

Aline Oliveira da Rocha

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO MIR-451 EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES DE CÉLULAS
GERMINATIVAS E SEU IMPACTO NA RESPOSTA À CISPLATINA**

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

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-orientador: Dr. Daniel Onofre Vidal

Barretos, SP

2017

Aline Oliveira da Rocha

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO MIR-451 EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES DE CÉLULAS
GERMINATIVAS E SEU IMPACTO NA RESPOSTA À CISPLATINA**

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

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-orientador: Dr. Daniel Onofre Vidal

Barretos, SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

R672a Rocha, Aline Oliveira da.

Avaliação do papel do MIR-451 em linhagens celulares de tumores de células germinativas e seu impacto na resposta à cisplatina / Aline Oliveira da Rocha. - Barretos, SP 2017.

f. : il.

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-orientador: Dr. Daniel Onofre Vidal

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2017.

1. Tumor de célula germinativa. 2. MiR-451. 3. Superexpressão. 4. Ensaio funcionais. 5. Cisplatina. I. Autor. II. Lopes, Luiz Fernando. III. Vidal, Daniel Onofre. IV. Título.

CDD 571.6

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Oliveira da Rocha

Avaliação do papel do miR-451 em linhagens celulares de tumores de células germinativas e seu impacto na resposta à cisplatina

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:

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Dalila Lucíola Zanette

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, (Fiocruz- Bahia).

Prof. Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Instituição: Fundação Antônio Prudente, Hospital AC Camargo.

Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Orientador

Prof. Dr. Daniel Onofre Vidal

Co-orientador

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, com "Bolsa do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares - PROSUP/CAPES".

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

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada 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.”

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado ao estudo”.

**Dedico esta dissertação a minha família, meus
amigos, e a todos os pacientes e seus familiares.**

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me conduzido até aqui e me amparado em todos os momentos.

Ao meu orientador **Professor Dr. Luiz Fernando Lopes**, pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho, por todas as contribuições, orientações, críticas e elucidação de dúvidas.

Ao meu co-orientador, **Dr. Daniel Onofre Vidal**, pela competência científica, acompanhamento do trabalho, correções, sugestões, disponibilidade, generosidade, pela amizade e por não medir esforços para me ajudar.

Ao meu querido supervisor, amigo e irmão científico **Me. André Lengert**, por compartilhar seu conhecimento, pela positividade, pelos conselhos, por toda cumplicidade, parceria e amizade, você foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Renato Oliveira**, **Dra. Viviane Saito** e **Dr. Matias Melendez**, pelo suporte científico, metodológico e principalmente pelo cuidado e boa vontade em me ajudar, vocês fizeram contribuições fundamentais.

Ao **Dr. Flavio Cárcano** e **Dr. Gustavo Noriz** pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À **Dra. Aline Tansini** e **Me Thaís Toledo** pela prontidão em ajudar sempre que necessário com a citometria de fluxo.

Aos membros das bancas de acompanhamento/qualificação e defesa **Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, **Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima** e **Dra. Dalila Lucíola Zanette** pela disposição, contribuições e correções deste trabalho.

As minhas amigas do grupo da pediatria **Fernanda Costa**, **Ana Carolina Galuban**, **Maria Fernanda Gonçalves**, **Laís Machado** e **Juliana de Jesus**, meninas vocês são muito especiais, obrigada por todas as contribuições no projeto, pelas conversas, amizade e palavras de incentivo.

Aos meus queridíssimos amigos **Camila Martinelli, Weder Menezes, Paula Felício, Karina Mello e Karen Borba**, obrigada pela amizade, por me apoiarem e pelas gordices. Nossas conversas filosóficas regadas à cafeína e açúcar me estimularam e adoçaram os dias difíceis.

A todos os amigos do CPOM/CPOM dance, que comemoraram as vitórias e compartilharam os momentos difíceis comigo, em especial, **Marcela Nunes, Fernanda Cury, Murilo Bonatelli, Cintia Ramos, Ana Laura Alves, Izabela Faria, Rhafaela Causin, Danielle Pessoa, Carol Rogeri, Wellington Santos, Thais Sobanski, Maraisa Costa, Rebeca Grasel, Natalia Campacci, Anna Luiza, Lidia Rebolho, Ana Carolina Peters, Rafael Tiveron, Paula Pastres, Vânia Mariano, Estela Silva, Isabela Fornari, Isana Silva e Tatiana Ronda**.

As biólogistas **Ana Carolina Laus e Adriana Cruvinel** por me auxiliar quando foi preciso.

À secretária do Centro de Pesquisa, **Cintia Nunes**, pelo suporte durante todo esse período.

Ao **Departamento de Pós-Graduação** (secretaria), pela eficiência, organização e disposição.

À biblioteca do IEP, ao **Martins Fidelis** e à **Milene Marques**, por gentilmente me auxiliarem sempre que necessário.

Ao **Programa de Pós-graduação do Instituto de Ensino e Pesquisa** do Hospital de Câncer de Barretos pela oportunidade.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos**, pelo apoio financeiro e infraestrutura.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** e ao **Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares**, pela concessão da bolsa de estudos.

A toda minha família, principalmente meus pais **Sérgio Rocha e Janilda Rocha**, por cuidarem de mim com tanto amor e me encorajarem ao longo da minha vida acadêmica. A minha irmã **Ariéle Rocha** e meu cunhado **Antônio Santos** pelo carinho e incentivo.

Ao meu namorado **Leandro Varalda**, pela paciência e apoio incondicional durante a realização deste trabalho, suas palavras de amorosas e seu companheirismo me fizeram chegar até aqui.

A meus amigos de longa data, em particular, **Luzia Cardoso, Rafael Moreira, Gustavo Pessoa** e a **Patrícia Faria** (minha marida), que sempre estiveram ao meu lado e compartilharam de todos os momentos.

Aos meus queridos amigos do AME **Karina Correa, Aline Magrini, Adriana Felício, Sandra Santos, Marcelo Oliveira** e **Leonidas Junior** (meu coaching), por me incentivarem a dar o primeiro passo.

Embora uma dissertação tenha finalidade acadêmica, muito mais que ciência se aprende ao longo desta caminhada.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento e realização deste trabalho. Muito Obrigada.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Tumores de Células Germinativas	2
1.2 MicroRNAs e câncer	5
1.3 MicroRNAs em tumores de células germinativas.	7
1.4 miR-451 e câncer.	8
1.5 Resistência à cisplatina em TCGs e via PI3K/AKT	10
2 OBJETIVO	14
2.1 Objetivos Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Cultura e seleção das linhagens celulares tumorais de TCG	16
3.2 Descongelamento, manutenção, passagem e congelamento das linhagens celulares	16
3.3 Contagem de células	17
3.4 Transfecção celular nas linhagens celulares de TCG	17
3.5 Avaliação do perfil mutacional em genes associados à via PI3K/AKT nas linhagens NTERA-2, JEG-3 e em tumores de células germinativas de testículos	18
3.6 Determinação do IC ₁₀₀ para seleção das células resistentes a puromicina	18
3.7 Transdução celular nas linhagens celulares de TCG	18
3.7.1 Seleção de células por citometria de fluxo	19
3.7.2 Seleção de colônias celulares por tripsinização	20
3.8 Extração do RNA total e avaliação da expressão do miR-451	20
3.9 Avaliação da viabilidade celular (MTS)	21
3.10 Ensaio de proliferação celular (DAPI)	21
3.11 Ensaio de migração celular (<i>transwell</i>)	22
3.12 Ensaio de invasão celular	22
3.13 Ensaio de formação de colônia (clonogênico)	23
3.14 Busca <i>in silico</i> para seleção de alvos do miR-451	23

3.15 Western Blot	24
3.16 Determinação do IC ₅₀ para avaliar a resposta ao tratamento com cisplatina	25
3.17 Análise Estatística	26
4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
5 RESULTADOS	30
5.1 Avaliação da expressão do miR-451 em linhagens celulares de tumores de células germinativas	30
5.2 Avaliação do perfil mutacional em genes associados à via PI3K/AKT nas linhagens NTERA-2, JEG-3 e em tumores de células germinativas de testículos	31
5.3 Determinação do IC ₁₀₀ para seleção das células resistentes a puromicina.	34
5.4 Avaliação da expressão do miR-451 nas linhagens celulares NTERA-2 e JEG-3 após a transdução	34
5.5 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 na viabilidade celular das linhagens de TCG	36
5.6 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de proliferação (DAPI) das linhagens de TCG	37
5.7 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de migração celular das linhagens de TCG	39
5.8 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de invasão celular das linhagens de TCG	40
5.9 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de formação de colônia (clonogênico) das linhagens de TCG.	41
5.10 Busca <i>in silico</i> para seleção de alvos do miR-451	42
5.11 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 sobre as proteínas associadas com a via PI3K/AKT nas linhagens de TCG	43
5.12 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 na resposta ao tratamento com cisplatina das linhagens de TCG	44
6 DISCUSSÃO	47
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	52

8 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da histogênese dos tumores de células germinativas.	2
Figura 2- Biogênese dos microRNAs.	6
Figura 3- Expressão normalizada do miR-451 nas linhagens celulares tumorais de TCG..	30
Figura 4- Impacto da expressão ectópica do miR-451, na migração e invasão da linhagem 1777N.	30
Figura 5- Análise de mutações em tumores de células germinativas de testículo do consórcio internacional <i>The Cancer Genome Atlas</i> .	33
Figura 6- Determinação do IC ₁₀₀ da puomicina nas linhagens celulares NTERA-2 e JEG-3.	34
Figura 7- Análise da expressão do miR-451 na linhagem celular NTERA-2..	35
Figura 8- Análise da expressão do miR-451 na linhagem celular JEG-3.	36
Figura 9- Impacto da superexpressão do miR-451 na viabilidade celular das linhagens de TCG avaliadas.	37
Figura 10- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de proliferação das linhagens de TCG avaliadas.	38
Figura 11- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de migração celular das linhagens de TCG avaliadas.	39
Figura 12- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de invasão celular das linhagens de TCG avaliadas.	40
Figura 13- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de formação de colônia das linhagens de TCG avaliadas.	41

Figura 14- Previsão de alvos do miR-451. Sequência prevista com pareamento na região 3'UTR dos genes WDFY2 (A) e PDPK1 (B) .	42
Figura 14- Representação esquemática da rede de interação das proteínas envolvidas regulação da via de sinalização PI3K/Akt.	42
Figura 15- Avaliação da expressão das proteínas CAB39, PDK1, WDFY2, PI3K α e pAKT após a superexpressão do miR-451 na linhagem NTERA-2..	43
Figura 16- Avaliação da expressão das proteínas CAB39, PDK1, WDFY2, PI3K α e pAKT após a superexpressão do miR-451 na linhagem JEG-3.	44
Figura 17- Impacto da superexpressão do miR-451 no tratamento com cisplastina das linhagens de TCG avaliadas.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de anticorpos utilizados nos ensaios de western blot.	25
Tabela 2- Análise do perfil mutacional das linhagens celulares tumorais NTERA-2 e JEG-3.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	Alfa Fetoproteína
β-HCG	Porção Beta da Gonodotrofina Coriônica Humana
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPI	Cloridrato de 4',6-Diamindino-2- Fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DP	Desvio Padrão
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
IC50	Half Maximal Inhibitory Concentration
IGCCC	International Germ Cell Classification Consensus
DHL	Desidrogenase Lática
microRNAs	MicroRNAs
mRNAs	RNAs mensageiros
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, innersalt; MTS]]
NaCl	Cloreto de Sódio
OMG	Organização Mundial da Saúde
P/S	Penicilina/Streptomicina
pH	Potencial Hidrogênio
PI	Propidium Iodide
PROSUP	Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido
RT-PCR	Transcriptase Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase

SBF	Soro fetal bovino
SDS- PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
STR	Short Tandem Repeat
TCGs	Tumores de Células Germinativas
TCGT	Tumor de Célula Germinativa de Testículo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
*	Asterisco
~	Aproximadamente
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual a
x	Vezez
®	Marca registrada
°C	Graus celsius
kb	Kilobase
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
p	valor de p
rpm	Rotação por minuto
α	Alfa
β	Beta
=	Igual

RESUMO

Rocha AO. Avaliação do papel do miR-451 em linhagens celulares de tumores de células germinativas e seu impacto na resposta à cisplatina. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2017.

Os tumores de células germinativas (TCGs) fazem parte de um grupo raro e heterogêneo de neoplasias, clínica e patologicamente complexo, que ocorre desde o período neonatal até a idade adulta. Apesar das altas taxas de cura no TCG, 20% dos pacientes apresentam resistência ao tratamento quimioterápico. Os microRNAs compreendem uma classe de RNAs não codificadores que estão envolvidos na regulação da expressão gênica. O miR-451 é apontado como supressor tumoral e sua expressão foi associada com a regulação da proliferação celular, migração, invasão e quimiossensibilidade em linhagens celulares, desempenhando um papel importante na tumorigênese. Assim, considerando que dados preliminares do nosso grupo demonstram que o miR-451 apresenta expressão diminuída em linhagens celulares de TCGs e que ele pode ter um papel funcional nestes tumores, propusemos avaliar este papel em linhagens celulares de TCG. Nossos resultados sugerem que a superexpressão do miR-451 nas linhagens NTERA-2 e JEG-3 foi associado a uma redução significativa na viabilidade, proliferação, migração e invasão celular, mas não houve alteração em relação a resposta destas linhagens ao tratamento com cisplatina. O potencial clonogênico em NTERA-2 parece não ser alterado, entretanto em JEG-3 ocorreu uma diminuição no potencial clonogênico. Adicionalmente, o restabelecimento da expressão do miR-451 em NTERA-2 foi relacionado a uma regulação das proteínas PDK1 e WDFY2, alvos moleculares preditos para regulação deste miRNA. Na linhagem JEG-3 foi associado a uma diminuição nos níveis proteicos de PDK1, PI3K α e pAKT. Em conjunto, nossos dados sugerem que o miR-451 pode estar envolvido na regulação de diversos processos fundamentais em tumores de células germinativas, e o seu papel na regulação da via PIK3 α /AKT deve ser melhor avaliado como potencial alternativa terapêutica em TCG.

Palavras-chave: tumor de célula germinativa, miR-451, superexpressão, ensaios funcionais, cisplatina.

ABSTRACT

Rocha AO. Evaluation of the role of miR-451 in germ cell tumor cell lines and its impact on cisplatin response. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2017.

Germ cell tumors (GCT) are part of a rare and heterogeneous group of neoplasms, clinic and pathologically complex, occurring from the neonatal period to adulthood. Despite the high cure rates observed in GCT, 20% of patients present resistance to chemotherapy. MicroRNAs comprise a class of non-coding RNAs that are involved in the regulation of gene expression. MiR-451 was identified as a tumor suppressor and its expression was associated with the regulation of cell proliferation, migration, invasion and chemosensitivity in cell lines, indicating that miR-451 plays an important function in tumorigenesis. Therefore, considering that recent data from our group demonstrated decreased expression of miR-451 in germ cell tumor cell lines compared to normal tissues and that miR-451 may have a functional role in these tumors, our goal in this project was to evaluate miR-451 functional role in GCT through several *in vitro* assays (cell viability, migration, invasion, clonogenic, western blot) and its impact on the response of GCT to cisplatin. Our results suggest that the overexpression of miR-451 in the NTERA-2 and JEG-3 lines was associated with a significant reduction in cell viability, proliferation, migration and invasion, but there was no change in the response of these strains to cisplatin treatment. The clonogenic potential in NTERA-2 does not appear to be altered, however in JEG-3 a decrease in the clonogenic potential occurred. Additionally, the reestablishment of miR-451 expression in NTERA-2 was related to a regulation of the PDK1 and WDFY2 proteins, molecular targets predicted for the regulation of this miRNA. In the JEG-3 lineage it was associated with a decrease in the protein levels of PDK1, PI3K α and pAKT. Taken together, our data suggest that miR-451 may be involved in the regulation of several key processes in germ cell tumors and its role in regulating the PIK3 α /AKT pathway should be better assessed as a potential therapeutic alternative in GCT.

Keywords: germ cell tumor, miR-451, overexpression, functional assays, cisplatin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores de Células Germinativas

Os tumores de células germinativas (TCGs) fazem parte de um grupo raro e heterogêneo de neoplasias, clínica e patologicamente complexo, que ocorre desde o período neonatal até a idade adulta¹. De ordem maligna ou benigna, eles podem ocorrer em sítios gonadais ou extragonadais (ao longo da linha média, no sistema nervoso central, mediastino, retroperitônio e região sacrococcígea), tendo como origem as células germinativas primordiais pluripotentes^{2,3}.

Uma hipótese que explica a formação destes tumores propõe que durante a embriogênese, as células germinativas primordiais migram pela linha média para dar origem às gônadas e caso ocorra uma migração imperfeita, essas células podem se estabelecer em regiões extragonadais⁴. A partir deste momento, essas células ou seus progenitores são submetidos a estímulos do microambiente em que se encontram, iniciando um subsequente processo de diferenciação, gerando o desenvolvimento dos tumores de células germinativas⁵⁻⁷.

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os TCGs em: (I) Germinoma (seminoma quando localizado no testículo, disgerminoma quando no ovário); (II) Tumor de seio endodérmico; (III) Carcinoma embrionário; (IV) Coriocarcinoma; (V) Tumores mistos e (VI) Teratoma (maduro ou imaturo)⁸(Figura 1).

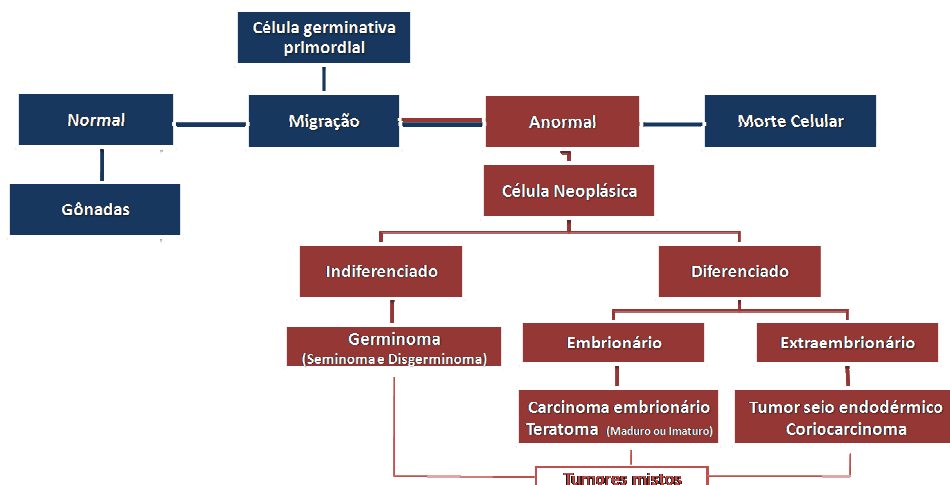


Figura 1- Representação esquemática da histogênese dos tumores de células germinativas. Adaptado de Masters. J. *et al*, 2003⁹.

