR-494, realizamos nossas análises apenas para o silenciamento *in vitro* do miR-183. Nossos resultados

mostraram que o silenciamento *in vitro* do miR-183 foi significativo apenas em 24 horas em relação ao agente de transfecção. Seguimos então para avaliação do impacto desta intervenção na capacidade de proliferação, migração e invasão celular. Nossos resultados mostraram que a inibição deste miRNA parece influenciar substancialmente a capacidade de migração celular da linhagem de carcinoma mamário MCF-7, mas não a capacidade de proliferação e invasão. Sarver AL et al⁴⁴, observaram que a inibição do miR-183 em linhagens de colón e rabdosarcoma levou a diminuição da migração e invasão. A escassa literatura a respeito do efeito do silenciamento do mir-183 em linhagens celulares de carcinoma mamário abre perspectivas sem precedentes para importância do melhor entendimento do real papel desta molécula na carcinogênese da mama.

Finalmente analisamos a potencial interação do miR-183 e miR-494 com seus genes alvos por meio da avaliação de alteração nas proteínas Rb 1 e VEGF_{-165b} preditas como alvos destes miRNAs.

A proteína Rb1, Retinoblastoma 1, é produto do gene RB1. É um supressor tumoral frequentemente estudado em câncer por sua função de regulação negativa do ciclo celular. Além disso, esta proteína pode regular outros processos envolvidos no câncer como diferenciação, sobrevivência e senescência. O controle do ciclo celular pela Rb1 envolve outros fatores como CDK-ciclina, que fosforilam a proteína Rb1 tornando-a inativa, desse modo a Rb1 inativa libera E2F, um fator de transcrição, que ativa a transcrição de vários genes que ativam a passagem da fase G1-S, ou seja, ativam a proliferação celular⁸².

A expressão da proteína Rb1 diminuiu apenas com a superexpressão do miR-183 e do miR-494 na linhagem MDA-MB-231. O mesmo não pode ser observado com a linhagem MDA-MB-468, pois com a superexpressão do miR-183 e do miR-494 parece não ter efeito sob a expressão da proteína Rb1 nesta linhagem. Devido a esse resultados, formulamos a hipótese que a proteína Rb1 é regulada indiretamente pelos miRNAs, já que o gene SMYD2, que também é alvo do miR-183 e do miR-494, metila lisina 810 do gene RB1, consequentemente Rb1 é fosforilada (inativa), e promove a progressão do ciclo celular⁸³.

Do mesmo modo, observamos que a superexpressão do miR-494 e miR-183 ocasionou um discreto aumento da proteína VEGF_{-165b} apenas na linhagem MDA-MB-231. O VEGF-A, fator de crescimento endotelial vascular A, é um potencial marcador de prognóstico devido à sua regulação positiva em vários cânceres. O VEGF-A tem várias isoformas geradas por splicing alternativo e são designadas de acordo com o número de aminoácidos (VEGF₁₂₁ ,

VEGF₁₄₃, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆). O VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante e produzida por uma variedade de tecidos normais e patológicos. Em 2002 foi descoberta uma nova família de isoformas, VEGF-A_{xxx}b, o primeiro a ser identificado foi o VEGF₁₆₅b, estudos também demonstraram as isoformas do VEGF-A₁₂₁b, de VEGF-A₁₈₉b e VEGF-A₁₄₅b. A diferença entre as duas famílias de isoformas, VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{xxx}b, está na deleção de 66 nucleotídeos a partir do início do exon 8. Além disso, as duas famílias tem efeitos diferentes no tumor, devido ao fato VEGF₁₆₅ promover a angiogênese, enquanto VEGF₁₆₅b é considerada uma isoforma anti-angiogênico⁸⁴⁻⁸⁶.

Contudo, o VEGF₁₆₅b não é alvo direto de ambos os miRNAs, o que explica o aumento da expressão dessa proteína quando os miRNAs são superexpressos. Nossa outra hipótese é que IGF1 e TNF α que são alvos diretos de ambos os miRNAs estão regulando a expressão de VEGF₁₆₅b, já que IGF1 e TNF α regulam negativamente VEGF₁₆₅b⁸⁷. Por outro lado, a expressão de VEGF₁₆₅b diminuiu com a superexpressão do miR-494 na linhagem MDA-MB-468, concordando com os nossos resultados. Que a inibição do VEGF₁₆₅b, uma isoforma anti-angiogênico, levou ao aumento da proliferação da linhagem MDA-MB-468 com a superexpressão do miR-494.