O diagnóstico dos TCGs geralmente é feito após as manifestações clínicas da doença, por meio de exame físico, avaliação do nível de marcadores séricos, exames de imagem e avaliação histopatológica^{5,10}.

Marcadores séricos como alfa-fetoproteína (AFP), porção beta da gonadotrofina coriônica humana (β -HCG) e desidrogenase láctica (DHL) desempenham um papel importante no diagnóstico, classificação histológica, estadiamento, decisões terapêuticas, seguimento e monitoramento da doença^{5, 11, 12}. Os tumores não-seminomas foram os primeiros a serem relatados com aumento de DHL, sua elevação também vem sendo relacionada com a progressão do seminoma puro. Os tumores com elementos do saco vitelínico produzem AFP e os derivados do tecido trofoblástico, β -hCG. Os teratomas maduros e os germinomas não secretam AFP ou β -hCG. Esses marcadores são encontrados em cerca de 70-80% dos tumores não-seminomatosos de testículo⁵. A meia vida destes marcadores para AFP (5-7 dias), β -HCG (24-36 horas) e DHL (10 horas-3 dias). Contudo, tais marcadores apresentam algumas limitações quanto à sensibilidade e especificidade, sendo necessária a investigação de novos biomarcadores¹³.

Algumas alterações moleculares, como aneuploidia, e a duplicação do braço curto do cromossomo 12p são conhecidas em TCGs, e recentemente foram descritas alterações nos cromossomos 7, 21, 22 e X¹⁴. Mutações oncogênicas em *KRAS*, além de amplificações e mutações em *KIT* em seminomas também já foram reportadas^{14, 15}. Alguns estudos relatam que são raras a presença de mutações em *BRAF* em TCGT (1% seminomas e 2% em não seminomas)^{15, 16}. Porém, um estudo recentemente realizado pelo nosso grupo demonstrou ausência de mutação em *BRAF* em pacientes com TCGT¹⁷.

Os TCGs apresentam diferenças no comportamento clínico e na resposta terapêutica, acredita-se que essa diferença seja justificada pelo grau de diferenciação celular, faixa etária do paciente, subtipo histológico, localização do tumor e diferenças no perfil de expressão gênica⁵.

A incidência de tumores de células germinativas vem aumentando nos últimos 20 anos, porém os motivos que levaram a este aumento são desconhecidos. Os TCGs são mais incidentes em homens brancos hispânicos e menos incidentes em homens asiáticos e negros. Apenas 50% dos TCGs têm localização gonadal durante a infância, enquanto na idade adulta, essa localização representa 95% de todos os tumores^{18, 19}.

Os tumores da infância são biologicamente distintos dos adultos, e sua incidência é de 4 casos/milhão em crianças, e de 14 casos/milhão em adultos²⁰. Tumores de células germinativas pediátricos são raros, e 80% deles são benignos, 20% são malignos (2-3% de todos os tumores pediátricos malignos)²¹.

Na infância, a maioria dos tumores de células germinativas são extragonadais e ocorrem principalmente na região sacrococcígea²¹. Entretanto, dados do protocolo brasileiro descreve maior ocorrência de tumores gonadais na infância, (42,9% ovário e 26,3% testículo) e apenas 15,2% dos pacientes com tumor sacrococcígeo como principal sítio, o que difere de outros estudos. Essas diferenças podem ser explicadas, a maioria dos pacientes possivelmente era de grandes centros de tratamento de câncer e aqueles com tumores de estágio baixo foram encaminhados para centros de oncologia²²

O TCG tornou-se uma doença altamente curável, mesmo quando diagnosticado em estágios clínicos avançados, com o advento clínico da quimioterapia à base de cisplatina, a partir da década de 1970²³. Atualmente, a cirurgia e quimioterapia, principalmente à base de platina, etoposide e bleomicina (BEP), são os principais tratamentos utilizados, alcançando altas taxas de cura²⁴. Geralmente, pacientes com doença recorrente ou refratária são tratados com radioterapia e transplante de medula, porém eles não são sempre curados²².

A toxicidade causada por quimioterápicos é uma importante barreira no tratamento dos TCGs, mesmo baixas doses de cisplatina podem causar morbidade a longo prazo²⁵. Em pacientes com idade inferior a 18 anos classificados como risco intermediário, recentemente um trabalho demonstrou que a redução da terapia para dois fármacos (PE) não comprometeu a sobrevida dos pacientes²²

Em torno de 20% dos pacientes são refratários ao tratamento²⁶. Dependendo da localização e do tipo histológico a probabilidade de uma cura pode ser inferior a 50%²⁵. As recidivas ocorrem em 1-3% de todos os casos com doença avançada e a maioria das recaídas são observadas em até dois anos após a conclusão do primeiro tratamento^{27, 28}. Isso ocorre principalmente em pacientes que apresentam resistência à quimioterapia, possivelmente devido às características biológicas distintas apresentadas pelos tumores²⁹. Definir o risco da doença para que a terapia e a toxidade possam ser adequadamente reduzidas para alguns pacientes e intensificada para outros é de extrema importância²⁵.

Recentemente, um estudo do nosso grupo identificou a metilação dos genes *MGMT* e *CALCA* associadas com mal prognóstico e doença refratária em TCGT³⁰.

Ainda hoje, o sistema de estratificação de risco clínico não garante a distinção entre pacientes com TCG que terão excelentes resultados, daqueles que apresentarão resistência à quimioterapia e posterior recidiva da doença³¹.

Os mecanismos moleculares relacionados à capacidade individual de resposta dos pacientes com TCG ao tratamento representam um importante aspecto para o desenvolvimento de novos regimes terapêuticos mais eficazes para pacientes que apresentam resistência à cisplatina, sendo assim, uma área de grande interesse para novos estudos.

1.2 MicroRNAs e câncer

O câncer é um processo de múltiplas etapas em que as células normais sofrem mudanças genéticas e epigenéticas e progridem através de estado pré-maligno (iniciação), em câncer invasivo (progressão), podendo se espalhar por todo o corpo (metástase). As células transformadas são capazes de proliferar de forma independente aos sinais de crescimento, e não responder a inibição do crescimento e morte celular programada, elas superam os limites de replicação intrínseca, induzem e sustentam a angiogênese e formam colônias distantes do tumor primário³².

As alterações genéticas levam a mudança de bases do DNA, mutações, deleções e inserções, enquanto as alterações epigenéticas são aquelas que modificam o perfil de expressão dos genes através de mecanismos regulatórios, como por exemplo, regulação exercida pelos RNAs pequenos não-codificantes (e.g. microRNAs), metilação do DNA e modificações de histonas³²⁻³⁴.

Originalmente descoberto em *Caenorhabditis elegans*, os microRNAs são encontrados na maioria dos eucariotos, incluindo os humanos. MicroRNAs, podem afetar todas as etapas da progressão tumoral, incluindo crescimento tumoral, invasão, capacidade metastática, angiogênese e predição da resposta terapêutica³⁵.

Os microRNAs são pequenas sequências de RNA, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que se ligam à sequências complementares na região 3' não traduzida (UTR) ou em outras regiões do seu RNA mensageiro (RNAm alvo), dessa forma regulando a expressão gênica³⁶. Acredita-se que um RNAm possa ser reconhecido por vários microRNAs, e que essas interações resultem no silenciamento gênico, através da indução da degradação

do mRNA ou a inibição da tradução da proteína^{37, 38}. A razão pela qual um único microRNA possa regular múltiplos genes é devido a sua versatilidade na hora do pareamento, onde a assimetria entre o microRNA e seu RNAm alvo é comumente observada³⁹.

A maioria dos microRNAs são transcritos pela via de biogênese convencional, também chamada de canônica. Através da RNA polimerase II, gerando um pri-miRNA em torno de 1kb (kilobase). Esses transcritos primários apresentam estruturas em forma de “grampo” (*stem-loop hairpin*). E ainda no núcleo, esta estrutura primária sofre ação de uma RNA polimerase III (Drosha/DGCR8) formando uma nova estrutura com aproximadamente 70 nucleotídeos (pré-miRNA). Este precursor é transportado ao citoplasma através de um receptor nuclear XPO5 (exportina5), sendo então clivado por outra RNA polimerase III (DICER) formando o microRNA maduro. No entanto, existem caminhos alternativos de biogênese, a via não-canônica, que diferem o número de clivagens e enzimas responsáveis. Assim, os pré-microRNAs não são processados por Drosha e podem sofrer *splicing*. Sendo as etapas subsequentes idênticas na via canônica e não canônica. Uma das fitas se incorpora ao complexo de proteínas denominado RISC, e este direciona a ligação do miRNA ao RNA mensageiro alvo^{40, 41}. A figura 2 representa a biogênese dos microRNAs.

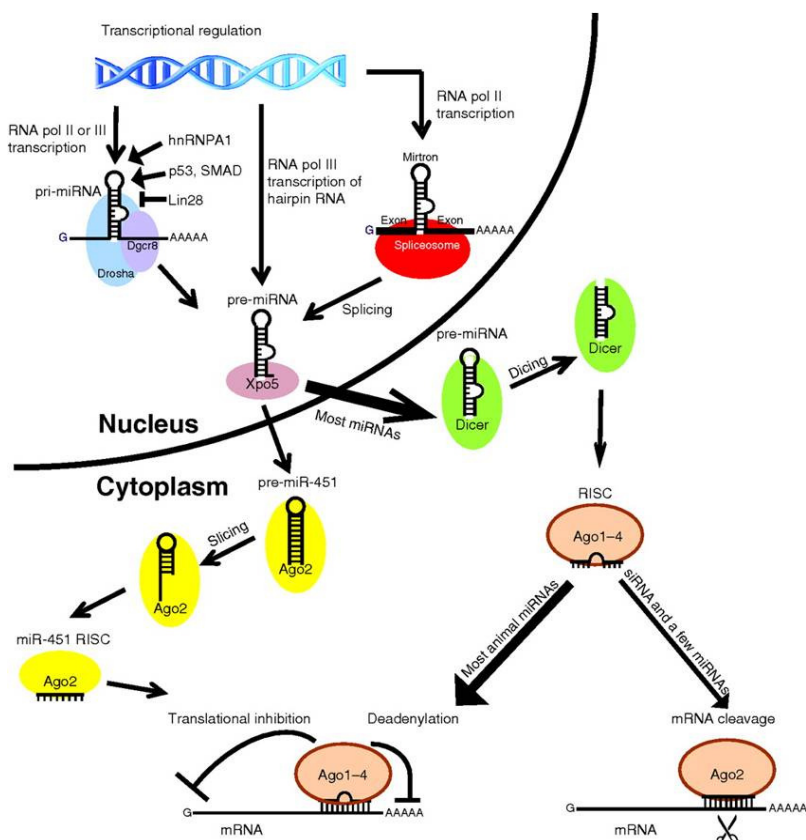


Figura 2- Biogênese dos microRNAs. Retirado de Rui Yi *et al*, 2011⁴¹.

Vários estudos têm demonstrado que a expressão de microRNAs é muito importante para a manutenção de processos fisiológicos normais das células³⁸. Entretanto, alterações nos níveis de expressão de microRNAs têm sido exaustivamente relacionadas ao estabelecimento de processos patológicos, incluindo o câncer⁴². Ainda, os microRNAs podem atuar como oncogenes (onco-miR) ou genes supressores tumorais, um único microRNA pode desempenhar papéis distintos em diferentes tecido dependendo do contexto celular³⁵. Por exemplo, o miR-22, foi relatado como oncogene em tumor de mama, enquanto que em câncer hepatocelular tem uma característica de gene supressor^{43, 44}.

Os microRNAs têm papel importante na transformação maligna, e alterações na expressão de microRNAs já foram encontradas em diversos tipos de tumor. Essas alterações já foram associadas à pior sobrevida global, estágio mais avançados da doença, desenvolvimento de metástases e recidivas em TCGs de testículo^{24, 45}.

1.3 MicroRNAs em tumores de células germinativas.

Os microRNAs desempenham um papel importante na patogênese do câncer e na resposta de células cancerígenas à quimioterapia, e têm sido demonstrado que eles modulam a sensibilidade das células aos quimioterápicos⁴⁶. A avaliação de microRNAs no sangue tem revelado maior sensibilidade na indicação de recaída de pacientes com TCG do que os marcadores séricos tradicionais^{45, 47}.

Um estudo realizado com tumores de células germinativas de testículo de adultos (TCGTs), avaliou um *cluster* de microRNAs, revelando a alta expressão dos microRNAs 371 - 373 nestes tumores, sugerindo que eles podem atuar como oncogene em TCGTs, através da inibição do gene supressor de tumor LATS2⁴⁸. Subsequentemente, outro estudo demonstrou que esse mesmo conjunto de microRNAs era superexpresso em TCGTs de adultos, quando comparado com testículos controles normais e, após o término do tratamento foi possível observar uma diminuição destes microRNAs a valores considerados normais⁴⁹.

Posteriormente, também foi demonstrado em TCGTs malignos que o conjunto de miR 371-373 tem papel oncogênico e são superexpressos independente do subtipo histológico (tumor de saco vitelínico, seminoma ou carcinoma embrionário), local (gonadal/extragonadal) ou idade do paciente (adulto/pediátrico), ocorrendo a sua diminuição significativa após a conclusão do tratamento, mostrando que a avaliação

desses microRNAs no soro pode ser clinicamente valiosa e que eles podem ser utilizados como biomarcadores⁵⁰⁻⁵².

Estudos realizados com o miR-21 têm mostrado sua atividade oncogênica através da regulação da tumorigênese, progressão tumoral e quimioresistência^{53, 54}. Um trabalho realizado *in vitro* com uma linhagem de TCG de teratocarcinoma ovariano, demonstrou que o miRNA promove a manutenção da pluripotência de populações de células tronco tumorais⁵⁵. Outro estudo realizado com miR-21, em células de neuroblastoma constatou aumento na sua expressão após o estabelecimento de uma linhagem resistente a cisplatina em comparação com a mesma linhagem parental, corroborando sua associação com a quimioresistência⁵⁶.

Além disso, a superexpressão do miR-302a na linhagem celular de carcinoma embrionário NTERA-2 demonstrou aumentar a quimiossensibilidade da linhagem a cisplatina. A superexpressão do miR-302a em conjunto com a cisplatina levou as células a uma parada no ciclo celular na fase G2/M, através da regulação de p21, e posteriormente a apoptose⁵⁷.

Há pouca informação disponível a respeito do perfil de microRNAs em TCGs, mas já foi demonstrado que uso dos seus níveis séricos pode dar origem a uma nova dimensão de biomarcadores potencialmente específicos e sensíveis. A investigação do papel dos microRNAs pode auxiliar no diagnóstico, prognóstico ou mesmo permitir que novas abordagens terapêuticas sejam utilizadas em TCGs.

1.4 miR-451 e câncer.

O miR-451 é amplamente desregulado no câncer e desempenha papel crítico na tumorigênese e progressão tumoral⁵⁸. No genoma humano, o miR-451 está localizado no cromossomo 17 na posição 17q11.2 e foi identificado inicialmente como supressor tumoral em câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), tendo como alvo o gene RAB14, regulando a via AKT, desencadeando a apoptose⁵⁹.

Em carcinoma de bexiga o miR-451 é downregulado na comparação do tecido tumoral com o adjacente normal e a superexpressão do miR-451 inibiu a migração e invasão⁶⁰. Em carcinoma hepatocelular, sua baixa expressão foi correlacionada com recidiva precoce, metástases e menor sobrevida⁶¹. E *in vitro* sua superexpressão conduziu a

regulação negativa da ciclina D1 e c-Myc através da inibição de NF- κ B, o que levou a inibição da progressão do ciclo celular⁶². Em carcinoma de mama foi demonstrado que o miR-451 regula a expressão do gene MDR1, um fator crucial na resistência a Doxorrubicina neste tipo tumoral^{63, 64}. Abaixa expressão do miR-451 também foi relacionada com a progressão e pior prognóstico de pacientes com osteossarcoma, e através de análise de bioinformática demonstra-se que um dos alvos deste microRNA é a quimiocina CXCL16, e que a expressão do miR-451 é inversamente associado com os níveis de CXCL16⁶⁴.

O aumento da expressão do miR-451 tem sido sugerido como uma estratégia terapêutica útil para o tratamento de gliomas, tendo em vista que sua re-expressão levou a uma diminuição da proliferação *in vitro* e *in vivo* de células de glioma, através da redução da ativação da proteína AKT, que possui importante papel no controle de sobrevivência celular⁵⁹.

Ainda, na linhagem celular de carcinoma de não pequenas células de pulmão (CPNPC), A549, o aumento de expressão do miR-451 resultou em maior sensibilidade destas células em resposta ao tratamento com cisplatina, sugerindo que a modulação de expressão deste miRNA pode ser utilizada como potencial estratégia terapêutica, principalmente nos CPNPC resistentes à cisplatina⁶⁵.

Uma análise de expressão global de microRNAs em tumores de cabeça e pescoço identificou o miR-451 com menor expressão em tumores quando comparado ao tecido normal. Ainda, foi o único que demonstrou ser significativamente menos expresso em pacientes que recaíram da doença, ou seja, resistentes ao tratamento, em comparação com os que não recaíram⁶⁶. Além disso, pacientes com carcinoma nasofaríngeo que apresentaram menor expressão de miR-451 apresentam pior prognóstico, ou seja menores taxas de sobrevida global ou livre de eventos, em relação aos pacientes com maior expressão deste miRNA⁶⁶. A cisplatina também é utilizada no tratamento quimioterápico de pacientes com tumores de cabeça e pescoço, sendo associada a melhora na sobrevida livre de progressão destes pacientes^{67, 68}.

Em conjunto, todos estes relatos reforçam o papel do miR-451 como um importante supressor tumoral em tecidos humanos. Entretanto, em TCGs o papel do miR-451 ainda não foi elucidado.

1.5 Resistência à cisplatina em TCGs e via PI3K/AKT

A quimioterapia a base de platina é uma importante estratégia terapêutica e amplamente aplicada na prática clínica para o tratamento dos TCGs, no entanto, sua eficácia é limitada devido à resistência⁴⁶. A cisplatina atua ligando-se ao DNA no núcleo celular, formando adutos que desestabilizam a dupla hélice, assim resultando na inibição da replicação e da transcrição, levando a célula a apoptose ou necrose⁶⁹. Após quatro décadas dos seus benefícios clínicos serem reconhecidos, os estudos ainda buscam entender exatamente como a cisplatina funciona e quais os mecanismos de resistência são associadas com a droga⁷⁰.

Os mecanismos de resistência à cisplatina são multifatoriais e envolvem a absorção reduzida de droga, o aumento da inativação da droga, aumento da reparação de danos no DNA, e a inibição da transmissão de sinais de reconhecimento de danos no DNA para a via apoptótica⁶³.

Em pacientes com TCG, a resistência é definida de forma diferenciada, quando comparada a outros tumores sólidos. Por ser altamente curável, a resposta incompleta ou recaída, não importando a quão significativo foi à resposta inicial é considerado indicativo de resistência à cisplatina^{16, 71}. As recaídas são geralmente observadas durante ou no prazo de dois anos após a conclusão do primeiro tratamento sistêmico, já as recidivas ocorrem após este período de tempo em 1-3% dos pacientes com doença avançada⁴⁶. Para ultrapassar a barreira da resistência, doses mais elevadas de fármacos são administradas, resultando em efeitos colaterais indesejados⁷². Além disso, terapias de resgate atingem respostas na maioria das vezes de curta duração, e a sobrevida destes pacientes permanece baixa, com taxas entre 5-15%⁷³.

Embora para muitos tumores já se tenha conhecido que algumas alterações moleculares confirmam resistência à quimioterapia, as diferenças moleculares entre doença curável e incurável permanecem desconhecidas nos TCGs⁷⁴.

Mutações em genes supressores tumorais clássicos ou em oncogenes são raras, e quando presentes, não são sempre associadas a resistência à cisplatina. Exemplos são os genes *TP53* e *RB* raramente mutados em TCG^{75, 76}. Tem sido proposto que o sucesso do tratamento com cisplatina em tumores de células germinativas quando comparado a outras

malignidades é conferida justamente pela integridade da via do *TP53* e *RB*, que facilitam a indução à apoptose em resposta a danos no DNA^{75, 77}.

Anormalidades na via de sinalização PI3K/AKT são comumente observadas no câncer, e elas são associadas à tumorigênese, uma vez que a ativação desta via pode levar ao aumento da proliferação, migração, e invasão celular⁷⁸. Análises funcionais em linhagens celulares e amostras de pacientes indicam o papel desta via na quimioresistência^{79, 80}. O bloqueio da via PI3K/AKT pode aumentar a citotoxicidade das drogas e a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia⁷⁸.

A superexpressão do miR-451 já foi associada com aumento de sensibilidade e resposta a cisplatina em câncer de pulmão não pequenas células, através da regulação da via de sinalização PI3K/AKT⁶⁵. A primeira evidência da desregulação da via foi apresentada por Di Vizio et al. (2005) mostrando a perda de função de PTEN em TCGs⁸¹. Outro relato analisou a presença de mutações somáticas nos genes PI3K/AKT1 em amostras tumorais de pacientes sensíveis e resistentes à cisplatina, em que se observou uma maior frequência de alterações nesta via, em TCGs resistentes à cisplatina¹⁶. Entretanto, a presença de mutações em genes desta via não explica ao todo a resistência à cisplatina em TCG, uma vez que grande parte dos pacientes que apresentam resistência não tem mutações nestes genes.

Tendo em vista que apesar das altas taxas de cura no TCG uma parcela considerável dos pacientes não responde bem ao tratamento e apresenta resistência à cisplatina, compreender os mecanismos envolvidos na regulação da via PI3K/AKT parece ser extremamente relevante nos TCGs. A relação entre a expressão de microRNAs e sensibilidade à cisplatina em TCG não foi amplamente explorada. Acreditamos que a perda de expressão do miR-451 pode estar associada a ativação da via PI3K/AKT e que isso possa contribuir para o estabelecimento do fenótipo resistente das células de TCG.

Assim, baseado por todo o exposto, nós propomos neste projeto avaliar de forma abrangente o papel funcional do miR-451 em linhagens celulares de TCGs e seu impacto na resposta destas células ao tratamento com cisplatina. O desenvolvimento deste projeto pode contribuir no esclarecimento do papel deste miRNA na biologia dos TCGs e no mecanismo de resistência destas células a cisplatina, bem como poderá auxiliar na identificação de um novo alvo molecular para o estabelecimento e direcionamento de novas estratégias terapêuticas. Além disso, essa abordagem pode ter um impacto substancial em

pacientes que apresentam doença resistente à cisplatina, e que são refratários ao tratamento mesmo após a realização do transplante de medula.

2 OBJETIVO PRINCIPAL

Realizar a caracterização funcional da ação do miR-451, a partir da modulação da expressão deste miRNA e verificar seu impacto na resposta a cisplatina em linhagens celulares de tumores de células germinativas.

2.1 Objetivos Específicos

- I. Estabelecer a superexpressão permanente do miR-451 em linhagens celulares de TCG;
- II. Avaliar o impacto do miR-451 em processos biológicos celulares nas linhagens selecionadas, a partir de ensaios *in vitro*;
- III. Avaliar o impacto do miR-451 na via de sinalização de PI3K/AKT nestas linhagens;
- IV. Avaliar o impacto do miR-451 na resposta destas linhagens ao tratamento com cisplatina.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura e seleção das linhagens celulares tumorais de TCG

As linhagens celulares de tumores de células germinativas NTERA-2 e JEG-3 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ - <http://bcrj.org.br>). Ambas foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico *Penicillin-Streptomycin* (Invitrogen), mantidas a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada.

Foram realizados testes de autenticação das linhagens pela análise de STR (*short tandem repeat*) de acordo com os padrões internacionais para autenticação de linhagens celulares, no Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos⁸³.

Ambas as linhagens celulares foram selecionadas por fazerem parte do grupo não seminoma, que são mais associadas a recidiva e resistência à cisplatina em tumores de células germinativas. A linhagem NTERA-2 representa a histologia não seminoma mais comum. Essa linhagem foi originalmente isolada de um paciente de 22 anos do sexo masculino, a partir de uma metástase pulmonar de carcinoma embrionário primário de testículo. O tumor foi xenoenxertado em ratos *nude*, e destes clones celulares foi derivada a linhagem⁸⁴. A linhagem JEG-3 representa a histologia de coriocarcinoma, que apesar de ser um tumor raro, e o tipo agressivo e mais comunmente refratário ao tratamento com cisplatina. A linhagem celular tumoral JEG-3 foi estabelecida a partir de um coriocarcinoma placentário humano. As células tumorais foram xenoenxertadas em ratos *nude*, e a partir dessas células malignas se derivou a linhagem⁸⁵.

3.2 Descongelamento, manutenção, passagem e congelamento das linhagens celulares

As células foram descongeladas por um minuto em banho maria a 37°C, em seguida foram adicionadas a tubos contendo 7ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, centrifugadas e ressuspensas em 5ml de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino. Após, elas foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm² (TPP) com seu meio específico, até obterem 80% de confluência. Em seguida foram lavadas com 1mL de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS-Sigma Aldrich), e removidas do frasco com a

incubação de 750 uL de *Tryple express* (Gibco) por aproximadamente 4 minutos a 37°C. Em seguida, 5 mL de meio de cultura completo foram usados na inativação da tripsina. Após a inativação, as células foram transferidas para novos frascos de cultura (T25) na proporção de 1:2. As células utilizadas em todos os testes se encontravam em terceira passagem ou superior para garantir os padrões celulares estáveis após o descongelamento.

Para o congelamento as linhagens foram trispsinizadas, inativadas com meio de cultura, centrifugadas e ressuspensas em solução de congelamento (SFB + 5% DMSO) e imediatamente colocadas em tubos de criopreservação (Corning). Em seguida foram acondicionadas por uma hora a -20°C e posteriormente a -80°C.

3.3 Contagem de células

Após a tripsinização e inativação, as células foram contadas com auxílio do contador de células automatizado *Countess* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. A suspensão celular da linhagem JEG-3 foi filtrada antes da contagem usando membranas com poros de 40µm (BD Biosciences), pois as células frequentemente apresentam grumos após o processo de tripsinização, o que impossibilita a contagem precisa das células e um plaqueamento uniforme. A quantidade necessária de células viáveis para cada experimento foi aliquoteada e semeada.

3.4 Transfecção celular nas linhagens celulares de TCG

Inicialmente a superexpressão do miR-451 foi realizada com *MISSION MicroRNA Mimics* (Sigma-Aldrich), que fornece oligonucleotídeos sintéticos que mimetizam a ação dos miRNAs. A transfecção das linhagens celulares tumorais foi realizada utilizando o agente *INTERFERin*® (*Polyplus-transfection*).

Basicamente, 2×10^5 células foram plaqueadas em placas com 2 mL de meio de cultura com 10% SFB e acondicionadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24 horas, 20nM do *mimic hsa-miR-451* (Sigma-Aldrich) com *INTERFERin*® (*Polyplus-Transfection*) foi adicionada para permitir a formação dos complexos de transfecção. Em seguida, os complexos foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Após esse período, as células foram

lavadas três vezes com DPBS e posteriormente submetidas aos ensaios funcionais. Realizamos a análise de expressão do miR-451 nas linhagens e confirmamos a eficiência da transfecção.

3.5 Avaliação do perfil mutacional em genes associados à via PI3K/AKT nas linhagens NTERA-2, JEG-3 e em tumores de células germinativas de testículos

Avaliamos *in silico* o perfil mutacional dos genes associados com a via PI3K/AKT nas linhagens NTERA-2 e JEG-3 através dos dados disponíveis no *Cosmic Cell Lines Project* (http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines). E em amostras de tumores de células germinativas de testículo através do banco de dados do TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>).

3.6 Determinação do IC₁₀₀ para seleção das células resistentes a puromicina

Para determinar o valor do IC₁₀₀ (concentração que inibe 100% da viabilidade celular) foi construída uma curva dose-resposta à puromicina para as linhagens selecionadas. A quantidade de 3×10^3 células foi semeada em placa de 96 poços, com DMEM suplementado com 10% SFB, Penicilina e Streptomicina 1%. Depois de 24 horas foram adicionadas doses crescentes de puromicina (Sigma Aldrich).

Após 72 horas do tratamento com o antibiótico, foi realizado o ensaio de viabilidade celular em solução aquosa por meio de um método colorimétrico, o *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Para este ensaio, as células foram semeadas em três repetições. A absorbância foi avaliada através do *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific) a 490 nm. Selecionamos a menor dose de puromicina capaz de inviabilizar 100% das células.

3.7 Transdução celular nas linhagens celulares de TCG

Após a seleção das linhagens NTERA-2 e JEG-3 a superexpressão do miR-451 foi realizada por meio da transdução com o vetor lentiviral *MISSION[®] Lenti microRNA Human HSA-miR-451*, sendo utilizado o vetor *MISSION[®] Lenti micro RNA Human Negative Control*

(Sigma Aldrich) como controle negativo. Esses vetores virais são baseados no plasmídeo lentiviral pLKO.miRNA.puro que contém o promotor do fator de alongação E1 α para a expressão do miRNA e também o gene de resistência a puromicina. Para otimizar a transdução nas células alvo usamos um polímero catiônico hexadimetrina (Sigma Aldrich).

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços com meio de cultura sem antibiótico e suplementado com 10% SFB, a uma densidade de 50%. Após 24 horas, as células foram transduzidas com as partículas virais contendo o vetor de expressão do miR-451 e do vetor controle com um miRNA irrelevante. As células foram transduzidas na concentração de uma partícula viral por célula (MOI=1 partícula/célula), com 8 μ g/mL de hexadimetrina, em 400 μ L de meio DMEM suplementado com 10% SFB, Penicilina e Streptomicina 1%. Além disso, também utilizamos dois controles experimentais, a linhagem parental sem nenhum tratamento e a linhagem parental tratada apenas com hexadimetrina e puromicina. Em seguida, as células foram incubadas em estufas a 37⁰C e 5% CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram plaqueadas em placas de petri de 10 cm de diâmetro, em três diluições diferentes (1:10, 1:100 e 1:2.000). As células remanescentes também foram plaqueadas para obtenção de um *pool* celular. Foi utilizado meio suplementado com 10% SFB, com antibiótico puromicina, sendo substituído a cada 4 dias, durante 20 dias para seleção dos clones resistentes a puromicina. Além disso, realizamos a individualização de clones por citometria de fluxo e por tripsinização.

3.7.1 Seleção de células por citometria de fluxo

Depois de 10 dias da transdução, a população celular foi submetida ao *single cell sorting* para o isolamento de clones celulares. As células foram tripsinizadas, inativas e lavadas 2x com *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS - Sigma Aldrich), após, foram ressuspensas em DPBS com 0,2% de BSA e então individualizadas por citometria de fluxo (*Cell sorter FACS Aria II*- BD Biosciences) considerando o tamanho e a complexidade celular em placas de 96 poços. Posteriormente os clones foram submetidos ao *screening* de expressão para seleção daqueles que apresentavam expressão de miR-451.

3.7.2 Seleção de colônias celulares por tripsinização

Realizamos a seleção tendo como base a maior diluição (1:2000), utilizando colônias isoladas derivadas de um único clone. Após 16 dias do plaqueamento, as colônias foram marcadas, lavadas com *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS-Sigma Aldrich), e removidas através de um pedaço de papel filtro contendo tripsina, suficiente para recobrir apenas uma colônia. Após 5 minutos as células se aderem ao papel filtro, possibilitando sua transferência para placa de cultura de 24 poços. Os clones foram submetidos ao *screening* de expressão para seleção daqueles que apresentavam expressão de miR-451.

3.8 Extração do RNA total e avaliação da expressão do miR-451

O RNA das linhagens foi extraído com o reagente *TRIZOL* (Invitrogen). Foi adicionado 1 mL do reagente em garrafa de cultura (T25) 80% confluenta para completa lise celular e exposição do material genético. Em seguida, foi realizada a separação das fases aquosas, intermediária e orgânica com a adição de 200 µL de clorofórmio. A precipitação do RNA foi realizada com adição de 750 µL de Isopropanol (MERCK) e 1 µL de glicogênio (20µg/µL) após a centrifugação à 6000 rpm por 10 minutos. O RNA extraído foi deixado em temperatura ambiente para evaporação e ressuspendido com 20 µL de água ultrapura.

Posteriormente, a síntese de cDNA foi realizada a partir de 10ng de RNA, com *Universal cDNA synthesis kit II RT* (Exiqon) conforme recomendações do fabricante.

Após, o nível de expressão do miR-451 nas linhagens foi avaliado por meio de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizando os ensaios *LNA PCR primers set* (Exiqon) específicos para o miR-451, em conjunto com o *ExiLENT SYBR Green Master Mix* (Exiqon) no aparelho *ABI prism®7900HT Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Para a normalização dos resultados de expressão foi utilizado o gene de referência *SNORD48*. Para o cálculo de expressão normalizada dos microRNAs foi utilizado o modelo matemático; $2^{-\Delta Cq}$, em que ΔCq corresponde à diferença entre o Cq do transcrito alvo e o Cq do transcrito do gene de referência⁸⁶.

3.9 Avaliação da viabilidade celular (MTS)

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio de MTS (Promega), que consiste em um método colorimétrico que determina indiretamente o número de células viáveis nos ensaios de viabilidade ou citotoxicidade. O método é baseado no composto tetrazólio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS] usado como um reagente de acoplamento de elétrons (fenazinaethosulfate; PES). O PES possui uma estabilidade química melhorada, o que lhe permite ser combinado com MTS para formar uma solução estável colorida. Ao medir a absorbância das diferentes amostras, pode-se inferir o número de células viáveis em cada condição estabelecida. Utilizamos neste ensaio, 5×10^3 células, semeadas em placas de 96 poços. Após cada período de tempo, foram adicionados 10 μ L do reagente de MTS diluído em 90 μ L de meio de cultura em cada poço, e sua absorbância foi no equipamento *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific) a 490 nm, após três horas de incubação nos intervalos de 24, 48 e 72 horas.

Os dados referentes à absorbância foram obtidos e convertidos em porcentagem média $\pm$ desvio padrão de viabilidade celular, e normalizados contra a sobrevivência média da linhagem relativa ao tempo de 24 horas, correspondendo a 100% de viabilidade. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

3.10 Ensaio de proliferação celular (DAPI)

Para a avaliação da proliferação celular e obtenção de uma curva de crescimento foi realizada a coloração das células com DAPI (*Sigma Aldrich*), um fluoróforo marcador de ácidos nucleicos. Para este ensaio, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços. O número de células foi quantificado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Após cada intervalo, as células foram lavadas 3x com DPBS e fixadas com 100 μ L metanol 100% a -20°C por 5 minutos. Posteriormente, as células foram novamente lavadas com DPBS e então adicionado 100 μ L de DAPI 1 $\mu\text{g/mL}$ e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. As imagens foram capturadas com a objetiva de 4x utilizando o equipamento *IN Cell Analyzer 2200* (GE Healthcare) com o filtro de 400 nm. Foram adquiridas 4 imagens de cada poço da

placa e os núcleos celulares marcados com DAPI presentes em cada campo foram quantificados utilizando o programa *IN Cell Analyzer 1000 Workstation* (versão 3.7.3). Os dados referentes à fluorescência de cada núcleo foram obtidos e convertidos em porcentagem média $\pm$ desvio padrão de proliferação celular, e normalizados contra a sobrevivência média da linhagem relativa ao tempo de 24 horas, correspondendo a 100% de proliferação. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

3.11 Ensaio de migração celular (*transwell*)

Para o ensaio de migração celular foi utilizado o ensaio da *BD Falcon Multi well insert system* (BD Biosciences). Após a realização da transdução do miRNA, no compartimento inferior dos poços foi colocado meio de cultura suplementado com 10% SFB e, 1×10^5 células foram adicionadas com meio de cultura sem SFB aos compartimentos superiores dos insertos, incubadas a 37°C por 24 horas. As células que tiveram a capacidade de migrar e atravessar a membrana do inserto foram fixadas com metanol 100% e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram visualizadas e fotografadas utilizando estereomicroscópio (Olympus S2616), sendo posteriormente quantificadas através do programa *ImageJ*. Os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e biológicas. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem média $\pm$ desvio padrão normalizados em relação a migração média da linhagem transduzida com o controle negativo.

3.12 Ensaio de invasão celular

A propriedade de invasão das linhagens celulares foi avaliada pelo ensaio em matrigel com a utilização do *Biocoat Matrigel Invasion Chamber* (BD Biosciences). Após a realização da transdução do miRNA, o matrigel foi hidratado por 2 horas com meio de cultura sem soro. Posteriormente, no compartimento inferior dos poços foi colocado meio de cultura suplementado com 10% SFB e, 1×10^5 células foram adicionadas aos compartimentos superiores dos insertos, incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período,

o matrigel foi removido e os insertos fixados com metanol 100%, e corados com hematoxilina e eosina. Os insertos foram fotografados utilizando estereomicroscópio (Olympus S2616), e as células quantificadas no programa *ImageJ*. Os experimentos foram realizados em duplicatas biológicas e experimentais.

Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem média $\pm$ desvio padrão normalizados em relação à invasão média da linhagem transduzida com o controle negativo.

3.13 Ensaio de formação de colônia (clonogênico)

As células (5×10^2) foram plaqueadas em placas de 12 poços com meio de cultura suplementado e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 12 dias. A seguir, as colônias foram fixadas com metanol 100% durante 5 minutos e coradas com cristal violeta 0,03% por 10 minutos. Após, os poços foram lavados abundantemente com água destilada. As células foram fotografadas utilizando estereomicroscópio (Olympus S2616). Então, foi adicionado 1 mL de ácido acético 33% (MERK) em cada poço e a placa foi incubada por 5 minutos.

Posteriormente a absorbância foi medida no equipamento Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) a 440 nm. Os dados referentes à absorbância foram obtidos e convertidos em porcentagem média $\pm$ desvio padrão, e normalizados em relação à clonogenicidade média da linhagem transduzida com o controle negativo, correspondendo a 100%. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas.

3.14 Busca *in silico* para seleção de alvos do miR-451

Por meio do banco de dados de predição de alvos para microRNAs, *miRWalk* (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), foi realizada 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'UTR⁸⁷. Tais parâmetros são avaliados pelo programa por meio de algoritmos que buscaram aumentar a probabilidade de se ter uma sequência alvo do miR-451.

Foram selecionados os genes preditos em quatro ou mais algoritmos, e que estavam associados a processos biológicos, tais como proliferação, migração, invasão e apoptose.

Após, utilizando a ferramenta *on-line STRING* (<http://string-db.org/>) foram avaliadas possíveis interações entre as proteínas alvo selecionadas com as proteínas PI3K e AKT.

3.15 Western Blot

Após a transdução, as células foram lisadas com tampão “RIPA” (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% desoxicolato de sódio, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS), acrescido de coquetel de inibidores de protease (5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 25 µg/ml aprotinin e 1mM). Posteriormente, a quantificação de proteínas foi realizada usando o *Bio Rad Protein Assay* (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante.

Aproximadamente 20 µg de proteína total foram separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (10-12%) com SDS e, em seguida, foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-P – Amersham Biosciences). As membranas foram bloqueadas durante uma hora a temperatura ambiente com TBST (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂ e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 12-16 horas com anticorpos primários específicos para cada proteína. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente, e então, as reações foram reveladas com a solução *ECL Western blotting analysis system* (Cell Signaling) no *ImageQuant™ LAS 4000 mini* (GE Healthcare). A intensidade das bandas obtidas foi quantificada por densitometria pelo programa *ImageJ*. A expressão da proteína β-actina foi usada como controle interno de normalização para as proteínas totais. Para a normalização de pAKT foi utilizada a proteína AKT total. Após as normalizações de expressão das proteínas em porcentagem em relação ao controle negativo.

Todos os anticorpos foram diluídos e armazenados segundo as recomendações dos seus fabricantes. Os anticorpos utilizados neste trabalho estão listados abaixo (tabela 1) com as respectivas informações e diluições utilizadas.

Tabela 1- Relação de anticorpos utilizados nos ensaios de western blot.

Anticorpos	Diluição	Condição	Fabricante
βactina	1:2000	12-16 horas	CellSignaling
CAB39	1:1000	12-16 horas	CellSignaling
pPDK1	1:1000	12-16 horas	CellSignaling
PDK1	1:1000	12-16 horas	CellSignaling
WDFY2	1:200	12-16 horas	Abcam
PI3Kα	1:1000	12-16 horas	CellSignaling
pAKT	1:1000	12-16 horas	CellSignaling
AKT	1:1000	12-16 horas	CellSignaling
Anti-mouse IgG	1:2000	1 hora	CellSignaling
Anti-rabbitIgG	1:2000	1 hora	CellSignaling

3.16 Determinação do IC₅₀ para avaliar a resposta ao tratamento com cisplatina

Para determinar o valor do IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) baseado na literatura, foi construída uma curva dose-resposta à cisplatina para as linhagens transduzidas com miR-451 e com controle negativo. Foram semeadas 3x10³ células em placa de 96 poços com DMEM suplementado com 10% SFB, com Penicilina e Streptomicina 1%. Depois de 24 horas, foram acrescentados em cada triplicata pontos de concentrações crescentes de cisplatina. Após 72 horas do tratamento com o quimioterápico foi adicionado 10μL do reagente MTS diluído em 90μL de meio de cultura em cada poço e sua absorbância foi medida no equipamento Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) a 490 nm, após 3 horas de incubação. Os dados brutos obtidos foram convertidos em porcentagem média ± desvio padrão e normalizados em relação à sobrevivência média das amostras tratadas apenas com NaCl 0,9%, o veículo de diluição específico da cisplatina (controle), para comparação entre os IC₅₀. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e duplicatas biológicas.

3.17 Análise Estatística

Para comparação entre os grupos experimentais, foi utilizado o teste de Mann-Whitney através da análise das médias e do desvio padrão. Foi considerada em todas as análises, a significância estatística de $p < 0,05$. Os gráficos foram gerados utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5.01).

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos, Brasil, (CEP: 947/2015) apenas para ciência deste comitê, uma vez que o estudo utilizou apenas linhagens celulares comerciais de tumores de células germinativas, e dispensa aprovação do comitê para o uso deste tipo de amostras biológicas (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da expressão do miR-451 em linhagens celulares de tumores de células germinativas

Inicialmente a expressão do miR-451 foi avaliada em cinco linhagens celulares de TCG: NTERA-2, 1777N, 1411H, JEG-3 e N2102. Os resultados demonstraram a menor expressão deste miRNA nestas linhagens, quando comparadas a um *pool* de tecidos normais (*Ambion's First Choice® Human Total RNA Survey Panel*) (Figura 3).

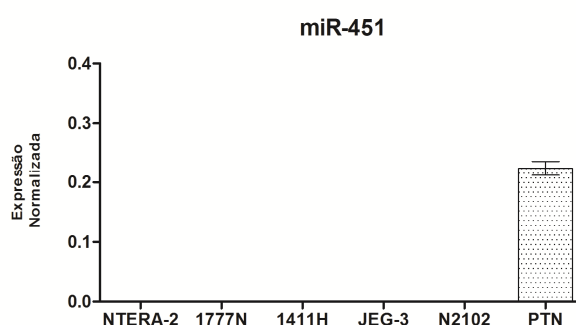


Figura 3- Expressão normalizada do miR-451 nas linhagens celulares tumorais de TCG. PTN: *pool* de tecidos normais. Os níveis de expressão foram obtidos pelo método matemático $2^{-\Delta Cq}$, sendo a normalização realizada pela expressão do controle endógeno SNORD48. As barras verticais indicam o desvio padrão dos experimentos.

Além disso, experimentos iniciais demonstraram que o restabelecimento da expressão do miR-451 na linhagem de TCG 1777N resultou em uma diminuição significativa no potencial de migração e invasão destas células (Figura 4).

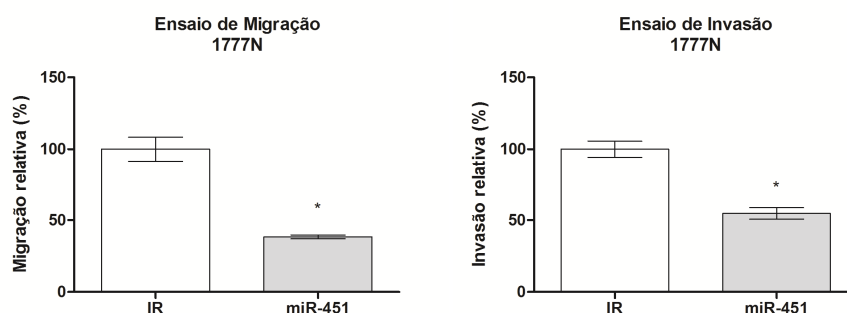


Figura 4- Impacto da expressão ectópica do miR-451, na migração e invasão da linhagem 1777N. Ambos experimentos foram desenvolvidos pelo ensaio de transwell e avaliadas após 24 horas. IR: linhagem parental transfectada com um miRNA irrelevante (controle negativo); miR-451: linhagem parental transfectada com o miRNA de interesse. As barras verticais indicam o desvio padrão. Teste de Mann-Whitney; * $p < 0,05$, comparado ao IR.

Assim, estes resultados indicaram as primeiras evidências de que o miR-451 pode ter um importante papel funcional em tumores de células germinativas. Após a obtenção destes resultados, selecionamos as linhagens celulares tumorais NTERA-2 e JEG-3 para a condução dos ensaios funcionais.

5.2 Avaliação do perfil mutacional em genes associados à via PI3K/AKT nas linhagens NTERA-2, JEG-3 e em tumores de células germinativas de testículos

A avaliação de mutações foi realizada através dos dados disponíveis no *Cosmic Cell Lines Project* (http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines) nas linhagens NTERA-2 e JEG-3. Foram avaliados os genes *ACLY*, *AKT*, *ATG13*, *ATM*, *ATR*, *ATXN1*, *BAD*, *BAX*, *BCL2L11*, *CAB39*, *CCNA2*, *CCDC88B*, *CDK2*, *CKDN1B*, *CHUK*, *DEPTOR*, *EBP*, *FOXO1*, *GABRG2*, *HTT*, *IL2*, *IRS1*, *JAK1*, *KITLG*, *LYN*, *MTOR*, *MYT1*, *NOS3*, *PALD1*, *PDCD4*, *PDPK1*, *PFKFB2*, *PHLPP1*, *PIKFYVE*, *PPP2CA*, *PRKDC*, *PTEN*, *PTK2*, *RICTOR*, *RPS6*, *SKP2*, *SYK*, *TBK1*, *TP53*, *TRAF*, *TSC1*, *TSC2*, *TSPY1*, *WDFY2*, *WEE1*, *XIAP* e *WHAB*. Praticamente todos os genes avaliados não apresentavam mutações, com exceção de mutações *missense* encontradas nos genes *ATR* (c.6259A>G) na linhagem NTERA-2, e *ATG13* (c.1021G>A) e *ATXN1* (c.419C>G) na linhagem JEG-3 (Tabela 2). Porém os efeitos causados por essas mutações ainda não foram determinados.

Adicionalmente, nosso grupo reportou que as linhagens NTERA-2 e JEG-3 não apresentam mutações na região promotora do gene *TERT*, *BRAF* (V600E) e ambas apresentam estabilidade de microssatélites^{17, 88}.

Além disso, nós avaliamos *in silico* o perfil mutacional dos mesmos genes em células germinativas de testículo utilizando o banco de dados do TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>). Nas 155 amostras analisadas, observamos uma baixa frequência de mutação para os genes analisados (Figura 5).

Esses dados demonstram que as linhagens celulares de tumores de células germinativas NTERA-2 e JEG-3 apresentam poucas mutações em genes que tem papel importante na regulação da via PI3K/AKT, reforçando assim que a regulação da via possa ocorrer por outros mecanismos moleculares.

Tabela 2 - Análise do perfil mutacional das linhagens celulares tumorais NTERA-2 e JEG-3.

Gene	NTERA-2	JEG-3	Gene	NTERA-2	JEG-3
<i>ACLY</i>	selvagem	selvagem	<i>MYT1</i>	selvagem	selvagem
<i>AKT</i>	selvagem	selvagem	<i>NOS3</i>	selvagem	selvagem
<i>ATG13</i>	selvagem	selvagem	<i>PALD1</i>	selvagem	selvagem
<i>ATM</i>	selvagem	mutado	<i>PDCD4</i>	selvagem	selvagem
<i>ATR</i>	mutado	selvagem	<i>PDPK1</i>	selvagem	selvagem
<i>ATXN1</i>	selvagem	mutado	<i>PFKFB2</i>	selvagem	selvagem
<i>BAD</i>	selvagem	selvagem	<i>PHLPP1</i>	selvagem	selvagem
<i>BAX</i>	selvagem	selvagem	<i>PIKFYVE</i>	selvagem	selvagem
<i>BCL2L11</i>	selvagem	selvagem	<i>PPP2CA</i>	selvagem	selvagem
<i>CAB39</i>	selvagem	selvagem	<i>PRKDC</i>	selvagem	selvagem
<i>CCNA2</i>	selvagem	selvagem	<i>PTEN</i>	selvagem	selvagem
<i>CCDC88B</i>	selvagem	selvagem	<i>PTK2</i>	selvagem	selvagem
<i>CDK2</i>	selvagem	selvagem	<i>RICTOR</i>	selvagem	selvagem
<i>CDKN1B</i>	selvagem	selvagem	<i>RPS6</i>	selvagem	selvagem
<i>CHUK</i>	selvagem	selvagem	<i>SKP2</i>	selvagem	selvagem
<i>DEPTOR</i>	selvagem	selvagem	<i>SYK</i>	selvagem	selvagem
<i>EBP</i>	selvagem	selvagem	<i>TBK1</i>	selvagem	selvagem
<i>FOXO1</i>	selvagem	selvagem	<i>TP53</i>	selvagem	selvagem
<i>GABRG2</i>	selvagem	selvagem	<i>TRAF6</i>	selvagem	selvagem
<i>HTT</i>	selvagem	selvagem	<i>TSC1</i>	selvagem	selvagem
<i>ILK</i>	selvagem	selvagem	<i>TSC2</i>	selvagem	selvagem
<i>IRS1</i>	selvagem	selvagem	<i>TSPY1</i>	selvagem	selvagem
<i>JAK1</i>	selvagem	selvagem	<i>WDFY2</i>	selvagem	selvagem
<i>KITLG</i>	selvagem	selvagem	<i>WEE1</i>	selvagem	selvagem
<i>LYN</i>	selvagem	selvagem	<i>XIAP</i>	selvagem	selvagem
<i>MTOR</i>	selvagem	selvagem	<i>YWHAB</i>	selvagem	selvagem

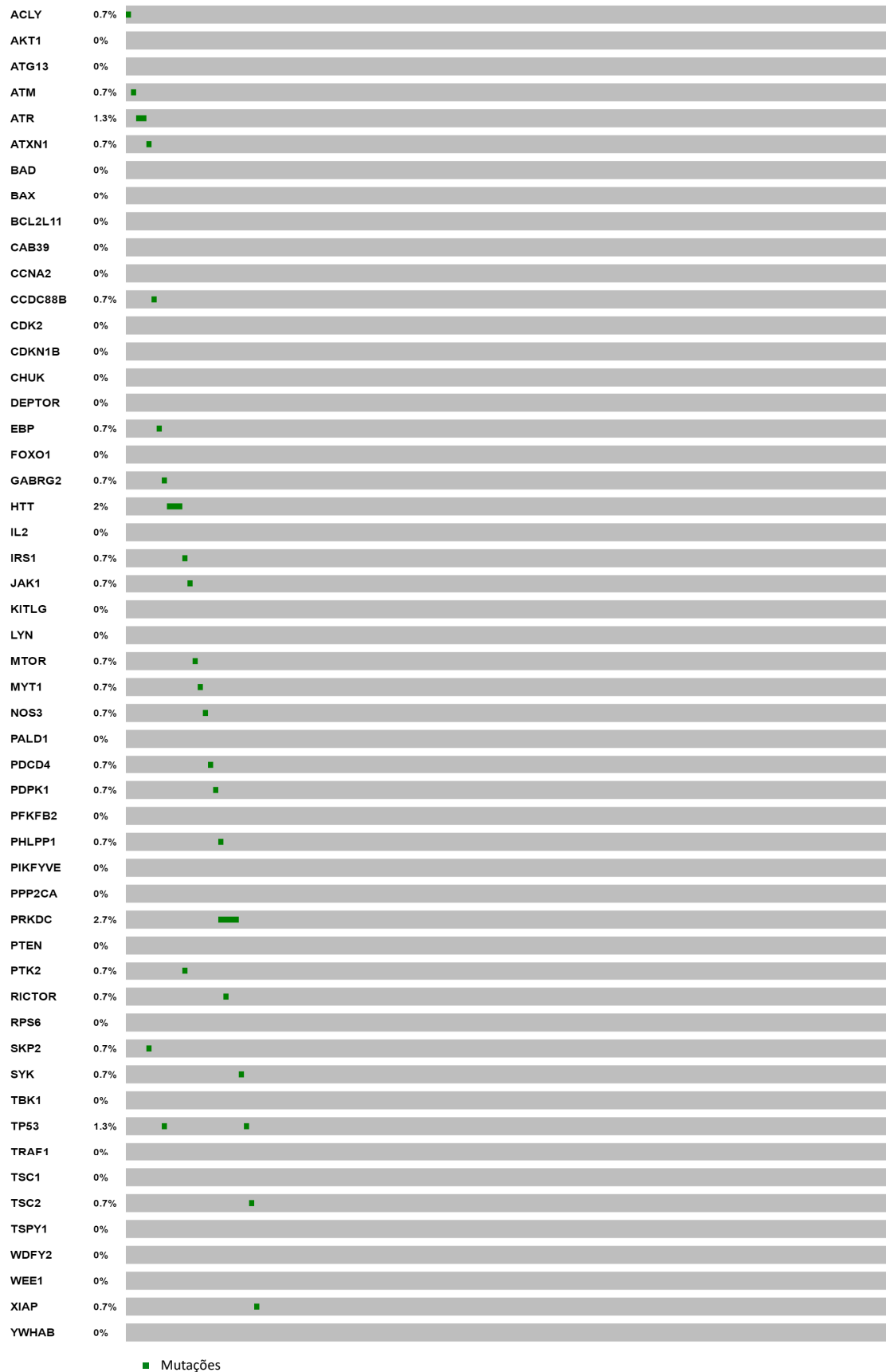


Figura 5- Análise de mutações em tumores de células germinativas de testículo do consórcio internacional *The Cancer Genome Atlas*. Os genes da via PI3K/AKT foram avaliados por meio de sequenciamento de nova geração. Os retângulos cinza representam cada uma das amostras avaliadas, em um total de 155 amostras, e os retângulos verdes indicam a presença de mutação.

5.3 Determinação do IC₁₀₀ para seleção das células resistentes a puromicina.

As células transduzidas com *Lenti microRNA* foram selecionadas com puromicina, já que o vetor lentiviral possui o gene de resistência a este antibiótico. Para determinar a quantidade de puromicina necessária para selecionar as células transduzidas, foi construída uma curva dose-resposta de puromicina nas linhagens parentais. Para a linhagem celular NTERA-2 foram utilizadas as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 µg/mL, e para a linhagem JEG-3 foram usadas as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 1,875, 2,5 e 5,0 µg/mL.

Após 72 horas do tratamento com antibiótico, o ensaio de viabilidade celular determinou o efeito das diferentes concentrações de puromicina. (Figura 6). A partir desse resultado, para linhagem NTERA-2 foi determinada a concentração 0,5 µg/mL e para linhagem JEG-3 de 2,5 µg/mL para seleção das linhagens após a transdução com o lentivírus.

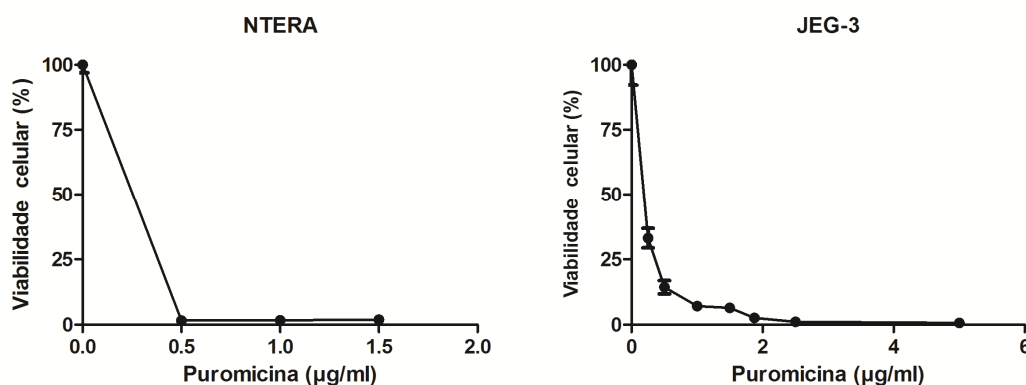


Figura 6- Determinação do IC₁₀₀ da puromicina nas linhagens celulares NTERA-2 e JEG-3. Após 72 horas do tratamento com o antibiótico o ensaio de viabilidade celular determinou o efeito das diferentes concentrações de puromicina.

5.4 Avaliação da expressão do miR-451 nas linhagens celulares NTERA-2 e JEG-3 após a transdução

A avaliação de expressão do miR-451 demonstrou que microRNA não é expresso nas linhagens parentais de TCG NTERA-2, 1777N, 1411H, JEG-3 e N2102. Assim, selecionamos as linhagens celulares NTERA-2 e JEG para a transdução celular e a seleção com puromicina. Os clones das duas linhagens foram submetidos ao *screening* de expressão para avaliação do nível de expressão do miR-451.

Para a linhagem NTERA-2 foram sete clones transduzidos com o microRNA irrelevante através da citometria de fluxo e 11 clones transduzidos com o miR-451, sendo que sete deles foram isolados por citometria de fluxo e quatro com filtro contendo tripsina. Todos os clones transduzidos com o microRNA irrelevante não apresentavam expressão do miR-451 (expressão indetectável), assim como as linhagens parentais. Além disso, observamos superexpressão do microRNA em sete dos 11 clones transduzidos com o miRNA, sendo que apenas quatro clones não apresentaram aumento no nível de expressão do miR-451 (dois clones selecionados por citometria e dois com filtro) (Figura 7).

A partir da avaliação do nível de expressão na linhagem NTERA-2, selecionamos para conduzir os experimentos funcionais o *pool* celular transduzido com o miRNA irrelevante (IR), o clone 4 (nível de expressão do miR-451 mais próximo ao testículo normal) e o clone 6 (nível de expressão do miR-451 aumentado em relação testículo normal). A fim de facilitar a distinção entre os clones selecionados, chamaremos o clone 4 de clone A, e o clone 6 de clone B.

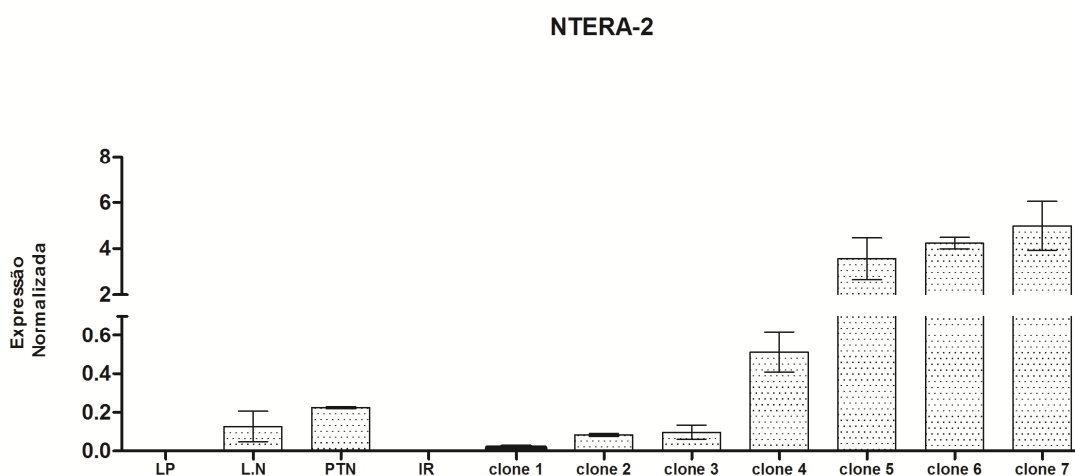


Figura 7- Análise da expressão do miR-451 na linhagem celular NTERA-2. LP: linhagem parental sem qualquer tratamento, LN: linfonodo normal, PTN: pool de testículos normais (*Ambion's First Choice® Human Total RNA Survey Panel*), IR: clone transduzido com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clones transduzidos que apresentam expressão do miR-451. Os níveis de expressão foram obtidos pelo método matemático $2^{-\Delta C_q}$, sendo a normalização realizada pela expressão de controle endógeno SNORD48. As barras verticais indicam o desvio padrão das duplicatas dos experimentos.

Para a linhagem celular JEG-3 foram selecionados cinco clones transduzidos com o microRNA irrelevante, sendo dois deles selecionados por citometria de fluxo, e três colônias celulares isoladas com filtro contendo tripsina. Ainda, foram obtidos 11 clones transduzidos com o miR-451, sendo seis deles selecionados por citometria de fluxo e cinco com filtro contendo tripsina. Todos os clones transduzidos com o microRNA irrelevante não

apresentavam expressão do miR-451 (expressão indetectável). Além disso observamos um aumento de expressão do miR-451 em todos os clones selecionados, após a transdução da linhagem JEG-3 (Figura 8).

Após a avaliação do nível de expressão na linhagem JEG-3, selecionamos para conduzir os experimentos funcionais o *pool* celular transduzido com o miRNA irrelevante (IR), o clone 8 (nível de expressão do miR-451 mais próximo ao de testículo normal) e o clone 11 (nível de expressão do miR-451 superior ao de testículo normal). A fim de facilitar a distinção entre os clones selecionados, chamaremos o clone 8 apenas de clone A, e o clone 11 de clone B.

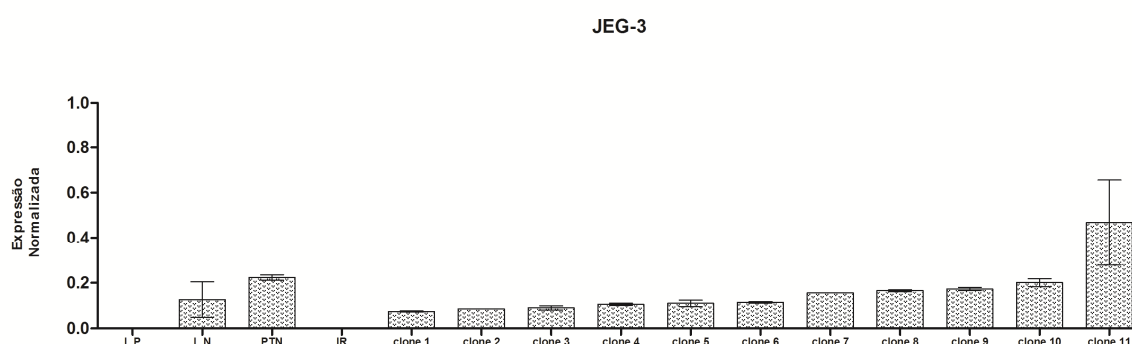


Figura 8- Análise da expressão do miR-451 na linhagem celular JEG-3. LP: linhagem parental sem qualquer tratamento, LN: linfonodo normal, PTN: pool de testículos normais (*Ambion's First Choice® Human Total RNA Survey Panel*), IR: clone transduzido com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clones transduzidos que apresentam expressão do miR-451. Os níveis de expressão foram obtidos pelo método matemático $2^{-\Delta Cq}$, sendo a normalização realizada pela expressão de controle endógeno SNORD48. As barras verticais indicam o desvio padrão das duplicatas dos experimentos.

5.5 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 na viabilidade celular das linhagens de TCG

Após a seleção dos clones, para determinarmos o efeito da superexpressão do miR-451 na viabilidade celular nas linhagens de TCG NTERA-2 e JEG-3 realizamos o ensaio de MTS pelo período de 72 horas com intervalos de 24 horas. Na linhagem NTERA-2 a superexpressão do miR-451 não apresentou impacto na viabilidade celular em 48 horas no clone A e B ($p=0,69$ e $p=0,17$), respectivamente. No tempo de 72 horas não houve impacto no clone A ($p=0,17$), porém no clone B ocorreu um aumento da viabilidade celular ($p=0,02$) (Figura 9).

Entretanto, na linhagem celular JEG-3 foi detectado uma redução da viabilidade para ambos os clones (A e B) avaliados no tempo de 48 horas ($p<0,01$) e em 72 horas ($p<0,01$) (Figura 9).

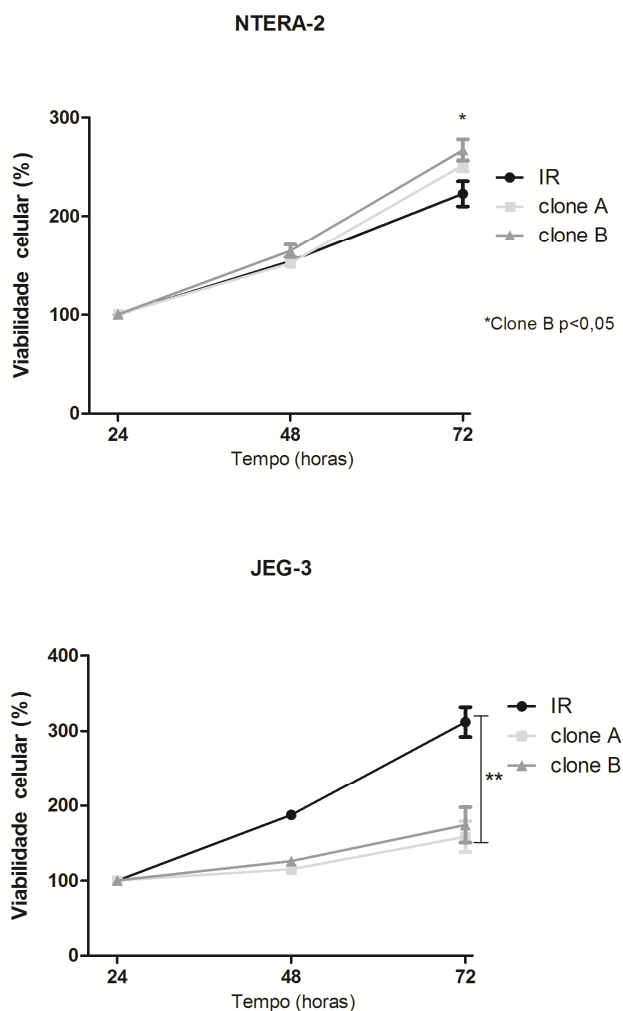


Figura 9- Impacto da superexpressão do miR-451 na viabilidade celular das linhagens de TCG avaliadas. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao *pool* de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao *pool* de testículos normais). As barras verticais indicam o desvio padrão das triplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao tempo de 24 horas (considerado 100% de viabilidade), os asteriscos indicam significância estatística (*) $p<0,05$.

5.6 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de proliferação (DAPI) das linhagens de TCG

O índice de proliferação celular foi avaliado através da coloração dos núcleos celulares com DAPI. Na linhagem NTERA-2 a superexpressão do miR-451 não alterou a proliferação celular em 48 horas no clone A ($p=0,13$), porém no clone B ocorreu um aumento da viabilidade celular ($p=0,01$). Em 72 horas não há diferença estatística entre as condições analisadas, no clone A e B ($p=0,24$ e $p=0,30$), respectivamente (Figura 10).

Na linhagem celular JEG-3 após 48 horas ocorreu uma diminuição da proliferação celular no clone A ($p<0,01$), o mesmo não sendo visto no clone B ($p=0,66$). Em 72 horas encontramos uma redução da proliferação celular para os clones A e B ($p<0,01$) (Figura 10).

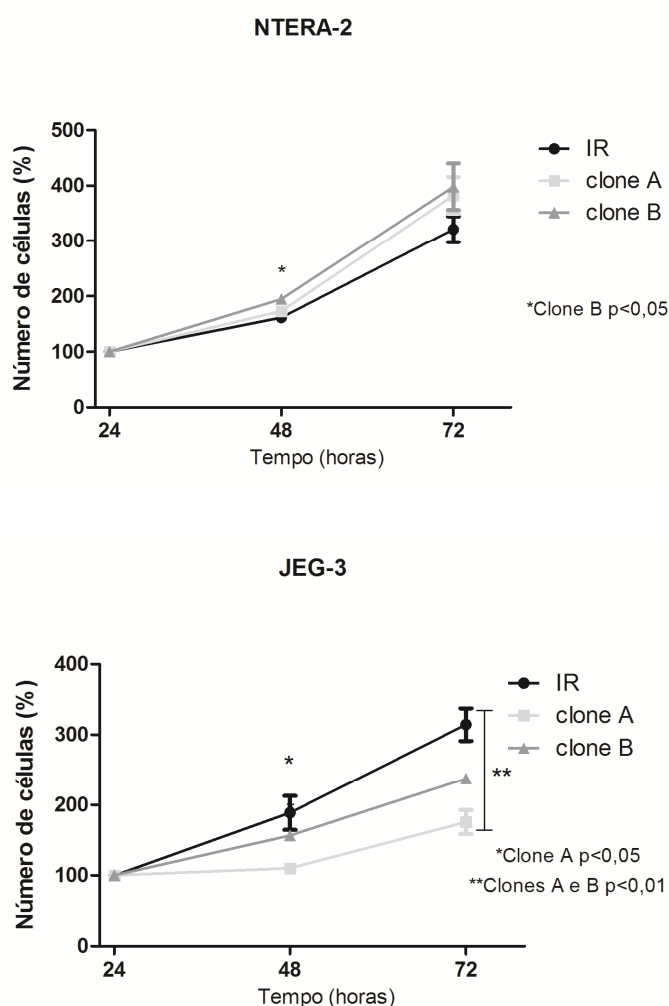


Figura 10- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de proliferação das linhagens de TCG avaliadas. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). As barras verticais indicam o desvio padrão das triplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao tempo de 24 horas (considerado 100% de viabilidade), os asteriscos indicam significância estatística (*) $p<0,05$.

5.7 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de migração celular das linhagens de TCG

Na linhagem NTERA-2, a análise da capacidade de migração pelo ensaio *transwell* mostrou que em ambos os clones expressando o miR-451 ocorre uma diminuição significativa no potencial migratório no clone A ($p<0,01$) e no clone B ($p=0,03$) comparado ao miRNA irrelevante (Figura 11). Na linhagem JEG-3, a superexpressão do miR-451 levou a diminuição da capacidade migratória das células transduzidas no clone A ($p<0,01$), no entanto no clone B ($p<0,01$) ocorreu um aumento significativo na taxa de migração celular (Figura 11).

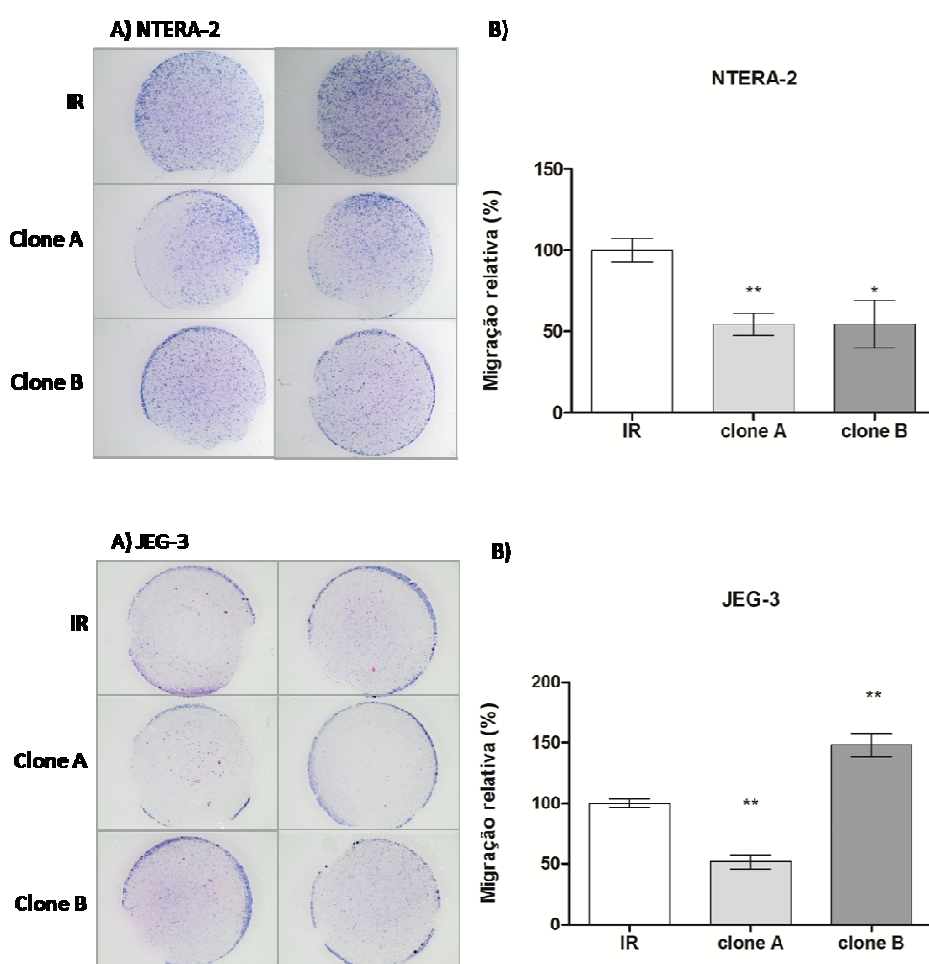


Figura 11- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de migração celular das linhagens de TCG avaliadas. A) Membranas da migração transwell. B) Taxa de migração celular. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). Os experimentos foram avaliados após 24 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão das triplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao IR (considerado 100%). Teste de Mann-Whitney (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$.

5.8 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de invasão celular das linhagens de TCG

Para melhor elucidar o papel do miR-451 na progressão dos tumores de células germinativas realizamos o ensaio de invasão celular nas linhagens NTERA-2 e JEG-3. Nossos resultados mostraram que houve uma significativa diminuição na capacidade de invasão celular da linhagem NTERA-2, no clone A ($p=0,01$), entretanto para o clone B ($p=0,61$) não foi observada diferença significativa (Figura 12). Já a superexpressão do miR-451 em JEG-3, não foi capaz de inibir a invasão celular no clone A ($p=0,76$), porém para o clone B ($p=0,01$) foi observado um aumento significativo na capacidade de invasão celular (Figura 12).

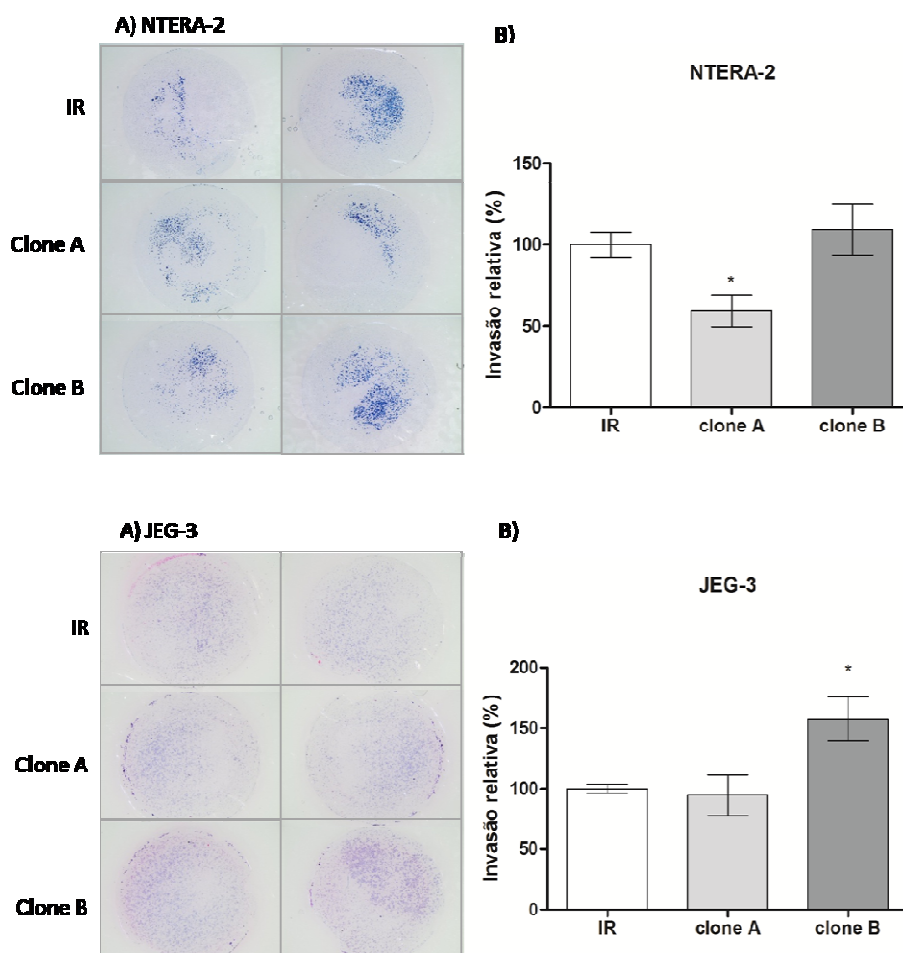


Figura 12- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de invasão celular das linhagens de TCG avaliadas. A) Membranas da invasão transwell. B) Taxa de invasão celular. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). Os experimentos foram avaliados após 24 horas. As barras verticais indicam o desvio padrão das triplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao IR (considerado 100%). Teste de Mann-Whitney (*) $p \leq 0,05$.

5.9 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 no potencial de formação de colônia (clonogênico) das linhagens de TCG.

Buscando determinar o impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de formação de colônias, utilizamos o ensaio de clonogenicidade dependente de ancoragem. Na linhagem NTERA-2, não observamos alterações significativas no potencial clonogênico tanto para o clone A ($p=0,21$) quanto para o clone B ($p=0,07$). (Figura 13). Já na linhagem JEG-3, as células com expressão restabelecida do miR-451 apresentaram menor potencial clonogênico tanto para o clone A ($p<0,01$) quanto para o clone B ($p=0,03$) (Figura 13).

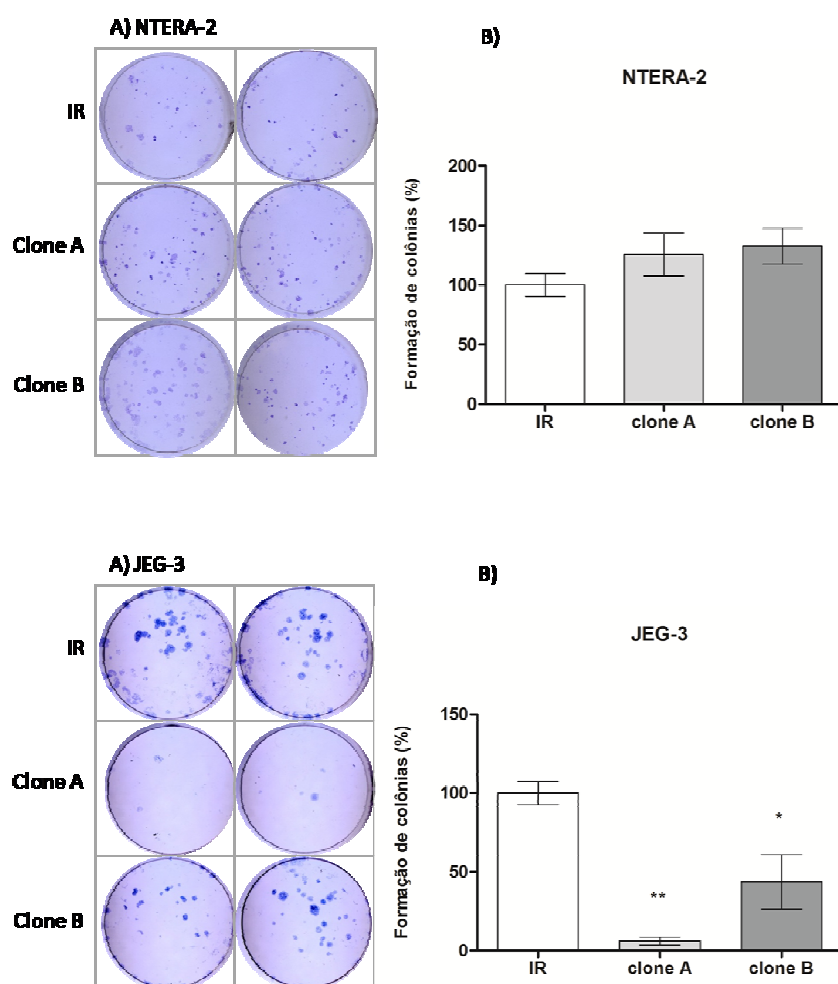


Figura 13- Impacto da superexpressão do miR-451 na capacidade de formação de colônia das linhagens de TCG avaliadas. A) Imagens representativas do ensaio de formação de colônia; B) Quantificação das colônias. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). Os experimentos foram avaliados após 12 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão das triplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao IR (considerado 100%) Teste de Mann-Whitney (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$.

5.10 Busca *in silico* para seleção de alvos do miR-451

Através do banco de dados de predição de alvos para microRNAs, *miRWalk* foram selecionadas as proteínas alvos PDPK1 e WDFY2 para avaliação de regulação pelo miR-451 (Figura 19), além das proteínas PI3K e AKT.

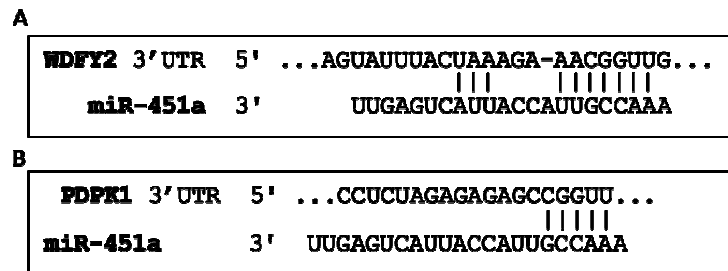


Figura 14- Previsão de alvos do miR-451. Sequência prevista com pareamento na região 3'UTR dos genes WDFY2 (A) e PDPK1 (B) .

Estas proteínas foram reportadas como possíveis alvos do miR-451 por pelo menos quatro algoritmos diferentes, e além disso, elas foram selecionadas porque existem relatos na literatura de que elas estão associadas a processos biológicos envolvidos na tumorigênese e podem estar envolvidas na ativação da via PI3K/Akt^{89, 90}. Através da ferramenta *STRING* geramos uma representação que indica um alto nível de confiança da interação entre as proteínas preditas e a via PI3K/AKT (Figura 14). A partir desses resultados avaliamos o impacto da superexpressão do miR-451 nas proteínas associadas com a via PI3K/AKT.

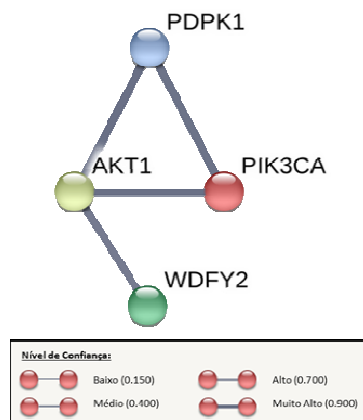


Figura 14- Representação esquemática da rede de interação das proteínas envolvidas na regulação da via de sinalização PI3K/Akt. Essa rede de interação entre as proteínas foi gerada utilizando-se a ferramenta *on-line STRING* (<http://string-db.org/>). A espessura das linhas indica o valor do escore combinado de interação entre as proteínas. Quanta mais espessa maior o escore, ou seja, maior evidência da interação significativa entre as proteínas.

5.11 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 sobre as proteínas associadas com a via PI3K/AKT nas linhagens de TCG

Após transdução, para avaliar o impacto dos potenciais alvos moleculares do miR-451 preditos na análise *in silico* analisamos os níveis das proteínas PDK1, WDFY2, PI3K α e pAKT por western blot. A proteína CAB39 foi utilizada como um controle positivo para ação do miR-451, uma vez que já foi validada como regulada pelo miR-451⁵⁹. E a proteína β -actina foi usada como controle interno de normalização. A análise do nível de proteínas foi realizada nas linhagens celulares de tumores de células germinativas NTERA-2 e JEG-3. Os resultados demonstram que na linhagem celular NTERA-2 ocorreu uma regulação na expressão de PDK1 para ambos os clones ($p=0,02$) e na proteína WDFY2 no clone A ($p=0,02$). Entretanto, nos clones A e B não houve regulação nas proteínas CAB39 ($p=0,88$), PI3K α ($p=0,88$) e pAKT ($p=0,88$) (Figura 15).

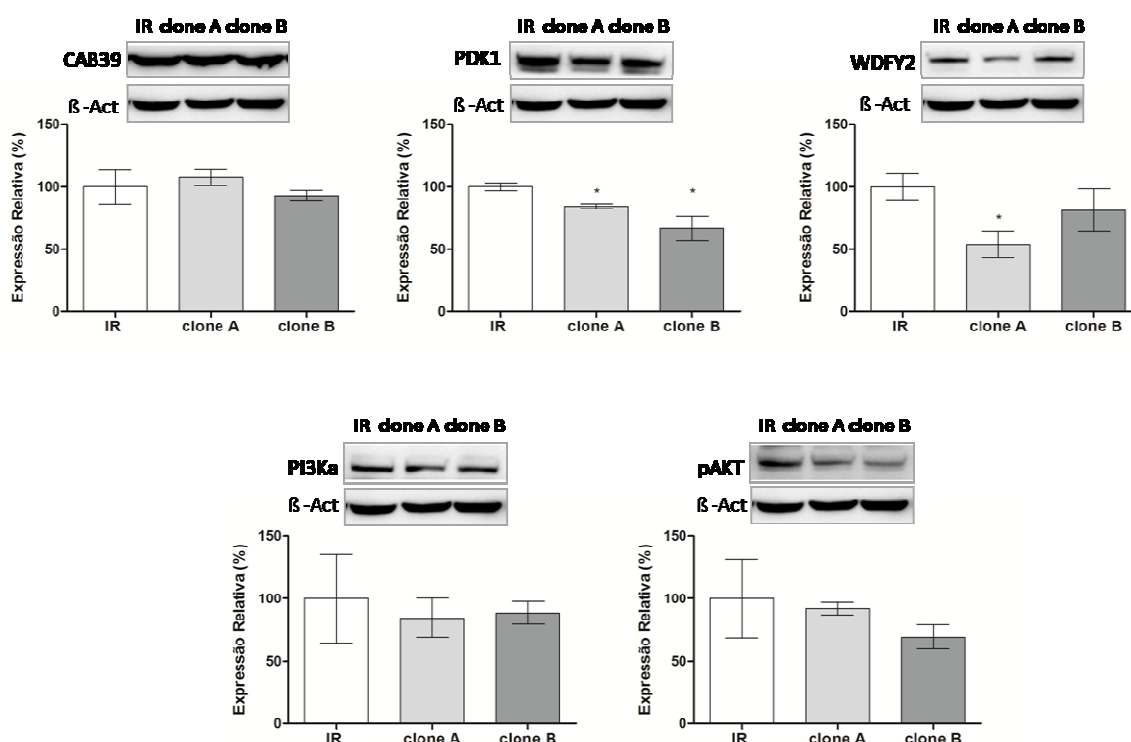


Figura 15- Avaliação da expressão das proteínas CAB39, PDK1, WDFY2, PI3K α e pAKT após a superexpressão do miR-451 na linhagem NTERA-2. Após a transdução a análise de expressão proteica foi realizada por meio de ensaio de *Western Blot*. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). β -act: proteína beta actina (normalizador), pAKT: porção fosforilada da proteína AKT. As bandas referente à expressão das proteínas foram quantificadas por densitometria com auxílio do programa *ImageJ*. As barras verticais indicam o desvio padrão das duplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao IR (considerado 100%). Teste de Mann-Whitney * $p<0,05$.

Na linhagem JEG-3, fica evidenciado que a superexpressão do miR-451 pode estar associado com a regulação das proteínas CAB39 e PDK1 em ambos os clones ($p=0,02$), e com a redução na forma ativa da proteína pAKT para ambos os clones avaliados ($p=0,02$). A proteína WDFY2, não foi regulada nos clone A e clone B ($p=0,30$). E ainda a regulação de PI3K α foi observada somente no clone A ($p=0,02$) (Figura 16).

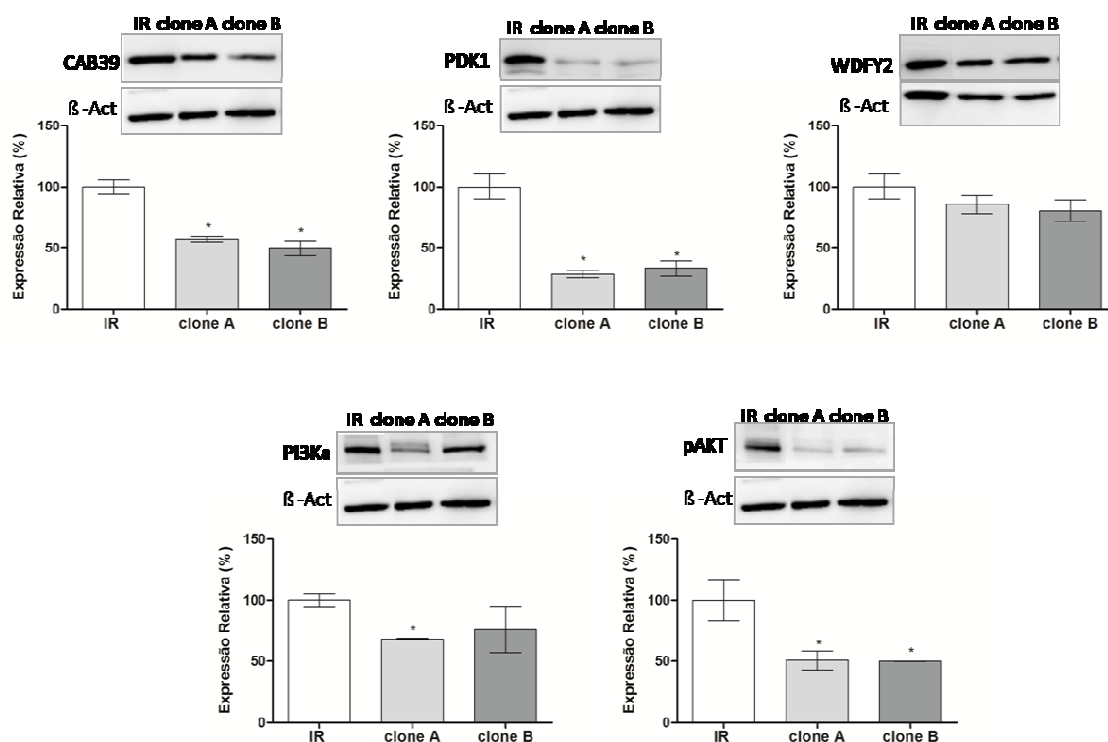


Figura 16- Avaliação da expressão das proteínas CAB39, PDK1, WDFY2, PI3K α e pAKT após a superexpressão do miR-451 na linhagem JEG-3. Após a transdução a análise de expressão proteica foi realizada por meio de ensaio de *Western Blot*. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). β -act: proteína beta actina (normalizador), pAKT: porção fosforilada da proteína AKT. As bandas referente à expressão das proteínas foram quantificadas por densitometria com auxílio do programa *ImageJ*. As barras verticais indicam o desvio padrão das duplicatas dos experimentos, os resultados foram expressos por porcentagem média relativo ao IR (considerado 100%). Teste de Mann-Whitney * $p < 0,05$.

5.12 Avaliação do impacto da superexpressão do miR-451 na resposta ao tratamento com cisplatina das linhagens de TCG

Buscando explorar o papel do miR-451 e seu impacto em relação a resposta a cisplatina nestas linhagens, inicialmente foram determinados os valores de IC₅₀ nas linhagens parentais NTERA-2 (IC₅₀ = 0,05 μ M) e JEG-3 (IC₅₀ = 6,90 μ M). Após a transdução

foram testadas sete concentrações do quimioterápico, variando de 0,125 μM a 50 μM , em NaCl 0,9%.

Nas duas linhagens avaliadas, a superexpressão do miR-451 não teve impacto significativo na respostas células ao tratamento com cisplatina, quando comparamos os valores de IC_{50} obtidos no controle (IR) (Figura 17).

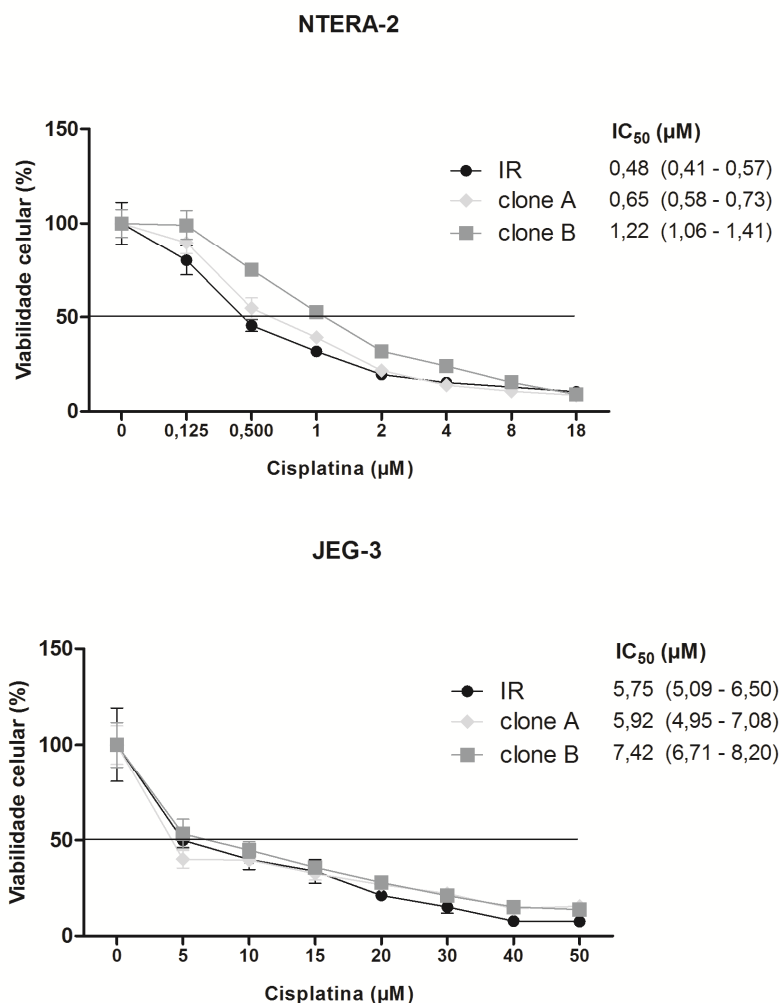


Figura 17-Impacto da superexpressão do miR-451 no tratamento com cisplastina das linhagens de TCG avaliadas. Curva de concentrações de cisplatina. IR: linhagem parental transduzida com um miRNA irrelevante (controle negativo), e clone A (nível de expressão próximo ao pool de testículos normais) e clone B (nível de expressão superior ao pool de testículos normais). Os experimentos foram avaliados após 72hrs. As barras verticais indicam o desvio padrão das triplicatas dos experimentos.

6 DISCUSSÃO

Os tumores de células germinativas são raros e ocorrem mais comumente nos testículo em adultos e na região sacral em crianças. Nas últimas décadas foi observada uma elevação na incidência de TCGs, porém as causas desse aumento permanecem desconhecidas⁹¹. Para os TCGT a exposição a agentes tóxicos no ambiente, predisposição genética e criptorquidismo são fatores associados ao desenvolvimento desses tumores⁹². A tumorigênese é um processo complexo e vários mediadores moleculares influenciam o comportamento tumoral. Ainda, alterações na expressão de microRNAs já foram associadas ao desenvolvimento dos tumores de células germinativas²⁶.

A descoberta do primeiro microRNA aconteceu há mais de 20 anos e deu início a uma nova era na biologia molecular. Atualmente, os microRNAs forneceram uma nova perspectiva sobre a regulação da expressão gênica, acredita-se que eles regulem um terço dos genes no genoma, exercendo papel importante em processos biológicos fundamentais como o controle da diferenciação celular, crescimento e apoptose^{93, 94}.

Os microRNAs constituem uma família de RNAs endógenos pequenos, altamente conservados, que não codificam proteínas, e regulam negativamente a expressão gênica mediando a repressão da transdução ou clivagem de mRNAs. A desregulação de expressão de microRNAs é uma característica comum dos tumores, eles são categorizados em oncogenes ou supressor de tumor⁹³. A perda de expressão de microRNAs pode levar ao aumento da expressão de oncogenes alvo, e o aumento da expressão de microRNAs oncogênicos (oncomirs) pode reprimir a expressão de supressores de tumores alvos⁹⁵. O papel dos microRNAs vem sendo explorado através de estudos funcionais para melhor caracterização de seu papel no diagnóstico, classificação, prognóstico e tratamento do câncer.

O miR-451 tem expressão reduzida em tumores na comparação com o tecido normal em carcinoma de pulmão, carcinoma hepatocelular e em carcinoma de bexiga^{60, 62, 65}. Além disso, pacientes com tumores gástrico que apresentam níveis de expressão mais elevados do miR-451 tem melhor sobrevida⁹⁶. O miR-451 já foi descrito com características de supressor de tumor em gliomas, tumores gástricos e de mama, e a sua superexpressão pode levar ao aumento de sensibilidade a cisplatina em carcinoma de pulmão^{59, 64, 65, 97, 98}. Contrário a isso,

recentemente um trabalho o descreve com característica oncogênica em câncer pancreático⁹⁹. Resultados iniciais de um trabalho realizado pelo nosso grupo com linhagens de tumores de célula germinativa reforçou a hipótese de que o miR-451 tem papel importante como supressor tumoral neste tipo de tumor (vide tópico 5.1).

Assim, o presente estudo buscou caracterizar o efeito da superexpressão *in vitro* do miR-451 em duas linhagens tumorais de tumores de células germinativas, NTERA-2 e JEG-3, e sua resposta ao tratamento com cisplatina.

Neste trabalho a estratégia baseada na utilização de vetores lentivirais foi eficiente para restabelecer a expressão do miR-451 de forma estável e permanente nas linhagens celulares selecionadas. Embora, o sistema lentiviral possa transduzir com alta eficiência células que estão ou não em divisão celular, não é possível controlar o local da inserção e número de partículas virais introduzidas em cada célula, o que pode ocasionar em níveis variáveis de expressão do microRNA, ou mesmo promover o rompimento de genes importantes para a manutenção do fenótipo destas células^{100, 101}.

Após a transdução e isolamento de clones, nós avaliamos o nível de expressão do miR-451 por meio da técnica de RT-qPCR, e conforme esperado, obtivemos clones com diferentes níveis de expressão. Para auxiliar na seleção dos clones que seriam utilizados nos ensaios funcionais, nos baseamos no nível de expressão de um *pool* de testículos normais como referência, buscando obter um nível próximo ao fisiológico. Assim, optamos pela avaliação de dois clones em cada linhagem para verificar se o nível de superexpressão influenciaria nos resultados. Dessa forma, selecionamos um clone que apresentava expressão do miR-451 próximo ao *pool* de testículos normais (clone-A), e um clone que apresentava nível de expressão superior ao do *pool* (clone-B) para condução dos ensaios funcionais.

As células normais controlam cautelosamente os estímulos de crescimento celular, já as células cancerígenas além de não responderem aos estímulos do microambiente podem adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, resultando em uma proliferação demasiada³². Nossos resultados demonstraram que a superexpressão do miR-451 na linhagem NTERA-2 em 48 horas promoveu um aumento da proliferação, e após 72 horas observamos um aumento significativo da viabilidade celular no clone-B. Na linhagem JEG-3, ocorreu a redução na viabilidade celular em ambos os clones e tempos avaliados, já no ensaio de proliferação constatamos uma diminuição da proliferação celular no clone A em

48 horas, e em ambos os clones em 72 horas. Estudos anteriores mostram que a superexpressão do miR-451 leva a redução da proliferação e da viabilidade celular em carcinoma hepatocelular *in vitro* e *in vivo*⁶². Em contraste, no carcinoma pancreático a superexpressão do miR-451 levou a um aumento da proliferação e viabilidade celular *in vitro* e *in vivo*⁹⁹.

A migração e invasão celular são aspectos importantes na progressão tumoral e envolvem a disseminação de células neoplásicas além do sítio primário³². Em nosso trabalho a superexpressão do miR-451 na linhagem NTERA-2 inibiu a migração e invasão celular no clone A. Na linhagem JEG-3 também aconteceu uma redução na migração celular no clone A, por outro lado, de forma inesperada ocorreu um aumento na capacidade de migração e invasão no clone B. Em linhagens de carcinoma de nasofaringe e no câncer colorretal gástrico a superexpressão do miR-451 levou a uma redução da capacidade de migração e invasão, além de suprimir o crescimento de tumores de nasofaringe em camundongos xenoinxertados^{96, 102}.

A disseminação do câncer para outros tecidos acontece quando células que se desprenderam do tumor conseguem se estabelecer e formar colônias celulares em outros órgãos, dando origem a metástase³². O ensaio clonogênico realizado na linhagem JEG-3 mostrou um decréscimo no número e no volume das colônias para ambos os clones analisados, já o potencial clonogênico na linhagem NTERA-2 não foi alterado. Em câncer de pulmão não pequenas células e câncer colorretal a superexpressão do miR-451 também foi associado com a diminuição do número de colônias celulares.^{65, 103}. Além disso, a inibição do miR-451 levou a um aumento das colônias em linhagens de carcinoma hepatocelular⁶².

Com a finalidade de encontrar possíveis genes alvos do miR-451 utilizamos uma abordagem *in silico* e identificamos os genes *PDK1* e *WDFY2*. Essa abordagem não identificou genes PI3K e AKT como alvos diretos do miR-451. No entanto, usando a rede de associação funcional de proteínas denominada *STRING* identificamos uma interação entre *PDK1* e *WDFY2* com a via PI3K/AKT. A via PI3K/AKT é a mais frequentemente alterada no câncer, e desempenha importante papel no controle de diversas funções celulares como síntese de proteínas, ciclo celular, sobrevivência, apoptose e está amplamente envolvida na resistência a medicamentos⁷⁸. Em linhagens celulares de câncer de pulmão a superexpressão de miR-451 foi associada a redução da proteína pAKT⁶⁵.

A proteína quinase 1 dependente de 3-fosfoinosítido (PDK1), é codificada pelo gene PDK1 e está envolvida na promoção da tumorigênese, nos processos de proliferação, apoptose e invasão celular¹⁰⁴. A diminuição da sua expressão reduz o crescimento celular no câncer colorretal, e em células tumorais de fígado e está intimamente associada à atividade da via PI3K/AKT¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A indução da expressão de PDK1 já foi associada com o crescimento tumoral de carcinoma mamário, através da regulação da via PI3K/AKT pela fosforilação do resíduo 308 de AKT e ativação de PI3K α ¹⁰⁶. A expressão de *WDFY2* foi capaz de induzir a progressão tumoral, e sua inibição foi associada com o bloqueio da via PI3K/AKT em carcinoma de ovário⁸⁹. Já a superexpressão de *WDFY2* em linhagens celulares tumorais de próstata levou a diminuição da capacidade migratória e de formação de colônia suprimindo a via de AKT, demonstrando assim que seu papel é diferenciado e depende do contexto celular.

Demonstramos neste trabalho que após a transdução do miR-451 ocorreu uma regulação da proteína PDK1 em ambas linhagens. E na linhagem NTERA-2 a regulação de *WDFY2* em apenas um dos clones avaliados. Já na linhagem JEG-3 observamos a diminuição nos níveis protéicos de CAB39, PDK1, PI3K α e pAKT. A proteína de ligação ao cálcio 39 (CAB39) já havia sido demonstrada previamente como alvo do miR-451 em carcinoma hepatocelular e no glioma humano influenciando a via PI3K/AKT^{59, 99}. Esses resultados demonstram que pode haver uma interação e uma regulação indireta da via PI3K/AKT pelo miR-451, porém são necessários mais estudos para elucidar a sua função biológica e seu na rede regulatória.

Embora a maioria dos pacientes com tumores de células germinativas metastáticos sejam curados com terapias baseadas em cisplatina, o desenvolvimento de resistência à droga é uma limitação grave no tratamento. Alterações na expressão de microRNAs podem influenciar na sensibilidade dos tumores a terapias, e evidências apontam que os microRNAs podem representar uma nova abordagem para o tratamento do câncer¹⁰⁸. Um trabalho realizado com linhagem celular de câncer de pulmão, mostrou que a superexpressão do miR-451 foi capaz de sensibilizar as células a cisplatina *in vitro* e *in vivo* em camundongos indicando que a regulação do miR-451 poderia ser uma potencial estratégia terapêutica neste tipo tumoral⁶⁵.

No nosso trabalho a superexpressão do miR-451 não teve impacto na sensibilidade à cisplatina nas linhagens celulares NTERA-2 e JEG-3. Porém, ambas as linhagens se mostraram

muito sensíveis antes mesmo da transdução, o que dificultou a avaliação do impacto do miR-451 na resposta à cisplatina destas células. A extrema sensibilidade à quimioterapia nos TCGs parece ser multifatorial. Esses tumores são propensos a apoptose e alguns estudos têm associado esse fato a níveis elevados de Bax uma proteína pro-apoptótica e baixos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2, capacidade de reparo do DNA reduzida, além de terem altos níveis de TP53 selvagem¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Apesar das linhagens celulares de tumores de células germinativas NTERA-2 e JEG-3 fazerem parte do mesmo grupo tumoral, elas apresentam diferentes histologias, o que poderia justificar os divergentes resultados encontrados entre as linhagens^{84, 85}.

Nenhum dos trabalhos citados aqui reporta se o nível de superexpressão do miR-451 pode influenciar no seu papel funcional. Na literatura tem sido reportado que a expressão em níveis supra-fisiológicos pode não só levar a inibição de alvos que normalmente não seriam regulados, mas também sobrecarregar a maquinaria de interferência de RNA (dicer, RISC, ARG etc), de tal forma que outros microRNAs terão seu processamento e função afetadas¹¹².

Todos esses resultados em conjunto sugerem que a superexpressão do miR-451 pode ter importante papel na tumorigênese dos tumores de células germinativas possivelmente pela regulação indireta da viaPI3K/AKT. No entanto, mais ensaios necessitam ser realizados para compreendermos de forma mais detalhada o papel do miR-451.

7 Limitações do estudo

Podemos observar algumas limitações em nosso trabalho, entre elas, o fato de termos analisado o impacto da superexpressão do miR-451 em apenas duas linhagens celulares de TCG, diante de um grupo de tumores muito heterogêneo. Ainda, os ensaios funcionais foram realizados em apenas dois clones transduzidos com o miR-451 para cada linhagem tumoral. Utilizamos o nível de expressão do miR-451 de um *pool* de testículos normais como referência, mas não sabemos neste momento se está é a referência ideal. Adicionalmente, as linhagens celulares utilizadas no estudo apresentam alta sensibilidade à cisplatina, não sendo possível avaliar com clareza o efeito da superexpressão do miR-451.

Além disso, neste momento não avaliamos o sítio de inserção do microRNA no genoma das células, não sendo possível avaliar se esta integração levou a alguma alteração molecular importante na fisiologia celular.

8 CONCLUSÕES

- Foi possível realizar com eficiência a superexpressão *in vitro* do miR-451 nas linhagens tumorais NTERA-2 e JEG-3 com o sistema lentiviral;
- O restabelecimento da expressão do miR-451, próximo aos níveis de tecido normal, na linhagem NTERA-2 foi associado a uma maior proliferação e viabilidade celular, e a uma menor capacidade de migração e invasão. Na linhagem JEG-3 foi associado, a uma diminuição na viabilidade e proliferação celular, e menor capacidade de migração e formação de colônias, e maior capacidade de invasão;
- O restabelecimento da expressão do miR-451 na linhagem NTERA-2 foi relacionado à regulação das proteínas PDK1 e WDFY2, e na linhagem JEG-3 foi associado à diminuição nos níveis protéicos de CAB39, PDK1, PI3K α e pAKT, demonstrando assim que superexpressão do miR-451 possivelmente pode regular indiretamente a via PI3k/AKT;
- Não foi possível determinar o papel do miR-451 em relação a resposta a cisplatina nas linhagens celulares selecionadas, uma vez que ambas apresentam alta sensibilidade a esta droga;
- Os resultados apresentados demonstram evidências de que o restabelecimento da expressão do miR-451 pode ter papel importante no desenvolvimento dos tumores de células germinativas.

REFERÊNCIAS

1. JC. MMN. *Germ cell tumours in children and adolescents*. . **Paediatrics and Child Health** 2010; 20(109–116.).
2. Reuter VE. *Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors*. **Mod Pathol**. 2005;18 Suppl 2:S51-60.
3. Bahrami A, Ro JY, Ayala AG. *An overview of testicular germ cell tumors*. **Arch Pathol Lab Med**. 2007;131(8):1267-80.
4. Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Hu J, Olson T, Lauer S, et al. *Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors*. **Cancer Res**. 2001;61(19):7268-76.
5. Barlow LJ, Badalato GM, McKiernan JM. *Serum tumor markers in the evaluation of male germ cell tumors*. **Nat Rev Urol**. 2010;7(11):610-7.
6. Teilum G. *Classification of endodermal sinus tumour (mesoblastoma vitellinum) and so-called "embryonal carcinoma" of the ovary*. **Acta Pathol Microbiol Scand**. 1965;64(4):407-29.
7. Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, et al. *Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development*. **Mol Cell Endocrinol**. 2008;288(1-2):111-8.
8. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*. **Eur Urol**. 2016;70(1):93-105.
9. Masters JR, Koberle B. *Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours*. **Nat Rev Cancer**. 2003;3(7):517-25.
10. Funt SA, Feldman DR, Bosl GJ. *The Management of Advanced Germ Cell Tumors in 2016: The Memorial Sloan Kettering Approach*. **Oncology (Williston Park)**. 2016;30(7):653-64.
11. Murray MJ, Saini HK, Siegler CA, Hanning JE, Barker EM, van Dongen S, et al. *LIN28 Expression in malignant germ cell tumors downregulates let-7 and increases oncogene levels*. **Cancer Res**. 2013;73(15):4872-84.
12. *International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers*. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. **Journal of clinical oncology**. 1997;15(2):594-603.
13. Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. *Identification of microRNAs From the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors*. **Am J Clin Pathol**. 2011;135(1):119-25.

14. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, Sultana R, Labreche K, Dudakia D, et al. *Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours*. **Nat Commun**. 2015;6:5973.
15. Woldu SL, Amatruda JF, Bagrodia A. *Testicular germ cell tumor genomics*. **Curr Opin Urol**. 2017;27(1):41-7.
16. Feldman DR, Iyer G, Van Alstine L, Patil S, Al-Ahmadie H, Reuter VE, et al. *Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors*. **Clinical Cancer Research**. 2014;20(14):3712-20.
17. Carcano FM, Lengert AH, Vidal DO, Scapulatempo Neto C, Queiroz L, Marques H, et al. *Absence of microsatellite instability and BRAF (V600E) mutation in testicular germ cell tumors*. **Andrology**. 2016.
18. Grantham EC, Caldwell BT, Cost NG. *Current urologic care for testicular germ cell tumors in pediatric and adolescent patients*. **Urol Oncol**. 2016;34(2):65-75.
19. Ghazarian AA, Kelly SP, Altekruse SF, Rosenberg PS, McGlynn KA. *Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: Forecast through 2026*. **Cancer**. 2017;123(12):2320-8.
20. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediatrica S. [Internet] 2014 [cited 01/05];Available from: http://sobope.org.br/apex/f?p=106:13:12807919405639::NO::DFL_PAGE_ID:311
21. Cecchetto G. *Gonadal germ cell tumors in children and adolescents*. **J Indian Assoc Pediatr Surg**. 2014;19(4):189-94.
22. Lopes LF, Macedo CR, Aguiar Sdos S, Barreto JH, Martins GE, Sonaglio V, et al. *Lowered Cisplatin Dose and No Bleomycin in the Treatment of Pediatric Germ Cell Tumors: Results of the GCT-99 Protocol From the Brazilian Germ Cell Pediatric Oncology Cooperative Group*. **J Clin Oncol**. 2016;34(6):603-10.
23. Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. *Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide*. **N Engl J Med**. 1987;316(23):1435-40.
24. Bezan A, Gerger A, Pichler M. *MicroRNAs in testicular cancer: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy*. **Anticancer Res**. 2014;34(6):2709-13.
25. Olson TA, Murray MJ, Rodriguez-Galindo C, Nicholson JC, Billmire DF, Krailo MD, et al. *Pediatric and Adolescent Extracranial Germ Cell Tumors: The Road to Collaboration*. **J Clin Oncol**. 2015;33(27):3018-28.
26. Murray MJ, Nicholson JC, Coleman N. *Biology of childhood germ cell tumours, focussing on the significance of microRNAs*. **Andrology**. 2015;3(1):129-39.
27. Bokemeyer C, Kohrmann O, Tischler J, Weissbach L, Rath U, Haupt A, et al. *A randomized trial of cisplatin, etoposide and bleomycin (PEB) versus carboplatin, etoposide and bleomycin (CEB) for patients with 'good-risk' metastatic non-seminomatous germ cell tumors*. **Ann Oncol**. 1996;7(10):1015-21.

28. Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. *Epigenetics and cancer treatment*. **Eur J Pharmacol**. 2009;625(1-3):131-42.
29. Beyer J, Albers P, Altena R, Aparicio J, Bokemeyer C, Busch J, et al. *Maintaining success, reducing treatment burden, focusing on survivorship: highlights from the third European consensus conference on diagnosis and treatment of germ-cell cancer*. **Ann Oncol**. 2013;24(4):878-88.
30. Martinelli CM, Lengert AV, Carcano FM, Silva EC, Brait M, Lopes LF, et al. *MGMT and CALCA promoter methylation are associated with poor prognosis in testicular germ cell tumor patients*. **Oncotarget**. 2016.
31. Group IGCCC. *International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers*. **J Clin Oncol**. 1997;15(2):594-603.
32. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
33. Baylin SB, Jones PA. *Epigenetic Determinants of Cancer*. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2016;8(9).
34. Gao Y, Teschendorff AE. *Epigenetic and genetic deregulation in cancer target distinct signaling pathway domains*. **Nucleic Acids Res**. 2017;45(2):583-96.
35. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. *Role of microRNAs in translation regulation and cancer*. **World J Biol Chem**. 2017;8(1):45-56.
36. Hammond SM. *An overview of microRNAs*. **Adv Drug Deliv Rev**. 2015;87:3-14.
37. Lee RC, Ambros V. *An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans**. **Science**. 2001;294(5543):862-4.
38. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. *Regulatory mechanisms of microRNA expression*. **Journal of Translational Medicine**. 2016;14(1):143.
39. Graves P, Zeng Y. *Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view*. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. 2012;10(5):239-45.
40. Ha M, Kim VN. *Regulation of microRNA biogenesis*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2014;15(8):509-24.
41. Yi R, Fuchs E. *MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells*. **J Cell Sci**. 2011;124(Pt 11):1775-83.
42. Al-Ali BM, Ress AL, Gerger A, Pichler M. *MicroRNAs in renal cell carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy*. **Anticancer Res**. 2012;32(9):3727-32.
43. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, et al. *MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling*. **Cell**. 2013;154(2):311-24.

44. Luo LJ, Zhang LP, Duan CY, Wang B, He NN, Abulimiti P, et al. *The inhibition role of miR-22 in hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via targeting CD147.* **Cancer Cell Int.** 2017;17:17.
45. Ruf CG, Dinger D, Port M, Schmelz HU, Wagner W, Matthies C, et al. *Small RNAs in the peripheral blood discriminate metastasized from non-metastasized seminoma.* **Mol Cancer.** 2014;13:47.
46. Jacobsen C, Honecker F. *Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms.* **Andrology.** 2015;3(1):111-21.
47. Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, Flor I, Loning T, Bullerdiek J, et al. *MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours.* **Br J Cancer.** 2012;107(10):1754-60.
48. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors.* **Cell.** 2006;124(6):1169-81.
49. Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW, Sun Y, Chen C, et al. *High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours.* **J Pathol.** 2007;213(3):319-28.
50. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors.* **Adv Exp Med Biol.** 2007;604:17-46.
51. Spiekermann M, Belge G, Winter N, Ikogho R, Balks T, Bullerdiek J, et al. *MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker.* **Andrology.** 2015;3(1):78-84.
52. Henrique R, Jeronimo C. *Testicular Germ Cell Tumors Go Epigenetics: Will miR-371a-3p Replace Classical Serum Biomarkers?* **Eur Urol.** 2017;71(2):221-2.
53. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. *miR-21 as a key regulator of oncogenic processes.* **Biochem Soc Trans.** 2009;37(Pt 4):918-25.
54. Krichevsky AM, Gabriely G. *miR-21: a small multi-faceted RNA.* **J Cell Mol Med.** 2009;13(1):39-53.
55. Chung W-M, Chang W-C, Chen L, Chang Y-Y, Shyr C-R, Hung Y-C, et al. *MicroRNA-21 promotes the ovarian teratocarcinoma PA1 cell line by sustaining cancer stem/progenitor populations in vitro.* **Stem Cell Research & Therapy.** 2013;4(4):1-10.
56. Chen Y, Tsai YH, Fang Y, Tseng SH. *Micro-RNA-21 regulates the sensitivity to cisplatin in human neuroblastoma cells.* **J Pediatr Surg.** 2012;47(10):1797-805.
57. Liu L, Lian J, Zhang H, Tian H, Liang M, Yin M, et al. *MicroRNA-302a sensitizes testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin-induced cell death.* **J Cell Physiol.** 2013;228(12):2294-304.

58. Pan X, Wang R, Wang ZX. *The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy.* **Mol Cancer Ther.** 2013;12(7):1153-62.
59. Tian Y, Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, et al. *MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma.* **Int J Oncol.** 2012;40(4):1105-12.
60. Wang J, Zhao X, Shi J, Pan Y, Chen Q, Leng P, et al. *miR-451 suppresses bladder cancer cell migration and invasion via directly targeting c-Myc.* **Oncol Rep.** 2016;36(4):2049-58.
61. Huang JY, Zhang K, Chen DQ, Chen J, Feng B, Song H, et al. *MicroRNA-451: epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma.* **Oncotarget.** 2015;6(21):18613-30.
62. Li HP, Zeng XC, Zhang B, Long JT, Zhou B, Tan GS, et al. *miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK-beta.* **Carcinogenesis.** 2013;34(11):2443-51.
63. Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, et al. *Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment.* **Int J Surg Oncol.** 2012;2012:862879.
64. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytsky Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, et al. *Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin.* **Mol Cancer Ther.** 2008;7(7):2152-9.
65. Bian HB, Pan X, Yang JS, Wang ZX, De W. *Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549).* **J Exp Clin Cancer Res.** 2011;30:20.
66. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, et al. *Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas.* **Clin Cancer Res.** 2010;16(4):1129-39.
67. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer.* **N Engl J Med.** 2004;350(19):1945-52.
68. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. *Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck.* **N Engl J Med.** 2004;350(19):1937-44.
69. Jung Y, Lippard SJ. *Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage.* **Chem Rev.** 2007;107(5):1387-407.
70. Siddik ZH. *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.* **Oncogene.** 2003;22(47):7265-79.
71. Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, Gibcus JH, van den Berg A, Suurmeijer AJ, et al. *Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer.* **The Journal of clinical investigation.** 2010;120(10):3594.

72. Scagliotti GV, Novello S, Selvaggi G. *Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer*. **Ann Oncol**. 1999;10 Suppl 5:S83-6.
73. Oechsle K, Kollmannsberger C, Honecker F, Mayer F, Waller CF, Hartmann JT, et al. *Long-term survival after treatment with gemcitabine and oxaliplatin with and without paclitaxel plus secondary surgery in patients with cisplatin-refractory and/or multiply relapsed germ cell tumors*. **Eur Urol**. 2011;60(4):850-5.
74. Taylor-Weiner A, Zack T, O'Donnell E, Guerriero JL, Bernard B, Reddy A, et al. *Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours*. **Nature**. 2016;540(7631):114-8.
75. Houldsworth J, Xiao H, Murty VV, Chen W, Ray B, Reuter VE, et al. *Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation*. **Oncogene**. 1998;16(18):2345-9.
76. Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, et al. *Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer*. **Cancer Res**. 1993;53(15):3574-8.
77. Houldsworth J, Korkola JE, Bosl GJ, Chaganti R. *Biology and genetics of adult male germ cell tumors*. **Journal of clinical oncology**. 2006;24(35):5512-8.
78. Lien EC, Dibble CC, Toker A. *PI3K signaling in cancer: beyond AKT*. **Curr Opin Cell Biol**. 2017;45:62-71.
79. Koster R, van Vugt MA, Timmer-Bosscha H, Gietema JA, de Jong S. *Unravelling mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular cancer*. **Expert Rev Mol Med**. 2013;15:e12.
80. Juliachs M, Munoz C, Moutinho CA, Vidal A, Condom E, Esteller M, et al. *The PDGFRbeta-AKT pathway contributes to CDDP-acquired resistance in testicular germ cell tumors*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(3):658-67.
81. Di Vizio D, Cito L, Boccia A, Chieffi P, Insabato L, Pettinato G, et al. *Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors*. **Oncogene**. 2005;24(11):1882-94.
82. Lopes LF, Macedo CR, Pontes EM, Dos Santos Aguiar S, Mastellaro MJ, Melaragno R, et al. *Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91*. **J Clin Oncol**. 2009;27(8):1297-303.
83. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IA, Drexler HG. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines*. **ALTEX**. 2005;22(2):103-9.
84. Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, et al. *Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro*. **Lab Invest**. 1984;50(2):147-62.
85. Kohler PO, Bridson WE. *Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma*. **J Clin Endocrinol Metab**. 1971;32(5):683-7.
86. 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.

87. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. *miRWalk – Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes*. **Journal of Biomedical Informatics**. 2011;44(5):839-47.
88. Carcano FM, Vidal DO, van Helvoort Lengert A, Neto CS, Queiroz L, Marques H, et al. *Hotspot TERT promoter mutations are rare events in testicular germ cell tumors*. **Tumour Biol**. 2016;37(4):4901-7.
89. Kannan K, Coarfa C, Rajapakshe K, Hawkins SM, Matzuk MM, Milosavljevic A, et al. *CDKN2D-WDFY2 is a cancer-specific fusion gene recurrent in high-grade serous ovarian carcinoma*. **PLoS Genet**. 2014;10(3):e1004216.
90. Gao Y, Moten A, Lin H-K. *Akt: a new activation mechanism*. **Cell Res**. 2014;24(7):785-6.
91. Elzinga-Tinke JE, Dohle GR, Looijenga LH. *Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for preinvasive diagnosis*. **Asian J Androl**. 2015;17(3):381-93.
92. McIver SC, Roman SD, Nixon B, Loveland KL, McLaughlin EA. *The rise of testicular germ cell tumours: the search for causes, risk factors and novel therapeutic targets*. **F1000Res**. 2013;2:55.
93. Perge P, Nagy Z, Igaz I, Igaz P. *Suggested roles for microRNA in tumors*. **Biomol Concepts**. 2015;6(2):149-55.
94. Macfarlane LA, Murphy PR. *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. **Curr Genomics**. 2010;11(7):537-61.
95. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. *MicroRNAs in cancer*. **Annu Rev Pathol**. 2014;9:287-314.
96. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, et al. *microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells*. **Clin Cancer Res**. 2009;15(7):2281-90.
97. Wang R, Wang ZX, Yang JS, Pan X, De W, Chen LB. *MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14)*. **Oncogene**. 2011;30(23):2644-58.
98. Su Z, Zhao J, Rong Z, Geng W, Wang Z. *MIR-451, a potential prognostic biomarker and tumor suppressor for gastric cancer*. **Int J Clin Exp Pathol**. 2015;8(8):9154-60.
99. Guo R, Gu J, Zhang Z, Wang Y, Gu C. *MIR-451 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Pancreatic Cancer through Targeting CAB39*. **Biomed Res Int**. 2017;2017:2381482.
100. Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. *Recent advances in lentiviral vector development and applications*. **Mol Ther**. 2010;18(3):477-90.
101. Connolly JB. *Lentiviruses in gene therapy clinical research*. **Gene Ther**. 2002;9(24):1730-4.

102. Liu N, Jiang N, Guo R, Jiang W, He QM, Xu YF, et al. *MIR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in nasopharyngeal carcinoma.* **Mol Cancer.** 2013;12(1):123.
103. Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, et al. *MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells.* **Stem Cells.** 2011;29(11):1661-71.
104. Raimondi C, Falasca M. *Targeting PDK1 in cancer.* **Curr Med Chem.** 2011;18(18):2763-9.
105. Xu Z, Liao B, Zhang R, Yao J, Shi R, Wang L. *Expression of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in colorectal cancer as a potential therapeutic target.* **Med Oncol.** 2015;32(7):198.
106. Maurer M, Su T, Saal LH, Koujak S, Hopkins BD, Barkley CR, et al. *3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 potentiates upstream lesions on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast carcinoma.* **Cancer Res.** 2009;69(15):6299-306.
107. Maemets-Allas K, Belitskin D, Jaks V. *The inhibition of Akt-Pdpk1 interaction efficiently suppresses the growth of murine primary liver tumor cells.* **Biochem Biophys Res Commun.** 2016;474(1):118-25.
108. Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, Ceder Y. *microRNAs as cancer therapeutics: A step closer to clinical application.* **Cancer Lett.** 2017.
109. Romano FJ, Rossetti S, Conteduca V, Schepisi G, Cavaliere C, Di Franco R, et al. *Role of DNA repair machinery and p53 in the testicular germ cell cancer: a review.* **Oncotarget.** 2016;7(51):85641-9.
110. Gutekunst M, Oren M, Weilbacher A, Dengler MA, Markwardt C, Thomale J, et al. *p53 hypersensitivity is the predominant mechanism of the unique responsiveness of testicular germ cell tumor (TGCT) cells to cisplatin.* **PLoS One.** 2011;6(4):e19198.
111. Duale N, Lindeman B, Komada M, Olsen AK, Andreassen A, Soderlund EJ, et al. *Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles.* **Mol Cancer.** 2007;6:53.
112. Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. *Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs.* **Nat Biotechnol.** 2009;27(6):549-55.

ANEXO



Comitê de Ética em Pesquisa Parecer *Ad Referendum*

Para: Aline Oliveira da Rocha

De: Thiago Buosi Silva
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 03/06/2015

Projeto de pesquisa: **947/2015**

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 estudo de caso intitulado “**Avaliação do papel do miR-451 em linhagens celulares de tumores de células germinativas e seu impacto na resposta à cisplatina.**”, o qual foi cadastrado sob o número **947/2015**.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por utilizar linhagens celulares comerciais de células germinativas e não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de apreciação/aprovação do CEP.

Atenciosamente,


Thiago Buosi Silva
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

 15/06/15