Alguns destes resultados aparentemente conflitantes podem ser melhor explicados pelos achados de Marino et al⁵⁴, pois os autores relatam que a associação dos três miRNAs diferencialmente expressos (miR-183, miR-494 e miR-21) em amostras de pacientes com câncer de mama metastático são considerados biomarcadores de pior prognóstico.

Neste trabalho não avaliamos o efeito da modulação destes miRNAs *in vitro*, mas cada um individualmente. Sabemos ainda que uma característica peculiar dos miRNAs é que estes atuam como uma rede regulatória aonde vários miRNAs podem cooperar na regulação de alvos comuns. Certamente mais estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos moleculares que regem a regulação exercida pelo miR-183 e miR-494 em células neoplásicas da mama.

No entanto, considerando a originalidade dos nossos resultados neste trabalho alcançados, acreditamos que os avanços deste trabalho ajudam na melhor elucidação do real papel do miR-183 e miR-494 na progressão do câncer de mama. Além disso, nossos resultados abre um novas perspectivas para investigações futuras sobre a potencial cooperação destes miRNAs na regulação do processo de metástase do câncer de mama.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- A **superexpressão *in vitro* do miR-183** ocasionou: **aumento** na capacidade de **proliferação e migração** celular sem efeitos significativos na capacidade de invasão celular, da linhagem MDA-MB-231.
- Por outro lado, na linhagem tumorigênica de mama MDA-MB-468 a **superexpressão do miR-183** ocasionou: **diminuição** tanto da capacidade de **proliferação quanto de invasão** celular, mas a um **aumento na migração celular**.
- A **superexpressão *in vitro* do miR-494** na linhagem tumorigênica de mama MDA-MB-231 ocasionou: **diminuição** tanto na capacidade de **proliferação quanto de invasão celular** e **aumento na migração *in vitro***.
- Por outro lado, a **superexpressão do miR-494** na linhagem tumorigênica de mama MDA-MB-468 ocasionou: **aumento na proliferação e diminuição na invasão celular**, sem efeitos significativos na migração celular.
- O **silenciamento do miR-183** ocasionou: **aumento significativo na capacidade de migração celular**, sem efeitos significativos na proliferação e invasão celular.
- Após a superexpressão *in vitro* do miR-183 parece não ser capaz de modular a expressão da proteína Rb1, mas foi possível observar um aumento na expressão de VEGF_{-165B} apenas na linhagem MDA-MB-231.
- A superexpressão do miR-494 levou a uma regulação negativa tanto da proteína Rb1 quanto de VEGF_{-165B} apenas na linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-468.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iorio MV, Croce CM. *Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation*. **Cancer J**. 2012;18(3):215-22.
2. Calin GA, Croce CM. *MicroRNA signatures in human cancers*. **Nat Rev Cancer**. 2006;6(11):857-66.
3. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. *Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression*. **Mamm Genome**. 2006;17(3):189-202.
4. Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. *MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer*. **Clinical epigenetics**. 2011;2(2):171-85.
5. Sacco LD, Masotti A. *Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region*. **Int J Mol Sci**. 2012;14(1):480-95.
6. Moretti F, Thermann R, Hentze MW. *Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame*. **RNA**. 2010;16(12):2493-502.
7. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. **Science**. 2005;309(5740):1577-81.
8. Koturbash I, Zemp FJ, Pogribny I, Kovalchuk O. *Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis*. **Mutat Res**. 2011;722(2):94-105.
9. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Zhao QL. *Biological functions of microRNAs*. **Bioorg Khim**. 2010;36(6):747-52.
10. He L, Hannon GJ. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. **Nat Rev Genet**. 2004;5(7):522-31.
11. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. **Nature**. 2005;435(7043):834-8.
12. Meltzer PS. *Cancer genomics: small RNAs with big impacts*. **Nature**. 2005;435(7043):745-6.
13. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. *Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer*. **Expert Opin Biol Ther**. 2007;7(7):1009-19.
14. Garzon R, Calin GA, Croce CM. *MicroRNAs in Cancer*. **Annu Rev Med**. 2009;60:167-79.
15. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. **Cell**. 2005;120(5):635-47.
16. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99(24):15524-9.

17. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004;101(32):11755-60.
18. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004;101(9):2999-3004.
19. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. **Cancer research**. 2005;65(16):7065-70.
20. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2006;103(7):2257-61.
21. Song J, Bai Z, Zhang J, Meng H, Cai J, Deng W, et al. *Serum microRNA-21 levels are related to tumor size in gastric cancer patients but cannot predict prognosis*. **Oncology letters**. 2013;6(6):1733-7.
22. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, et al. *Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines*. **Cancer research**. 2007;67(6):2456-68.
23. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. *MicroRNAs and metastases--the neuroblastoma link*. **Cancer Biol Ther**. 2010;9(6):453-4.
24. Galasso M, Sandhu SK, Volinia S. *MicroRNA Expression Signatures in Solid Malignancies*. **Cancer J**. 2012;18(3):238-43.
25. Sassen S, Miska EA, Caldas C. *MicroRNA: implications for cancer*. **Virchows Arch**. 2008;452(1):1-10.
26. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. **Nature**. 2007;449(7163):682-8.
27. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. **Nature**. 2008;451(7175):147-52.
28. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis*. **Nature cell biology**. 2008;10(2):202-10.
29. Negrini M, Calin GA. *Breast cancer metastasis: a microRNA story*. **Breast Cancer Res**. 2008;10(2):203.
30. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. *A microRNA component of the hypoxic response*. **Cell Death Differ**. 2008;15(4):667-71.
31. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. **Cell**. 2011;146(6):873-87.

32. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, et al. *MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia*. **PLoS One**. 2006;1:e116.
33. Burke B, Sumner S, Maitland N, Lewis CE. *Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets*. **Journal of leukocyte biology**. 2002;72(3):417-28.
34. M M. *Transferencia génica para ligamento cuadricepsital lesionado de Rattus norvegicus*. **Tese (Doutorado)**. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2004.
35. S U. *Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems*. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. 2007;2(3):058-67.
36. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. *miR-21-mediated tumor growth*. **Oncogene**. 2007;26(19):2799-803.
37. Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, Brock GJ. *Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin*. **Cancer Res**. 2007;67(17):7972-6.
38. Tsang WP, Kwok TT. *Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3*. **Apoptosis**. 2008;13(10):1215-22.
39. Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, et al. *microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2010;107(18):8231-6.
40. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, et al. *Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies*. **Mol Cancer**. 2006;5:24.
41. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, et al. *Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer*. **Int J Oncol**. 2009;34(4):1069-75.
42. Zhao H, Guo M, Zhao G, Ma Q, Ma B, Qiu X, et al. *miR-183 inhibits the metastasis of osteosarcoma via downregulation of the expression of Ezrin in F5M2 cells*. **International journal of molecular medicine**. 2012;30(5):1013-20.
43. Wang G, Mao W, Zheng S. *MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells*. **FEBS Lett**. 2008;582(25-26):3663-8.
44. Sarver AL, Li L, Subramanian S. *MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration*. **Cancer research**. 2010;70(23):9570-80.
45. Chen L, Li Y, Fu Y, Peng J, Mo MH, Stamatakis M, et al. *Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue*. **PLoS one**. 2013;8(1):e54213.
46. Hannafon BN, Sebastiani P, de las Morenas A, Lu J, Rosenberg CL. *Expression of microRNA and their gene targets are dysregulated in preinvasive breast cancer*. **Breast cancer research : BCR**. 2011;13(2):R24.

47. Zhu W, Liu X, He J, Chen D, Hunag Y, Zhang YK. *Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study.* **BMC cancer.** 2011;11:393.
48. Zhang QH, Sun HM, Zheng RZ, Li YC, Zhang Q, Cheng P, et al. *Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues.* **Gene.** 2013;527(1):26-32.
49. Lehmann U, Streichert T, Otto B, Albat C, Hasemeier B, Christgen H, et al. *Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer.* **BMC cancer.** 2010;10:109.
50. Kim WK, Park M, Kim YK, Tae YK, Yang HK, Lee JM, et al. *MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation.* **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.** 2011;17(24):7584-94.
51. Ohdaira H, Sekiguchi M, Miyata K, Yoshida K. *MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells.* **Cell proliferation.** 2012;45(1):32-8.
52. Liu Y, Lai L, Chen Q, Song Y, Xu S, Ma F, et al. *MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN.* **Journal of immunology.** 2012;188(11):5500-10.
53. Haga CL, Phinney DG. *MicroRNAs in the imprinted DLK1-DIO3 region repress the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the TWIST1 protein signaling network.* **The Journal of biological chemistry.** 2012;287(51):42695-707.
54. ALF. M. *Análise do perfil de expressão diferencial de microRNAs em carcinomas mamários por microarrays.* **Dissertação (Mestrado).** Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2013.
55. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. *Regulation and function of miRNA-21 in health and disease.* **RNA biology.** 2011;8(5):706-13.
56. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. *MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1).* **The Journal of biological chemistry.** 2007;282(19):14328-36.
57. Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H, et al. *Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer.* **Journal of cancer research and clinical oncology.** 2013;139(2):223-9.
58. AL M. *Caracterização fenotípica de linhagens celulares de carcinoma mamário humano por imunocitoquímica e imunohistoquímica.* **Monografia (Trabalho de conclusão de curso).** São José do Rio Preto: Universidade Paulista; 2012.
59. 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.
60. Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R. *AKT Kinase Pathway: A Leading Target in Cancer Research.* **TheScientificWorldJournal.** 2013;2013:756134.

61. Gericke A, Leslie NR, Losche M, Ross AH. *PtdIns(4,5)P2-mediated cell signaling: emerging principles and PTEN as a paradigm for regulatory mechanism*. **Advances in experimental medicine and biology**. 2013;991:85-104.
62. Goberdhan DC, Wilson C. *PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more*. **Human molecular genetics**. 2003;12 Spec No 2:R239-48.
63. Chetram MA, Hinton CV. *PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer*. **Journal of receptor and signal transduction research**. 2012;32(4):190-5.
64. Sachdeva UM, O'Brien JM. *Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma*. **The Journal of clinical investigation**. 2012;122(2):425-34.
65. Sashida G, Bazzoli E, Menendez S, Liu Y, Nimer SD. *The oncogenic role of the ETS transcription factors MEF and ERG*. **Cell cycle**. 2010;9(17):3457-9.
66. Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. *Breast cancer metastasis*. **Cancer genomics & proteomics**. 2012;9(5):311-20.
67. Yamazaki Y, Morita T. *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. **Molecular diversity**. 2006;10(4):515-27.
68. Timoshenko AV, S R, PK L. *Migration-promoting role of VEGF-C and VEGF-C binding receptors in human breast cancer cells*. **British Journal of Cancer**. 2007;97:1090 – 8.
69. Roskoski R, Jr. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression*. **Critical reviews in oncology/hematology**. 2007;62(3):179-213.
70. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al. *Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors*. **The American journal of pathology**. 1998;153(1):103-8.
71. Lacroix M, Leclercq G. *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update*. **Breast cancer research and treatment**. 2004;83(3):249-89.
72. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. *Molecular portraits of human breast tumours*. **Nature**. 2000;406(6797):747-52.
73. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. **JAMA : the journal of the American Medical Association**. 2006;295(21):2492-502.
74. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. **Journal of the National Cancer Institute**. 2009;101(10):736-50.
75. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. *The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines*. **Breast cancer : basic and clinical research**. 2010;4:35-41.

76. Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S, et al. *A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells*. **Journal of translational medicine**. 2013;11:57.
77. Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ. *Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells*. **BMC cancer**. 2010;10:502.
78. Esau CC. *Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides*. **Methods**. 2008;44(1):55-60.
79. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. *Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides*. **Silence**. 2012;3(1):1.
80. Limame R, Wouters A, Pauwels B, Fransen E, Peeters M, Lardon F, et al. *Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays*. **PloS one**. 2012;7(10):e46536.
81. COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. [Internet] 2013 [cited 02/10/2013]; Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>.
82. Chinnam M, Goodrich DW. *RB1, development, and cancer*. **Current topics in developmental biology**. 2011;94:129-69.
83. Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, Suzuki T, et al. *RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation*. **Neoplasia**. 2012;14(6):476-86.
84. Bates DO, Mavrou A, Qiu Y, Carter JG, Hamdollah-Zadeh M, Barratt S, et al. *Detection of VEGF-A(xxx)b isoforms in human tissues*. **PloS one**. 2013;8(7):e68399.
85. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, et al. *Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma*. **British journal of cancer**. 2007;97(2):223-30.
86. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. *VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression*. **Cancer research**. 2004;64(21):7822-35.
87. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, et al. *Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors*. **Journal of cell science**. 2008;121(Pt 20):3487-95.

Anexo A- Carta de Aprovação do CEP



Comitê de Ética em Pesquisa CEP

Para: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira
De: Dr. Sérgio Vicente Serrano
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 29/03/2012

Projeto de pesquisa: 593/2012

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da Expressão Gênica na Modulação da Terapia Anti-angiogênica em Linhagens Celulares de Carcinoma Mamário Humano.**”, o qual foi cadastrado sob o número **593/2012**.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de aprovação do CEP.

Atenciosamente,


Dr. Sérgio Vicente Serrano
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos