

Juliana Inês Pinto dos Santos

**BIOMARCADORES MOLECULARES NO CANCRO DA
PRÓSTATA HORMONO-RESISTENTE: património genético e
perfil de expressão de microRNAs circulantes**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Oncologia- Especialização em Oncologia
Molecular, submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do
Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de
Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor Associado com Agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador – Mestre Ana Luísa Pereira
Teixeira

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

BIOMARCADORES MOLECULARES NO CANCRO DA PRÓSTATA HORMONO-RESISTENTE:
património genético e perfil de expressão de microRNAs circulantes

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre, em Oncologia- especialização em Oncologia
Molecular, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do
Porto

AUTOR:

Juliana Inês Pinto dos Santos

DATA:

Setembro de 2013

EDITOR: Juliana Inês Pinto dos Santos

MORADA: Rua da Senhora da Luz, nº105

LOCALIDADE: Ferreira

CÓDIGO POSTAL: 4590-816 Paços de Ferreira

CORREIO ELECTRÓNICO: inesantos.mo@gmail.com

1ª EDIÇÃO: Setembro de 2013

Agradecimentos

Ao finalizar esta etapa do meu percurso académico quero expressar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

Desta forma, gostaria de agradecer à Comissão de Coordenação do Mestrado em Oncologia, (Professor Doutor Carlos Lopes e Professora Doutora Berta Silva), pela oportunidade de ingressar neste mestrado, permitindo enriquecer os meus conhecimentos na área da oncologia.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador, por me ter recebido no seu grupo de investigação, Grupo de Oncologia Molecular, oferecendo-me a oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a compreensão, a força e as palavras sábias em momentos determinantes deste percurso.

À Dra. Ana Luísa Teixeira, pela partilha de todo o conhecimento, pelo constante apoio e dedicação na realização deste trabalho. Agradeço toda a paciência e amizade.

À Dra. Francisca Dias, por todo o apoio, ajuda e dedicação, que contribuíram para o êxito deste trabalho.

A todos os investigadores do Grupo de Oncologia Molecular, que tornaram este ano de trabalho mais alegre e motivador, por me fazerem sentir integrada nesta fantástica equipa. À Dra. Joana Assis, à Dra. Mónica Gomes e ao Dr. Augusto Nogueira, pela partilha diária de conhecimento, por toda a ajuda, todo o apoio e toda a compreensão que demonstraram ao longo deste ano.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Às minhas amigas de licenciatura, que “ficaram” em Coimbra, obrigado por todos os momentos que lá passamos, por todos os passeios e todas as brincadeiras.

À Helena, por ter sempre uma palavra a dizer, por me fazer ver o outro lado da situação. Agradeço toda a forte amizade e companheirismo, que desenvolvemos ao longo destes dez anos. OBRIGADA!

À minha família, por me ter sempre apoiado durante todo o meu percurso, por acreditar sempre em mim. À minha madrinha e avó, obrigada.

Ao meu afilhado por fazer com que a minha vida seja tão alegre, por me fazer rir todos os dias. Ao João Pedro, por ser o meu irmãozinho mais novo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por toda a dedicação, por todo o esforço que fizeram para que a minha formação académica fosse possível, quero deixar o meu especial agradecimento.

À minha irmã, por acreditar sempre que sou capaz.

A todos os que fazem com que a minha vida seja tão perfeita, obrigada.

A

AR	Recetor de Androgénios
AREs	Elementos de Resposta a Androgénios
aLHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
AGO2	<i>Argonaute 2</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>

B

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BTA	<i>Bladder tumor antigen</i>
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6</i>

C

CaP	Cancro da Próstata
CaPHR	Cancro da Próstata Hormono-resistente
CCR	Carcinoma de Células Renais
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CA 125	<i>Cancer antigen 125</i>
CLL	Leucemia Linfocítica Crónica
cDNA	DNA complementar
CDC42	<i>Cell division control protein 42</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>

D

DHT	Dihidrotestosterona
DGCR8	<i>Digeorge syndrome critical region gene 8</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico

E

EMT	<i>Epithelial- mesenchimal Transition</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>

FFSCN1 *Fascin homolog 1*FOLR1 *Folate receptor 1***G**GEMIN3 *Gem-associated protein 3*GEMIN4 *Gem-associated protein 4***H**

HBP Hiperplasia Benigna da Próstata

HR Hormono-resistente

HER2 *Human epidermal growth factor receptor 2*HoxD10 *Homeobox D10***L**

LHRH Hormona libertadora da hormona luteinizante

M

MiRNAs microRNAs

miR microRNAs

mRNA RNA mensageiro

MYO6 *Myosin VI*mTOR *Mechanistic target of rapamycin*mL *Mililitros***N**NMP22 *Nuclear matrix protein no.22*

ng/ml Nanogramas por mililitro

NE *Diferenciação neurondócrina***P**PSA *Prostate specific antigen*PCA3 *Prostate Cancer Gene 3*

pB Pares de Bases

PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de Hidrogénio
P	Probabilidade
PAK1	<i>PAK-kinase 1</i>
PDGF-D	<i>Plated derived growth factor D</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
R	
RNA	Ácido ribonucleico
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
Real-Time PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	Rotações por minuto
S	
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
Setd8	<i>SET domain containing (lysine methyltransferase) 8</i>
SKP2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SET	<i>Protein phosphatase 2A inhibitor</i>
T	
TNFSF10	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 10</i>
TRPS1	<i>Trichorhinophalangeal syndrome type I protein</i>
TBA	Terapia de Bloqueio Androgénico
TRBP	<i>Tar RNA-binding protein</i>
U	
µL	Microlitros
W	
WAVE3	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3</i>
X	
XPO5	Exportina 5

Z

ZEB1 *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*

ZEB2 *Zinc finger E-box-binding homeobox 2*

Resumo	XIX
Abstract	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1. O Cancro.....	3
1.2. Cancro da Próstata	5
1.2.1. O papel dos androgénios no cancro da próstata e no desenvolvimento de hormono-resistência.....	9
1.3. Biomarcadores moleculares.....	11
1.4. microRNAs	12
1.4.1. Desregulação da expressão de microRNAs	15
1.5. Polimorfismos genéticos funcionais no GEMIN4.....	20
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Material e Métodos	25
3.1. Análise do perfil de expressão de miRNAs em linhas celulares de cancro da próstata	27
3.2. Análise do perfil de expressão de miRNAs em amostras biológicas de doentes com cancro da próstata.....	29
3.2.1. População	29
3.3. Análise do polimorfismo <i>GEMIN4</i> T/C (rs7813).....	30
3.3.1. Extração do DNA genómico.....	30
3.4. Análise estatística	31
4. Resultados	33
4.1. Estudo do perfil de expressão de microRNAs em linhas celulares e em doentes com cancro da próstata.....	35
4.2. Influência da expressão do microRNA-7-2 e do microRNA-221 na resposta à terapia de bloqueio androgénico	39

4.3. Influência da expressão do microRNA-7-2 e do microRNA-221 na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata.....	42
4.4. Influência do polimorfismo <i>GEMIN4 T/C</i> na resposta à terapia de bloqueio androgénico.....	45
4.5. Influência do polimorfismo <i>GEMIN4 T/C</i> na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata.....	46
5. Discussão.....	47
5.1. Estudo do perfil de expressão de microRNAs em linhas celulares e em doentes com cancro da próstata.....	51
5.2. Influência dos níveis de expressão do microRNA-7-2 na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata	53
5.3. Influência dos níveis de expressão do microRNA-221 na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata	54
5.4. Influência do polimorfismo <i>GEMIN4T/C</i> na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata....	56
6. Conclusão e Perspetivas futuras	57
7. Referências Bibliográficas	61
8. Anexos.....	71
Anexo I.....	73
Anexo II.....	75

- Figura 1.** Representação esquemática do processo de carcinogénese.
- Figura 2.** Taxas de incidência de CaP por 100 000 habitantes (Globocan 2008, IARC).
- Figura 3.** *Score* de Gleason para a classificação do grau histológico de CaP.
- Figura 4.** Ativação da via de sinalização mediada pelos androgénios
- Figura 5.** Mecanismos de desenvolvimento de resistência à TBA.
- Figura 6.** Biogénese de miRNAs e mecanismo de regulação do mRNA.
- Figura 7.** Exemplos de miRNAs reguladores dos processos celulares.
- Figura 8.** Linha celular LnCaP.
- Figura 9.** Linha celular PC3.
- Figura 10.** Curva de amplificação da expressão relativa dos microRNAs.
- Figura 11.** Estudo comparativo da expressão relativa normalizada dos miRNAs selecionados nas duas linhas celulares LnCaP (hormono-dependente) e PC3 (hormono-resistente).
- Figura 12.** Expressão relativa normalizada dos miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 nas linhas celulares LnCaP e PC3.
- Figura 13.** Expressão relativa normalizada dos miR-145, miR-199b e miR-200b nas linhas celulares LnCaP e PC3.
- Figura 14.** Expressão relativa normalizada em circulação dos miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 em doentes com diagnóstico de CaP, atendendo ao tempo até à aquisição de HR.

- Figura 15.** Influência dos níveis de expressão dos miR-7-2 e miR-221 no tempo até aquisição de HR: estratificação segundo o Grau de Gleason.
- Figura 16.** Influência dos níveis de expressão dos miR-7-2 e miR-221 no tempo até aquisição de HR: estratificação segundo o valor de PSA.
- Figura 17.** Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*, estratificadas pelo Grau de Gleason, e teste *Log Rank* após TBA em doentes com CaP: influência da expressão dos miR-7-2 e miR-221.
- Figura 18.** Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*, estratificadas pelo valor de PSA, e teste *Log Rank* após TBA em doentes com CaP: influência da expressão dos miR-7-2 e miR-221.
- Figura 19.** Influência do polimorfismo *GEMIN4 T/C* (rs7813) no tempo até aquisição de HR: estratificação segundo o Grau de Gleason e o valor de PSA.
- Figura 20.** Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste *Log Rank* para o polimorfismo *GEMIN4 T/C* (rs7813): estratificação segundo o Grau de Gleason e o valor de PSA.

RESUMO

As opções terapêuticas atualmente existentes para o cancro da próstata hormono-resistente (CaPHR) são bastante limitadas. Indivíduos com tumores prostáticos de estadió mais avançado são habitualmente submetidos a terapia de bloqueio androgénico (TBA), permitindo retardar o crescimento tumoral. Contudo, apesar de inicialmente existir uma resposta positiva a este tratamento, a maioria dos doentes acaba por desenvolver resistência e a doença evolui para uma forma letal de cancro da próstata (CaP), o CaPHR. Este fenótipo tumoral é bastante agressivo e está associado a elevadas taxas de mortalidade e de morbilidade.

Os microRNAs (miRNAs) têm sido identificados como potenciais biomarcadores dada a sua especificidade de expressão e estabilidade. Estas moléculas são importantes reguladores da expressão genética por possuírem a habilidade de controlar/regular a expressão de oncogenes e/ou genes supressores tumorais, entre outros, encontrando-se assim associadas ao desenvolvimento neoplásico. Variação da expressão destes miRNAs por modulação pelo património genético individual é possível ocorrer, em consequência da ocorrência de polimorfismos genéticos nos genes codificantes de elementos da cascata de biogénese dos miRNAs.

Observamos que os miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 se encontravam com uma expressão aumentada na linha celular PC3 em comparação com a linha celular LnCaP. Estes mesmos miRNAs foram pesquisados em amostras em circulação de indivíduos com CaP, encontrando-se os miR-7-2 e miR-221 aumentados nos indivíduos que desenvolviam hormono-resistência (HR) precoce (< 20 meses).

Observamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e elevada expressão do miR-7-2 desenvolvem HR precoce e possuem menor sobrevivência global comparativamente com os indivíduos com baixa expressão deste miRNA (11 vs. 51 meses, $P=0,004$ e 28 vs. 116 meses, $P=0,001$, respetivamente). Foi igualmente observado um menor tempo até aquisição de HR e uma menor sobrevivência global em indivíduos com elevada expressão deste miRNA, e simultaneamente com valores de PSA ≥ 20 ng/ml, em comparação com os indivíduos com baixa expressão do miR-7-2 (24 vs. 68 meses, $P=0,022$ e 43 vs. 125 meses, $P=0,004$, respetivamente).

Para o miR-221, verificamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e com elevados níveis em circulação deste miRNA desenvolvem HR

precocemente em comparação com os indivíduos com baixos níveis de expressão do miR-221 (10 vs. 46 meses, $P=0,012$).

Foi também analisada a influência do polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) no desenvolvimento de HR e na sobrevivência global destes indivíduos. Observamos que os indivíduos com genótipos TT/TC adquirem HR mais cedo relativamente aos indivíduos com genótipo CC (51 vs. 84 meses, $P=0,035$).

A definição de um perfil de expressão de miRNAs associado ao desenvolvimento de HR e à sobrevivência global poderá ser uma ferramenta útil para a previsão de fenótipos de HR e na monitorização da terapia. A avaliação dos genótipos para o polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) pode auxiliar o estabelecimento de um perfil genético de eficiência da TBA. Uma associação entre o perfil de miRNAs circulantes e o genótipo individual para este polimorfismo poderá funcionar como possível biomarcador em CaPHR.

ABSTRACT

The therapeutic options that currently exist for hormone refractory prostate cancer (CRPC) are very limited. Patients with prostate tumors in more advanced stages are usually submitted to androgen deprivation therapy (ADT), allowing slow tumor growth. Although initially there is a positive response to this treatment, most patients eventually develop resistance and the disease evolves into a lethal form of prostate cancer, the CRPC. This is a very aggressive tumor phenotype and is associated with high mortality and morbidity.

MicroRNAs (miRNAs) have been identified as potential biomarkers due to their specific expression and stability. These molecules are important regulators of gene expression because they have the ability to control/regulate the expression of oncogenes and/or tumor suppressor genes, being associated with tumor development. Changes in expression of miRNAs, by modulating the individual genetic inheritance can occur, in consequence of the occurrence of genetic polymorphisms in genes encoding elements of the biogenesis pathway of miRNAs.

We observed that miR-7-2, miR-221, miR-222 and miR-1233 were found with increased expression in the cell line PC3 compared to the cell line LNCaP. These same miRNAs were investigated in circulation in samples from patients with PCa, where the miR-7-2 and miR-221 were increased in patients who developed early hormone resistance (HR) (<20 months).

We observed that patients with tumors of Gleason grade ≥ 8 and high expression of miR-7-2 developed early HR and have lower overall survival compared with patients with low expression of this miRNA (11 vs. 51 months, $P = 0.004$ and 28 vs. 116 months, $P = 0.001$, respectively). It was also observed a shorter time to acquisition of HR and a lower overall survival in patients with high expression of this miRNA, and simultaneously with PSA ≥ 20 ng/ml, compared to patients with low expression of miR-7-2 (24 vs. 68 months, $P = 0.022$ and 43 vs. 125 months, $P = 0.004$, respectively).

For miR-221, we found that patients with tumors of Gleason score ≥ 8 and high circulating levels of this miRNA developed early HR compared to patients with low expression levels of miR-221 (10 vs. 46 months, $P = 0.012$).

We also analyzed the influence of *GEMIN4* T/C (rs7813) polymorphism in the development of HR and overall survival of patients. We observed that individuals with genotypes TT/TC acquire early HR compared to patients with CC genotype (51 vs. 84 months, $P = 0.035$).

The definition of a expression miRNAs profile associated with the development of HR and overall survival, can be a useful tool for predicting HR phenotypes and monitoring the therapy. The assessment of the genotype for the *GEMIN4* T/C (rs7813) polymorphism can help the establishment of a genetic profile of TBA efficiency. An association between the circulating miRNAs profile and individual genotype for this polymorphism can help as potential biomarker in CRPC.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Cancro

Ao longo dos anos, o cancro tem-se revelado um crescente problema de saúde pública em todo o mundo, constituindo uma das principais causas de morte em vários países. Estima-se que no ano de 2012, na Europa, tenham sido diagnosticados 3,45 milhões de novos casos de cancro (excluindo cancro de pele não melanoma), dos quais 1,75 milhões resultaram em morte [1]. Nas mulheres, o cancro da mama é a neoplasia mais frequente, representando 29% das neoplasias diagnosticadas e sendo responsável por 14% das mortes por cancro, na Europa [1]. No caso dos homens, o cancro da próstata é o mais incidente, representando 28% dos tumores malignos diagnosticados e 10% das mortes por cancro [1].

O cancro pode ser caracterizado como uma doença genética, envolvendo alterações que se manifestam através de rearranjos cromossómicos como translocações, deleções e inserções, amplificações e mutações pontuais em determinados genes [2]. O processo de carcinogénese não consiste exclusivamente num evento, sendo um processo complexo, multifatorial e multifásico, culminando na aquisição de alterações celulares e envolvendo a desregulação de múltiplas vias responsáveis por processos fundamentais à célula, tais como a apoptose, proliferação, diferenciação e migração celulares [3]. A taxa de proliferação celular e as alterações genéticas associadas ao processo de carcinogénese dão origem a uma massa tumoral, com capacidade de invadir e metastizar para tecidos adjacentes ou à distância, apresentando vantagem competitiva em relação às células normais [4].

O processo de carcinogénese pode assim ser dividido em três etapas principais: a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 1) [4].

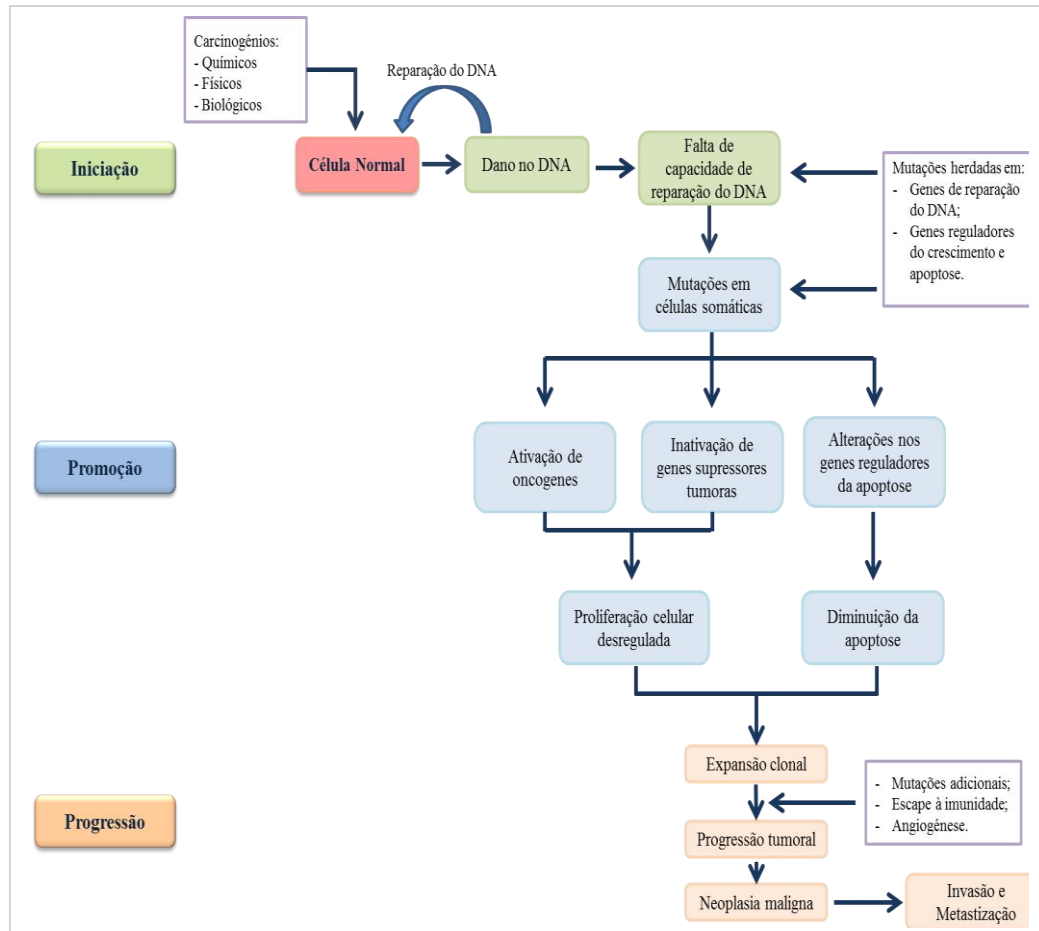


Figura 1. Representação esquemática do processo de carcinogénese (adaptado de Kumar *et al.*, 2005 [4])

A fase de iniciação caracteriza-se pela aquisição de danos genéticos, não letais, de uma célula normal, por ação de agentes carcinogénicos como agentes químicos, físicos e biológicos. Caso essa célula mutada não tenha capacidade de reparar o dano sofrido, poderá acumular sucessivas alterações genéticas que lhe irão conferir vantagem seletiva sobre as outras células. Assim, progredir-se-á para a fase de promoção onde a acumulação sequencial de alterações genéticas em genes responsáveis pelo controlo da proliferação celular, da morte celular programada e da manutenção da integridade do genoma, permitirão a expansão clonal da célula “iniciada” [4]. Por fim, a fase de progressão, que consiste na expressão do fenótipo maligno e na aquisição de características que conferem às células tumorais uma maior agressividade. Durante a fase de progressão, poder-se-ão ainda verificar outras alterações genéticas e epigenéticas, que levarão à ativação de proto-oncogenes, genes que codificam produtos reguladores do

crescimento celular normal e da diferenciação, e à inativação de genes supressores tumorais, que codificam proteínas que normalmente suprimem a proliferação celular. Frequentemente, após a fase de progressão, as células tumorais adquirem capacidade de invasão e metastização, podendo-se formar colónias celulares em órgãos distantes do tumor primário [4].

Como consequência do processo de carcinogénese, as células tumorais evidenciam alterações das funções biológicas comparativamente às células normais, como: autossuficiência em fatores de crescimento, capacidade de evasão à destruição pelo sistema imunológico, angiogénese, potencial replicativo ilimitado, evasão à apoptose, promoção da inflamação, instabilidade genómica e mutações, desregulação celular energética, capacidade de invasão tecidual, metastização e inflamação crónica [5]. Todas estas alterações na biologia do normal funcionamento da célula culminarão na ativação/ inativação de vias de sinalização celulares favoráveis para o desenvolvimento neoplásico.

1.2. Cancro da Próstata

Em Portugal, o cancro da próstata (CaP) é a neoplasia maligna mais frequente e a quarta causa de morte por cancro no homem [6]. Estima-se que em 2008 tenham sido diagnosticados 899 000 novos casos e tenham ocorrido 258 000 mortes em todo o mundo [6]. Até 2030 é esperado que o número de novos casos aumente até 1,7 milhões e que se verifiquem 499 000 mortes por esta doença [6]. Na Europa, no ano de 2012, estima-se terem sido diagnosticados 416 700 novos casos de CaP dos quais 92 200 resultaram em mortes [1].

A nível mundial verifica-se uma heterogeneidade na distribuição das taxas de incidência desta neoplasia, o que revela grandes diferenças inter-populacionais. As taxas de incidência mais elevadas observam-se na Austrália, Europa ocidental e América do norte, enquanto que as mais baixas foram registadas em populações Asiáticas (Figura 2) [6].

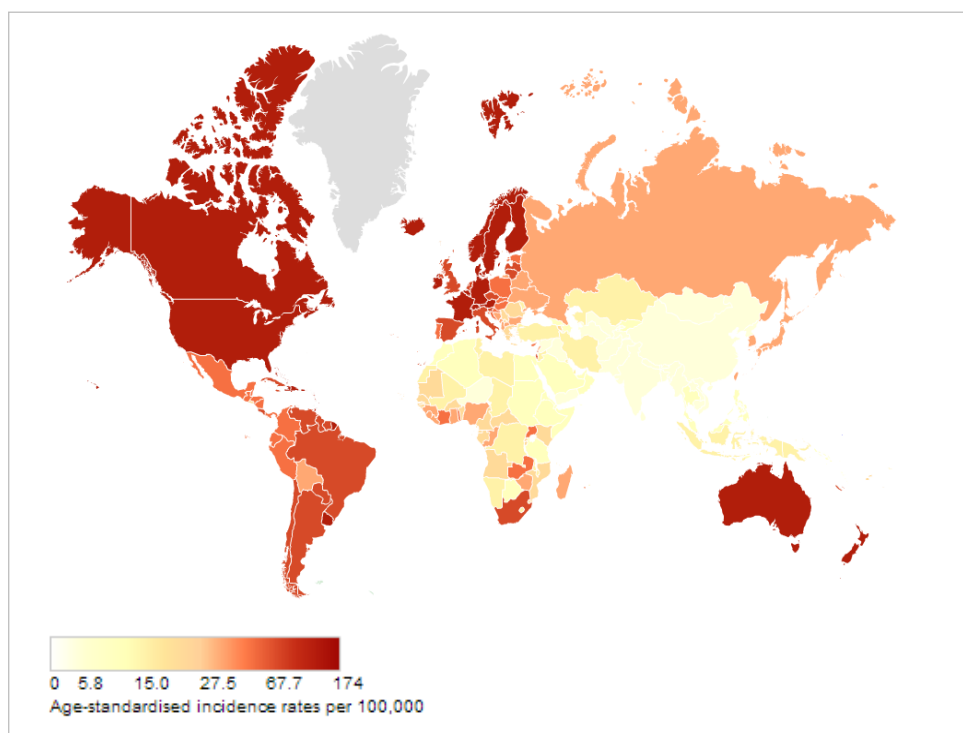


Figura 2. Taxas de incidência de CaP por 100 000 habitantes (Globocan 2008, IARC).

A próstata é um órgão retroperitoneal, estendendo-se desde a base da bexiga ao diafragma urogenital, como uma pirâmide invertida, e envolve a uretra prostática e os ductos ejaculatórios [7]. Na próstata adulta, o parênquima prostático pode ser dividido em quatro zonas biológica e anatomicamente distintas: a zona periférica, central, de transição e a região do estroma fibromuscular anterior. A maior parte das hiperplasias ocorrem na zona de transição enquanto que a maioria dos carcinomas originam-se na zona periférica, onde o mais comum é o adenocarcinoma [4].

Evidências dos últimos anos permitem observar que o desenvolvimento de CaP pode ser influenciado por vários fatores, como a idade, a etnia e a história familiar da doença [4,8]. Homens cujos familiares em primeiro grau tiveram a doença, apresentam um risco de desenvolverem CaP duas vezes superior, quando comparados com homens sem história familiar de doença [4,8]. Para além destes, os hábitos alimentares parecem também modular a carcinogénese de tumores prostáticos, em exemplo o aumento do consumo de gorduras saturadas aumenta o risco de desenvolvimento desta neoplasia [4,9,10]. Por outro lado, outros produtos alimentares podem prevenir o seu desenvolvimento, inibir ou diminuir a sua progressão sendo eles os licopenos, as vitaminas A e E, o selénio e os produtos de soja [4,11,12].

Apesar do contributo de várias áreas de investigação, permanecem por esclarecer quais os fatores de risco ambientais, genéticos e biológicos que expliquem a heterogeneidade verificada nas taxas de incidência de CaP a nível mundial, sugerindo que outros fatores, nomeadamente a variabilidade genética individual, possam também influenciar a suscetibilidade para o desenvolvimento desta neoplasia.

O PSA (*Prostate specific antigen*), desde a sua descoberta, tem vindo a ser usado como biomarcador auxiliar de diagnóstico e monitorização de CaP. Este é um produto do epitélio prostático libertado normalmente no sémen, com a função da sua liquefação, permitindo a libertação dos espermatozóides e a sua propagação [4]. Nos homens sem neoplasia da próstata, poucas quantidades de PSA são encontradas em circulação no soro, no entanto, a sua libertação ocorre também em situações de hiperplasia benigna da próstata (HBP), devendo este método de diagnóstico ser aliado a outros, como o toque retal e a ecografia prostática transretal [4,13,14]. O teste do PSA possui uma sensibilidade acima dos 90%, no entanto a sua especificidade é de apenas 25%, podendo levar a falsos positivos [15]. Recentemente, polimorfismos genéticos funcionais, perfis de expressão de miRNAs e a expressão de *prostate cancer gene 3* (PCA3) têm sido investigados como novos biomarcadores no CaP [16–21].

A agressividade de um tumor pode ser prevista pelas características que este apresenta, como a dimensão do tumor inicial e o grau histológico, dado pela classificação de Gleason, a extensão local e a disseminação à distância, dadas pelo sistema de estadiamento TNM [3,4,14].

A classificação de Gleason mede o grau de semelhança entre o tumor e a glândula prostática a partir da qual se desenvolveu o tumor. Na escala de Gleason são descritos cinco padrões distintos de crescimento que variam entre “bem diferenciado” a “anaplásico”. Os tumores com padrão 1 são muito diferenciados, com formação glandular discreta, enquanto que os tumores com padrão 5 são muito indiferenciados, com perda da arquitetura glandular. O score final de Gleason é a soma dos graus do padrão de crescimento mais comum e do segundo mais comum, variando entre 2 (1+1) e 10 (5+5) (Figura 3) [3,4].

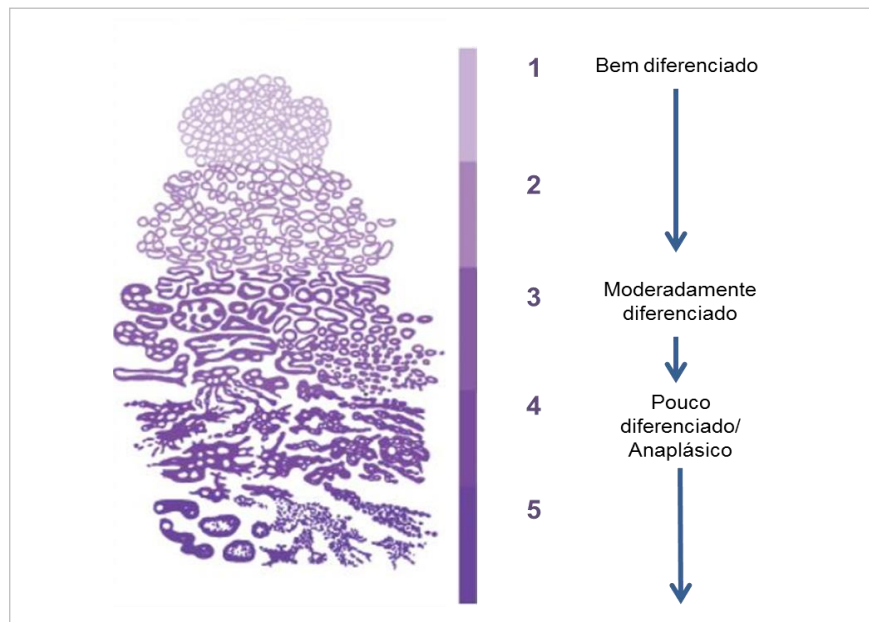


Figura 3. Score de Gleason para a classificação do grau histológico de CaP (adaptado de DeVita *et al.*, 2008 [3])

A par do diagnóstico histopatológico, existe o estadiamento clínico que é estabelecido aquando do diagnóstico e que constitui um dos passos mais importantes para a orientação da terapêutica. O sistema de estadiamento de uso mais comum é o sistema TNM, que consiste no agrupamento dos casos em categorias tendo por base a extensão da doença [3]. Assim, a componente T corresponde ao tamanho e extensão local do tumor (variando entre T0 e T4), a componente N à metastização ganglionar regional (classificada como NX, N0 ou N1) e a componente M à metastização à distância (classificada como M0, M1, m1a, b ou c) [3].

A decisão sobre qual a terapia a aplicar é baseada no grau histopatológico e estadio do tumor, idade e estado de saúde do doente. Indivíduos diagnosticados em estadios iniciais de desenvolvimento de CaP são habitualmente submetidos a cirurgia (prostatectomia radical) e/ou radioterapia, braquiterapia transperineal de baixa dose, com intenção curativa [13]. Indivíduos com tumores prostáticos em estadios mais avançados são geralmente submetidos a terapia de bloqueio androgénico (TBA), reduzindo assim o crescimento tumoral dependente do recetor de androgénios (AR) [14,22].

1.2.1. O papel dos androgénios no cancro da próstata e no desenvolvimento de hormono-resistência

A testosterona é o androgénio em circulação mais abundante no homem. A sua produção pode ocorrer nas células de Leydig ou na glândula suprarrenal, sendo bastante mais acentuada nas primeiras (90%) [14,23].

Quando a testosterona contacta com as células prostáticas, a grande maioria é convertida em dihidrotestosterona (DHT) por ação da enzima 5 α -reductase. A DHT apresenta uma maior afinidade pelo AR, dissociando-se deste mais lentamente. Após a ligação da DHT ao AR, este complexo é fosforilado, formam-se complexos de homodímeros de AR que se vão ligar a elementos de resposta a androgénios (AREs) na região promotora dos genes-alvo, envolvidos em importantes mecanismos de crescimento e sobrevivência celulares (Figura 4) [24,25]. Os androgénios estimulam a proliferação celular e inibem a apoptose, contribuindo para o desenvolvimento da carcinogénese prostática [25]. Deste modo, a TBA, que consiste na supressão da utilização de androgénios por parte das células prostáticas, pode controlar o desenvolvimento deste tipo de cancro.

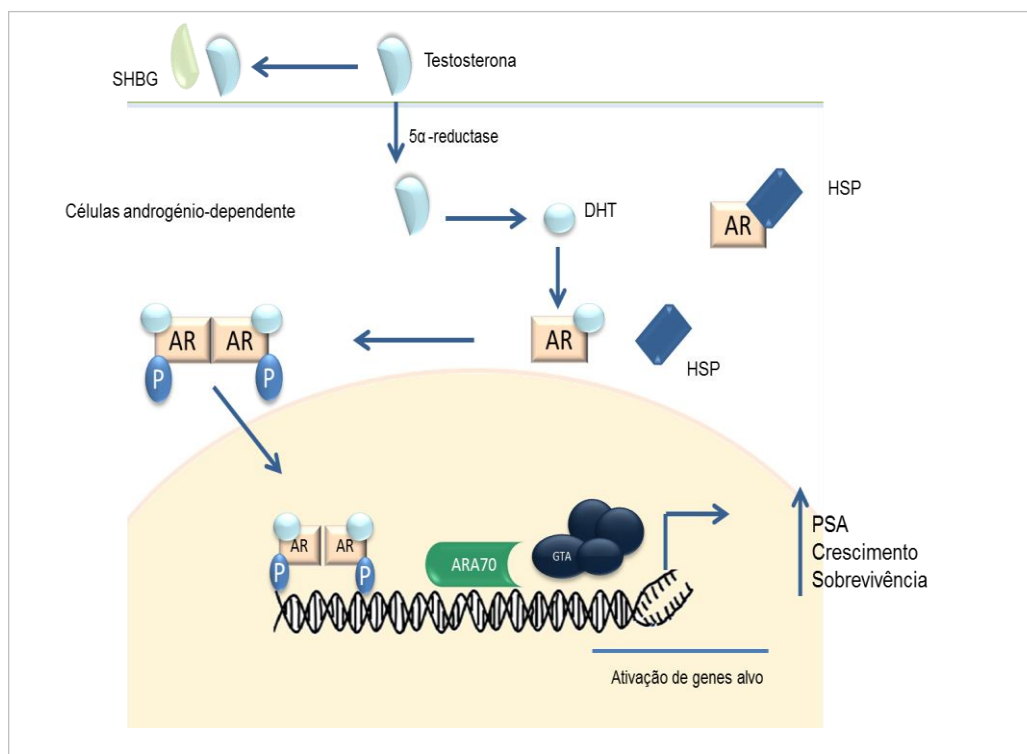


Figura 4. Ativação da via de sinalização mediada pelos androgénios (adaptado de Pienta *et al.*[24]).

A TBA pode ocorrer por castração cirúrgica, que envolve a remoção dos testículos com a finalidade de reduzir a biossíntese de testosterona, ou por castração química, utilizando fármacos que bloqueiam o AR ou reduzem os níveis de androgénios [13,22,26]. Atualmente, a castração química pode ser obtida através da utilização de estrogénios, de análogos da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH), de antagonistas da LHRH e de antiandrogénios [14].

Apesar de inicialmente a maior parte dos indivíduos responder à TBA, verificando-se uma regressão tumoral, a maioria acaba por desenvolver resistência a esse tratamento, desenvolvendo um tipo tumoral conhecido por cancro da próstata androgénio-independente ou hormono-resistente (CaPHR). Esta resistência caracteriza-se pelas células tumorais continuarem a crescer mesmo na ausência de androgénios e acontece, por norma, num intervalo de tempo de 18–24 meses após início da TBA [27]. No entanto, existe já evidência de que esse tempo de resistência pode variar de acordo com a idade dos doentes [28]. Um estudo recente desenvolvido por *Humphreys* e colaboradores em que indivíduos diagnosticados com CaP foram divididos em quatro grupos tendo em consideração a idade, demonstrou que o grupo de indivíduos jovens (< 55 anos) e o grupo de indivíduos com idade mais avançada (\geq 75 anos) apresentaram um menor tempo até aquisição de resistência à TBA quando comparados com os restantes indivíduos [28]. Perceber os mecanismos que levam ao desenvolvimento desta resistência aliado à definição de biomarcadores preditivos serão estratégias fundamentais no desenvolvimento de novas terapias mais eficientes e dirigidas a alvos moleculares.

Encontram-se já descritos vários potenciais modelos explicativos de desenvolvimento de CaPHR que procuram entender as vias alternativas que as células tumorais prostáticas usam para sobreviverem num meio ausente de androgénios [24–26,29]. Desta forma, poderá ocorrer uma hipersensibilidade do AR que se torna capaz de responder a ínfimas quantidades de androgénios presentes no meio, mesmo após TBA (via hipersensível), ocorrência de mutações no gene do AR e alteração da especificidade do recetor tornando possível a sua ativação por outras moléculas esteróides não androgénicas (via promíscua), a indução de vias *bypass* (ocorre uma sobre-regulação de proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2 [*B-cell lymphoma 2*], que supera a capacidade de apoptose induzida pela TBA) e a ativação de vias de proliferação alternativas (Figura 5) [26].

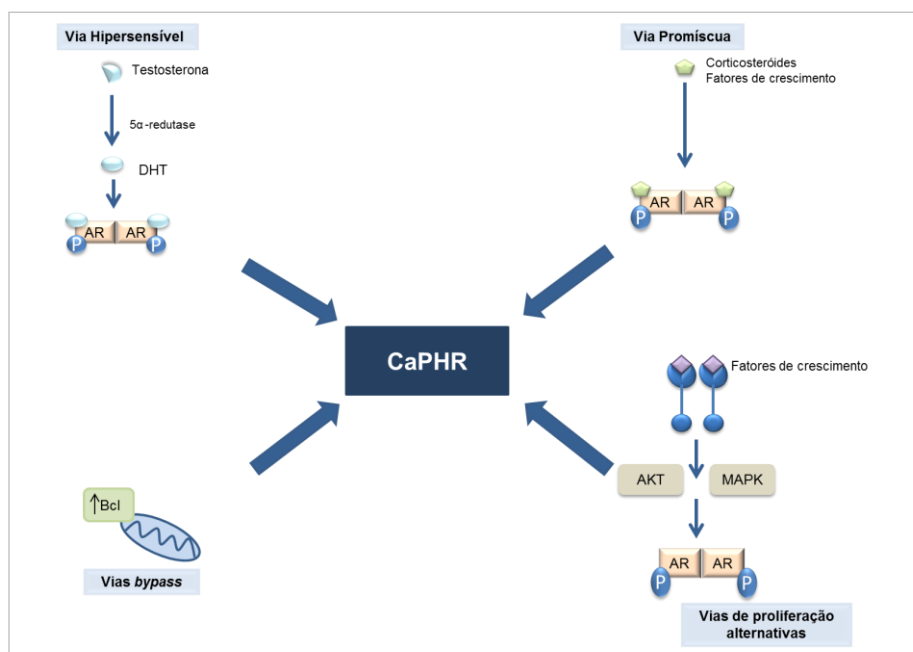


Figura 5. Mecanismos de desenvolvimento de resistência à TBA.

1.3. Biomarcadores moleculares

O diagnóstico de doença oncológica está atualmente a passar por uma mudança de paradigma, com a incorporação de biomarcadores moleculares como parte do painel de diagnóstico de rotina [30]. Os biomarcadores são indicadores físicos, funcionais ou bioquímicos de um processo fisiológico ou de doença caracterizados por alterações a nível molecular [31]. Os biomarcadores podem ser usados na determinação da suscetibilidade de desenvolvimento de uma doença, avaliação da sua progressão e do prognóstico, oferecendo a possibilidade de individualização de tratamentos [31–35].

Durante o desenvolvimento neoplásico ocorrem alterações moleculares que variam não apenas devido à origem do tumor mas também pelo grau de diferenciação e capacidade de invasão da célula tumoral [30]. Com base em modelos de estudo *in vivo* e *in vitro*, tem vindo a ser demonstrado que as alterações moleculares possuem um importante papel na progressão tumoral e na “sobrevivência” das células tumorais [36]. Estas alterações podem ocorrer ao nível do DNA, do RNA, das proteínas e dos miRNAs, fazendo destes potenciais biomarcadores [36].

Atualmente, existem eficientes biomarcadores tumorais utilizados na prática clínica. Alguns exemplos são o *CEA* (antigénio carcinoembrionário) para monitorização do cancro gástrico, colón e reto, o *CA 125* (*cancer antigen 125*) para monitorização do cancro do ovário, o *NMP22* (*Nuclear matrix protein no.22*), a *BTA* (*Bladder tumor antigen*) e fibrina para diagnóstico e monitorização do cancro da bexiga, o *HER2/NEU* (*Human epidermal growth factor receptor 2*) para monitorização, prognóstico e seleção da terapia adequada para doentes com cancro da mama, entre outros [15].

Recentemente, pequenas moléculas de RNA não codificante, denominados microRNAs (miRNAs), têm sido definidos como uma nova classe de biomarcadores com potencial aplicação clínica [34,37,38]. Estes miRNAs regulam a expressão genética por ligação ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, influenciando assim a sua possível tradução em proteína. Por exemplo, o miRNA-10 encontra-se em grandes quantidades no soro de doentes com cancro da mama metastático, quando comparado com doadores saudáveis, evidenciando assim a sua possibilidade de utilização como fator de prognóstico [39].

Mais ainda, variações no genoma humano (polimorfismos) têm sido apontadas como potenciais biomarcadores de susceptibilidade/preditivos de resposta à terapia ou de prognóstico, modelando todas as fases de desenvolvimento de cancro ou como marcadores de prognóstico [40-44].

A definição de biomarcadores tumorais de diagnóstico e de prognóstico são uma ferramenta útil, permitindo a intervenção em fases precoces de desenvolvimento da doença.

1.4. microRNAs

A biogénese dos miRNAs é um processo enzimático multifásico, que se inicia pela transcrição do seu gene pela enzima RNA polimerase II, no núcleo, resultando num longo transcrito de RNA primário, o pri-miRNA. Posteriormente, o pri-miRNA é clivado por uma endonuclease RNase III, a Droscha, juntamente com o seu cofator DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region gene 8*), resultando num precursor de miRNA, com 60-110 nucleótidos de comprimento, o pré-miRNA. Esta molécula é depois transportada do núcleo para o citoplasma pela Exportina 5 (*XPO5*). No citoplasma, o pré-miRNA é clivado por outra RNase, a Dicer, formando um duplex de miRNA com aproximadamente 22 pares de base

(pb) [45]. Uma das duas cadeias formadas é integrada no *RNA-induced silencing complex* (RISC), composto pelas proteínas TRBP (*Tar RNA-binding protein*), AGO2 (*Argonaute 2*), GEMIN 3 (*Gem-associated protein 3*) e GEMIN4 (*Gem-associated protein 4*) enquanto que a outra é normalmente degradada [46]. Este complexo formado liga a regiões 3'UTR do mRNA alvo, com base na complementaridade parcial miRNA-mRNA. Como consequência desta ligação, pode ocorrer uma inibição da tradução da molécula de mRNA ou uma redução da sua estabilidade, resultando na diminuição ou ausência da expressão do gene alvo [47]. Muitos mRNAs contêm múltiplos locais de ligação para os miRNAs, e cada miRNA pode regular múltiplos genes. Alterações na regulação do processamento dos miRNAs podem levar ao desenvolvimento de várias doenças, como o cancro (Figura 6) [48].

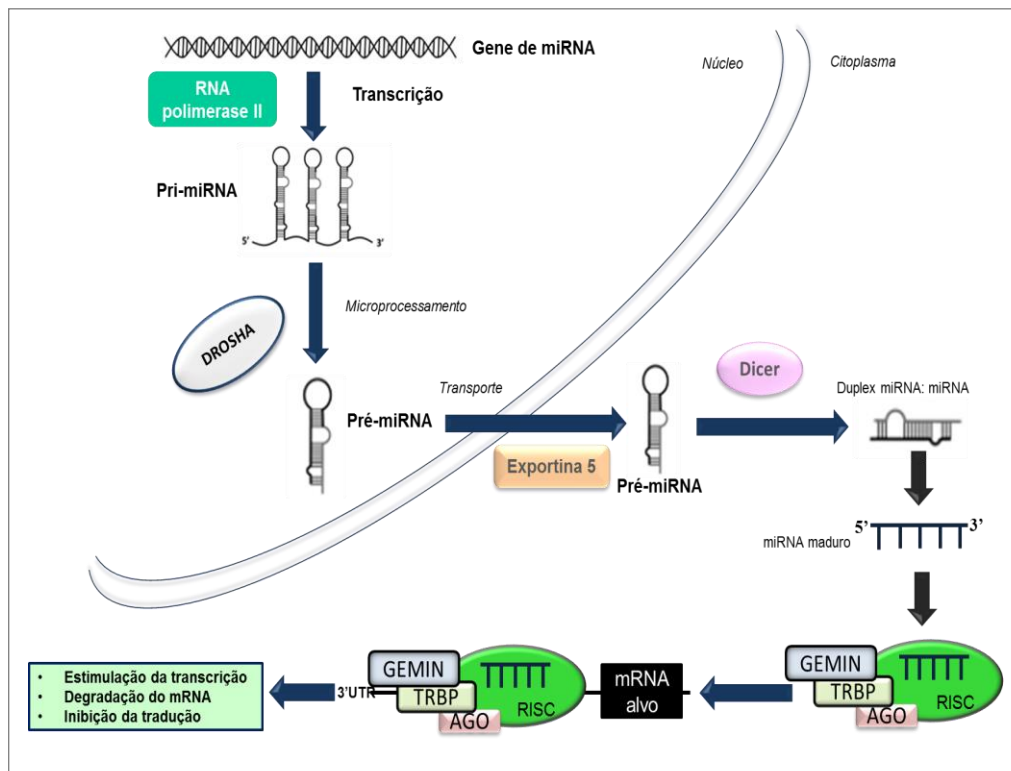


Figura 6. Biogénese de miRNAs e mecanismo de regulação do mRNA.

Depois da descoberta do papel como supressores tumorais dos miR-15a e miR-16-1 na leucemia linfocítica crónica (CLL) em 2002, uma vasta gama de miRNAs com função supressora e oncogénica têm sido identificados para muitas neoplasias humanas [49].

Os miRNAs possuem um importante papel na mediação de vias de sinalização relacionadas com o cancro, incluindo proliferação, apoptose, angiogénese e a via que leva à ocorrência de transição epitelial-mesénquimal (EMT) [50].

Durante a carcinogénese, e dependendo do modelo tumoral, os miRNAs podem atuar como oncogenes, chamados assim oncomiRs, caso regulem negativamente a expressão de genes supressores tumorais, ou então como miRNAs supressores tumorais, denominados anti-oncomiRs, se desregulam a expressão de genes que contribuem para o desenvolvimento tumoral. No entanto, existem miRNAs que dependendo do modelo tumoral podem ser considerados como oncomiRs ou anti-oncomiRs [51]. Por exemplo, o miR-29a encontra-se sobre-expresso em cancro da mama, promovendo a EMT e consequentemente a formação de metástases, possuindo assim o papel de oncomiR [51]. Por outro lado, em tumores cerebrais este miRNA está definido como anti-oncomiR [51].

Vários estudos têm demonstrado que durante o desenvolvimento de CaP ocorrem desregulações na expressão de miRNAs. Por exemplo, a expressão do miR-125b, modulada pela ativação da via do AR, encontra-se aumentada em células de CaP resistentes a androgénios [52]. Este aumento de expressão do miR-125b pode facilitar o desenvolvimento de hormono-resistência (HR), devido à sua capacidade de inibir moléculas de controlo do ciclo celular, como a proteína p53 [52].

Os miRNAs miR-21, miR-221 e miR-222 parecem também estar associados com o desenvolvimento de CaPHR. A sobre-expressão do miR-21 tem a habilidade de induzir o crescimento celular independentemente da presença de androgénios [53]. Em células de CaPHR observou-se uma sobre-expressão dos miRs-221/222 em relação a células de CaP sensíveis a androgénios [54,55]. *Walter* e colaboradores observaram um diferente padrão de expressão de miRNAs quando compararam o tecido tumoral com o epitélio normal adjacente, em CaP, sugerindo que é também possível a deteção de diferentes perfis de expressão de miRNAs entre tecidos tumorais e normais [56].

Os miRNAs possuem importantes vantagens que os tornam potenciais biomarcadores, como uma alta estabilidade nos fluidos corporais, pois são libertados pelas células via microvesículas ou exossomas, e o facto de possibilitarem um diagnóstico não invasivo [15,57]. Assim, o padrão de expressão dos miRNAs secretados pode ser reflexo de diferentes fases no

desenvolvimento carcinogénico, permitindo um diagnóstico precoce e a seleção de uma terapêutica adequada [39]. Devido a estas características, seria importante a definição de um perfil de expressão que pudesse ser útil como fator preditivo de HR.

1.4.1. Desregulação da expressão de microRNAs

Processos celulares envolvidos na regulação do ciclo celular, adesão celular, estabilidade cromossômica, reparação do DNA, apoptose, entre outros, encontram-se frequentemente desregulados na carcinogénese [5,58]. Tem vindo a ser demonstrado que o perfil de expressão de miRNAs se encontra alterado no cancro, podendo influenciar o seu desenvolvimento e/ou conduzir à sua progressão (Figura 7) [59–62]. Mais ainda, existem estudos que demonstram um diferente perfil de expressão de miRNAs quando se comparam tecidos normais vs. tecidos tumorais [63–65].

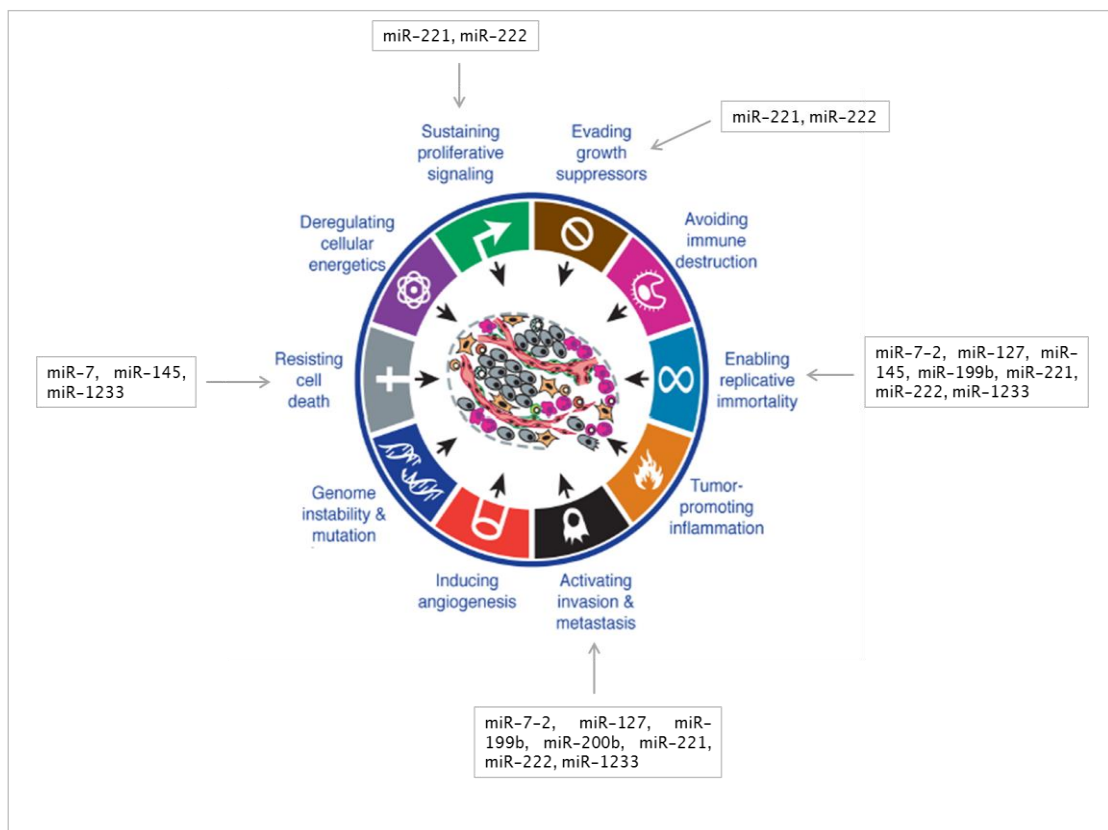


Figura 7. Exemplos de miRNAs reguladores dos processos celulares.

No desenvolvimento de CaP são vários os miRNAs cuja expressão se encontra alterada, como por exemplo os miR-221 e miR-222 frequentemente sobre-expressos. Contudo, outros como os miR-127, miR-145 e miR-200b encontram-se sub-expressos, estando a sua perda de função associada ao desenvolvimento tumoral [54,56,66-72]. Relativamente aos miR-7-2, miR-199b e miR-1233, ainda não existem evidências do papel que desempenham na carcinogénese prostática. No entanto, devido à função que desempenham noutros modelos tumorais, o seu estudo em CaP pode ser uma ferramenta útil para a compreensão da ocorrência de certos eventos moleculares inerentes ao desenvolvimento de tumores prostáticos [73-77].

Estudos desenvolvidos por *Reddy* e colaboradores demonstraram que o miR-7 tem a capacidade de inibir a expressão de AKT (*protein kinase B*) em linhas celulares de cancro da mama, por ter como alvo a região 3'UTR deste gene, podendo desta forma modular a motilidade, a sobrevivência, a evasão e a apoptose [78]. Cumulativamente, a transfecção de linhas celulares de cancro da mama MDA-231 com este miRNA provocou uma diminuição nos níveis de EGFR e PAK1 (*P21 Protein-Activated Kinase 1*) [78]. Em cancro do pulmão, existe evidência de que o miR-7 inibe significativamente o crescimento celular e diretamente a expressão do EGFR [79]. *Rai* e colaboradores mostraram também que este miRNA inibe a fosforilação do AKT, o que resulta na supressão da via EGFR-PI3K-AKT e conseqüentemente numa menor proliferação celular [79]. Contrariamente, um estudo de *Chou* e colegas evidencia que o miR-7, por ativação pela via mediada pelo recetor EGFR, promove a tumorigénese em linhas celulares de cancro do pulmão, parecendo não haver consenso sobre o papel deste miRNA em cancro do pulmão [75]. Segundo *Reddy* e colaboradores, a expressão endógena do miR-7 é positivamente regulada pelo Hoxd10 (*Homeodomain transcription factor D 10*), com função supressora tumoral, sendo que a perda desta expressão tem a capacidade de aumentar a habilidade de invasão do tumor [78]. Contudo, recentemente *Yu* e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, em linhas celulares de carcinoma de células renais (CCR) que contrariamente ao que se encontra descrito o miR-7 pode comportar-se como um oncomiR, potenciando a migração celular e a invasão celular, e diminuindo a apoptose [74]. Atualmente ainda não existem estudos sobre o papel deste miRNA no desenvolvimento de tumores prostáticos. Contudo, dada a relação deste miRNA com a via do EGFR e atendendo ao papel deste

recetor na progressão deste tipo de neoplasia, o miR-7 poderá também ter um papel chave no desenvolvimento de CaP e no mecanismo de resistência à TBA.

Outro dos miRNAs cuja expressão se encontra alterada no desenvolvimento de tumores prostáticos é o miR-127 [80]. A análise comparativa da expressão do miR-127 em tecidos normais vs. tecidos tumorais de próstata, bexiga e cólon revelou a sua perda de expressão durante a carcinogénese nestes modelos tumorais [81]. Resultados similares foram observados por *Tryndyak* e colaboradores, que verificaram uma sub-regulação deste miRNA no fígado de rato durante a hepatocarcinogénese [82]. Admite-se que o miR-127 tenha como alvo a proteína Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*), um proto-oncogene, tendo já sido observada uma relação inversa entre os níveis de expressão deste miRNA e de Bcl-6 [81-83]. Por outro lado, o miR-127 parece influenciar também o controlo do ciclo celular uma vez que poderá modular a expressão da proteína Setd8 (*SET domain-containing protein 8*), essencial para a replicação do DNA [83]. A ausência de expressão deste miRNA pode facilitar o processo neoplásico, promovendo a progressão do ciclo celular.

Em CaP são vários os estudos que demonstram uma sub-regulação do miR-145 [51,66,71,84-87]. *Ambis* e colaboradores verificaram uma redução na expressão do miR-145 (20%) quando comparados tecidos normais vs. tecidos tumorais [85]. Também em linhas celulares de CaP se verifica uma diminuição da sua expressão [87]. Em células de CaPHR, a transfeção com o precursor do miR-145 provocou uma redução da viabilidade celular, o que levou os investigadores a colocar a hipótese do seu papel na apoptose e na proliferação celular [87]. Também *Fuse* e colaboradores demonstraram que a indução de expressão do miR-145 causou uma supressão da proliferação celular, migração e invasão, por inibir o gene *FSCN1* (*Fascin homolog 1*). A sobre-expressão da proteína codificada por este gene pode contribuir para a proliferação celular, aumento da capacidade de invasão e inibição da apoptose, essenciais para a metastização tumoral [71]. *Zaman* e colaboradores definiram o TNFSF10 (*Tumor Necrosis Factor Superfamily 10*), um gene pro-apoptótico, como estando sobre-expresso na presença do miR-145 [87]. Devido à capacidade de supressão que este miRNA parece possuir, a sua perda em CaP pode provocar um aumento da proliferação celular e perda de apoptose, contribuindo assim para a possível progressão deste tipo de neoplasia.

Em CaP não existem estudos que definam o papel do miR-199b. No entanto, em meduloblastoma, carcinoma endometrial e coriocarcionoma

verificou-se uma sub-expressão deste miRNA, sugerindo o seu papel como anti-oncomiR [77,88,89]. *Chao* e colaboradores verificaram que a indução da expressão do miR-199b tem a capacidade de diminuir a expressão de uma vasta gama de genes como: SET (*Protein phosphatase 2A inhibitor*, um oncogene), CDH1 (*Cadherin 1*, gene que codifica a E-caderina), EGFR, FOLR1 (*Folate Receptor 1*), SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) e CDC42 (*Cell division control protein 42 homolog*). A diminuição da expressão do miR-199b encontra-se associada a um aumento dos níveis de mRNA de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), promovendo o crescimento, proliferação, motilidade e sobrevivência celulares [77,90]. Uma possível sub-expressão do miR-199b em CaP pode contribuir para a aquisição de fenótipos de CaP mais agressivos.

A transição EMT, processo fundamental no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento metastático, encontra-se também regulada por vários miRNAs destacando-se a família dos miR-200, nomeadamente o miR-200b [72,91-93]. Admite-se que o miR-200b possa reprimir a expressão de moléculas como o ZEB1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) e ZEB2 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 2*), os quais têm um importante papel na EMT [92,94]. Cumulativamente, as moléculas ZEB1 e ZEB2 podem diretamente ligar ao promotor do miR-200b, levando à repressão da sua expressão, podendo ocorrer assim uma interação dinâmica durante o processo de EMT [47,72,91]. Trabalhos desenvolvidos por *Kong* e colaboradores mostraram que a expressão de ZEB1, ZEB2 e Snail2 se encontrava aumentada em células PC3 transfetadas com o fator de crescimento PDGF-D (*Platelet-derived growth factor D*), verificando também uma perda da E-caderina e um ganho de vimentina e N-caderina (essenciais para o fenótipo mesenquimal) [72]. Paralelamente observou-se que o *knock-down* de ZEB1 aumenta significativamente os níveis de E-caderina, assim como a reintrodução dos níveis de expressão do miR-200b em linhas celulares tem a capacidade de aumentar a expressão de genes marcadores de fenótipo epitelial induzindo a diferenciação mesenquimal-epitelial [47]. Este miRNA apresenta também a capacidade de se ligar a outras proteínas como WAVE3 (*Wiskott-Aldrich 3*), importante na polimerização da actina e remodelação do citoesqueleto da célula [91].

Admite-se que outros dos miRNAs que podem modular o processo de progressão e metastização de tumores prostáticos sejam os miR-221 e miR-222, podendo a sua expressão ser induzida pela ativação da via de sinalização celular EGFR-RAS-RAF-MEK [2,95,96]. Estudos elaborados por *Galardi* e colaboradores

demonstraram que a proteína p27^{kip1}, um inibidor do ciclo celular, é um dos alvos destes dois miRNAs e que a sua ligação ao respetivo mRNA causa supressão da sua expressão, resultando na progressão do ciclo celular e conseqüentemente crescimento tumoral [84,95]. Os miR-221 e miR-222 encontram-se associados ao desenvolvimento de fenótipos tumorais resistentes ao tratamento hormonal, sendo a expressão do miR-221 mais elevada em células de CaP com fenótipo mais agressivo do que em células de CaP com crescimento mais lento e menos invasivas [69]. *Zheng* e colaboradores observaram um aumento do potencial do crescimento tumoral nas células menos invasivas com a introdução exógena do miR-221 [69]. O miR-221 encontra-se também envolvido na diferenciação neuroendócrina (NE), uma característica comum na carcinogénese prostática e que está associada como marcador de pior prognóstico [69]. Este miRNA é capaz de induzir diferenciação NE em células privadas de androgénios, podendo levar a HR [69]. Os miR-221 e miR-222 estão também envolvidos no processo de EMT. Os seus níveis de expressão estão correlacionados com a repressão de TRPS1 (*Trichorhinophalangeal Syndrome Type I Protein*), um fator de transcrição [97]. Esta repressão provoca um aumento dos níveis de ZEB2 resultando na indução de EMT, essencial para o desenvolvimento de metástases [38]. Devido ao seu papel, os miR-221 e miR-222 estão assim sugeridos como potenciais alvos para o desenvolvimento de eficientes terapias no tratamento oncológico [98].

Alterações na p53 são características do desenvolvimento tumoral. A expressão desta pode ser modulada pelo miR-1233, recentemente definido como oncomiR em CCR [73,99]. Trabalhos desenvolvidos por *Wulfken* e colaboradores mostraram que os níveis deste miRNA em indivíduos com CCR são superiores em relação a indivíduos saudáveis, cerca de dez vezes em amostras de soro e duas vezes em tecidos de RCC [73]. Em CaP não existem estudos sobre o seu papel. No entanto, sendo este miRNA um inibidor da p53, é possível que um aumento da sua expressão esteja associada a CaPHR, por promoção do ciclo celular.

Deste modo, a desregulação dos níveis de expressão destes miRNAs e conseqüentemente das vias de sinalização moduladas por estes, podem regular o desenvolvimento de tumores prostáticos, podendo também condicionar o desenvolvimento de fenótipos tumorais mais agressivos, nomeadamente resistente à TBA. O estudo de perfis de expressão de miRNAs no desenvolvimento de CaP poderá revelar-se uma estratégia útil na definição de novos biomarcadores associados ao desenvolvimento de HR.

1.5. Polimorfismos genéticos funcionais no GEMIN4

O desenvolvimento neoplásico é condicionado pela interação entre o meio ambiente em que o indivíduo se encontra e a variabilidade genética individual.

Os polimorfismos são definidos como variações na sequência de DNA existentes nos indivíduos normais de uma população, estando a variante menos frequente presente em pelo menos 1% dessa população, sendo os mais comuns os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) [100]. Os SNPs são a principal fonte de variabilidade individual, pelo que cada indivíduo é portador de um vasto grupo de polimorfismos, o que lhe confere um património genético único. Estudos genéticos com SNPs relacionados com cancro são cada vez mais comuns, sendo dois dos seus objetivos a associação destas variações com a suscetibilidade para o desenvolvimento neoplásico, assim como o seu efeito na resposta a diferentes fármacos na área da oncologia [40–42,100,101].

Estudos recentes defendem que variações de nucleótidos dentro da sequência de ligação nos genes dos miRNAs podem modular o processamento desses miRNAs e levar a uma expressão reduzida destes [101–103].

São já vários os polimorfismos descritos nos genes da maquinaria do processamento de miRNAs, que influenciam o risco para o desenvolvimento neoplásico, e com impacto na progressão tumoral [42,46,101].

Um dos polimorfismos descritos na maquinaria de processamento dos miRNAs é o *GEMIN4* T/C (rs7813), localizado numa região codificante do *GEMIN4* [46,104]. O *GEMIN4* é uma molécula com função na formação do spliciossoma, no *splicing* do mRNA, no *splicing* do miRNA e faz parte do complexo de processamento RISC, essencial para a ligação do miRNA maduro ao mRNA alvo, possuindo assim um importante papel no processamento dos miRNAs [46,105]. A transição T/C conduz a uma substituição do aminoácido cisteína pelo aminoácido arginina [104]. No CaP, Liu e colegas observaram que o alelo T confere um risco aumentado para o desenvolvimento da neoplasia [106].

Alterações na sequência de nucleótidos da proteína *GEMIN4* parecem influenciar o processo de carcinogénese podendo resultar na expressão diferencial de miRNAs específicos, e cumulativamente contribuir para a modulação do microambiente tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Definição de biomarcadores moleculares associados à resposta à TBA e à sobrevivência global em indivíduos com CaP.

2.2. Objetivos específicos

- Definir um perfil de expressão de miRNAs associado ao desenvolvimento de resistência à terapia de bloqueio androgénico em linhas celulares de cancro da próstata;
- Avaliar o perfil de expressão de miRNAs associado ao desenvolvimento de resistência à terapia de bloqueio androgénico, definido no estudo *in vitro*, em doentes com CaP submetidos a este tratamento;
- Avaliar a influência dos níveis de expressão de miRNAs na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global nos indivíduos com CaP;
- Avaliar a influência do património genético no intervalo livre de doença e na sobrevivência global: análise do polimorfismo *GEMIN4 T/C* (rs7813).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise do perfil de expressão de miRNAs em linhas celulares de cancro da próstata

Para o presente trabalho foram selecionadas duas linhas celulares de CaP, as células LnCaP caracterizadas como hormono-dependentes e as células PC3 caracterizadas como hormono-resistentes (Figuras 8 e 9, respetivamente). A linha LnCaP foi cedida pelo Laboratório de Patologia Geral, Universidade de Coimbra. A linha PC3 é proveniente do biobanco *European Collection of Cell Cultures* (ECACC), e deriva de uma metástase óssea de um adenocarcinoma de grau IV, de um indivíduo com 62 anos [107].

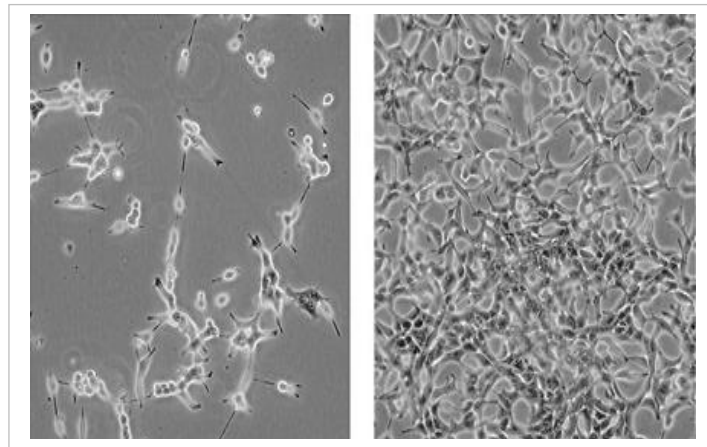


Figura 8. Linha celular LnCaP.

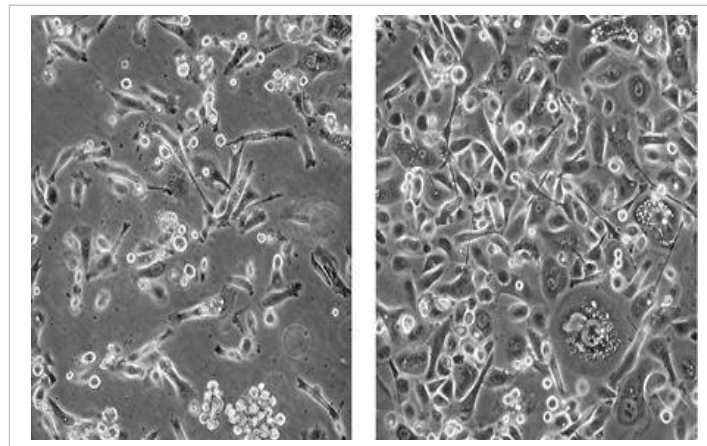


Figura 9. Linha celular PC3.

Ambas as linhas celulares aderentes foram mantidas em meio RPMI 1640 (1X) (Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) e 1% de uma mistura de antibióticos (penicilina-estreptomicina). As células foram mantidas em atmosfera húmida, numa incubadora a 37°C suplementada com 5% de CO₂.

Atingindo um estado de confluência de 80–90%, as células cultivadas em frascos T75 foram usadas para isolamento de miRNAs. Em primeiro lugar aspirou-se o meio de cultura do frasco e adicionou-se 5 mL de tampão PBS (*Phosphate buffered saline*) para lavagem das células. Após esta lavagem, o PBS foi aspirado e foram adicionados 3 mL de tripsina, garantindo que esta cobria toda a camada de células. Posteriormente, o frasco com a tripsina foi colocado na incubadora a 37°C e 5% de CO₂, durante aproximadamente 3 minutos, de modo a garantir o eficiente descolamento das células aderentes. Seguidamente adicionou-se 6 mL de meio de cultura para inativação da tripsina e todo o material celular foi transferido para um tubo *falcon* e centrifugado a 1500 rpm durante 3 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* de células ressuspendido em 5 mL de meio de cultura, do qual se retirou uma alíquota para um *ependorf*. A partir da alíquota retiraram-se 15 µL da suspensão de células e adicionaram-se 15 µL do corante *Trypan Blue*. Após homogeneização, retiraram-se 15 µL dividindo-se este volume pelos dois lados de uma câmara de contagem de *Neubauer*. A contagem de células realizou-se visualizando a câmara de contagem de *Neubauer* ao microscópio invertido e foram contadas o número de células presentes em dois campos equidistantes da câmara, usando-se o valor médio para calcular o número de células presente na suspensão. A quantidade de células em interesse foi retirada para posterior isolamento de miRNAs.

Os miRNAs foram extraídos a partir de um *pellet* de aproximadamente 2 milhões de células, por um método de extração por colunas com recurso ao *kit* comercial de extração *Grisp® GRS microRNA kit*. Após isolamento dos miRNAs a sua concentração e pureza foi determinada por medição da absorvância a 260 e 280 nm usando o espectofotómetro *NanoDrop 1000A*. Posteriormente, procedeu-se à sua conversão em cDNA com recurso ao *kit* – *Taqman® MicroRNA reverse Transcription kit* da *Applied Biosystems*.

A quantificação relativa de miRNAs foi realizada por PCR em tempo real com recurso ao aparelho *StepOne Real-Time PCR System* e a *TaqMan® MicroRNA Assays* da *Applied Biosystems* (Figura 10). Em todas as reações de quantificação foram realizados controlos negativos, realizando-se também análises das amostras em duplicado.

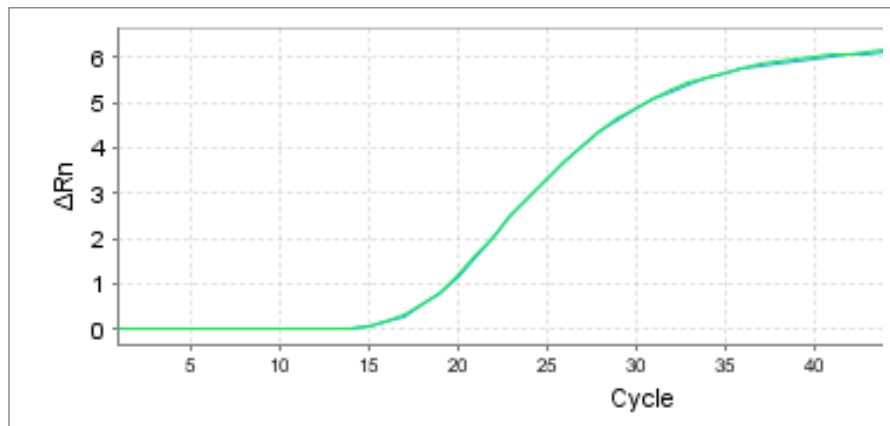


Figura 10. Curva de amplificação da expressão relativa dos microRNAs.

3.2. Análise do perfil de expressão de miRNAs em amostras biológicas de doentes com cancro da próstata

3.2.1. População

Participaram no estudo 309 homens caucasianos, com uma média de idade de $68,5 \pm 7,9$ anos, com diagnóstico histopatológico de CaP do Instituto Português de Oncologia do Porto. O tempo médio do *follow-up* foi 51 meses. Do grupo de casos em estudo, 64 (20,7%) apresentavam doença localizada e 132 (42,7%) doença localmente-avançada (extensão extraprostática, podendo atingir as vesículas seminais ou estender-se a outros órgãos e/ou estruturas periprostáticas). Foram considerados com doença metastática os indivíduos que apresentavam metástases à distância no momento do diagnóstico (N=113, 36,6%). Todos os doentes foram submetidos a tratamento hormonal: 64,2% dos casos realizaram terapia de bloqueio total, com a administração combinada de antiandrogénios e agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (aLHRH); 5,4% dos casos realizaram aLHRH e 30,4% dos casos somente antiandrogénios. O estado de hormono-resistência (HR) foi definido com base na recorrência dos valores de PSA, tendo sido definida como dois aumentos consecutivos dos valores de PSA acima de 1.0 ng.mL^{-1} , com diferença de pelo menos 0.2 ng.mL^{-1} .

Atendendo ao diferente perfil de expressão de miRNAs observado nas linhas, verificamos que os miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 se encontravam com expressão aumentada na linha PC3 relativamente à linha LnCaP. Deste modo fomos avaliar a expressão em circulação destes miRNAs num subconjunto de 45 amostras de sangue periférico de homens com diagnóstico histopatológico de CaP, seguidos na consulta de Urologia do IPO-Porto, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: etnia Caucasiana, idade superior a 50 anos, sem história familiar de cancro e submetidos a TBA. Todos os indivíduos selecionados, de acordo com os procedimentos ético-legais assinaram o consentimento informado para participação no estudo, de acordo com a declaração de Helsínquia. A todos os participantes do estudo foi colhida uma amostra de sangue periférico (8ml) através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa, para tubos contendo uma solução de EDTA.

Após colheita das amostras procedeu-se ao seu processamento, obtendo um *pellet* de leucócitos, posteriormente armazenado em substância de conservação *Tripure-Roche*[®] a -80°C . A extração de miRNAs das amostras incluídas no estudo, a sua conversão em cDNA e quantificação relativa foi realizada de acordo com os procedimentos previamente mencionados para as linhas celulares, sendo feito um ajuste da quantidade de miRNA para conversão em cDNA de 12 ng/mL. Como as amostras já se encontravam lisadas, a única diferença de procedimento foi a não utilização inicial de um tampão de lise.

3.3. Análise do polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813)

3.3.1. Extração do DNA genómico

O DNA genómico foi isolado a partir de sangue periférico recorrendo a um *kit* de extração comercial da Qiagen[®], *Qiamp*[®] *DNA Blood Mini Kit*. O DNA foi extraído através de um sistema de colunas de centrifugação, de acordo com as especificações do fornecedor. A variante genética *GEMIN4* T/C foi analisada por discriminação alélica, usando *Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR)* (ABI7300), efetuada por tecnologia *TaqMan (Applied Biosystems)*, com recurso ao *assay* C__2988802_40 em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC- alelo T

(CCCTCAGCAATGGACTTTAAGAAGCTCTGCTCGTGTGCCCTCTGGAGCAAG) e FAM-alelo C (CCCTCAGCAATGGACTTTAAGAAGCCCTGCTCGTGTGCCCTCTGGAGCAAG).

A reação de amplificação perpez um volume de 6µL/caso, contendo 2,5 µL de 2x *TaqMan Universal Master Mix*, 0,125µL de 40x *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay*, 2,375 µL de água bidestilada estéril (Braun®), e 1µL de DNA. As condições da amplificação basearam-se na ativação da Taq DNA Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

A amplificação foi detetada e analisada com recurso ao aparelho *Real-Time 7300 ABI* e através do *software 7300 System Sequence Detection* (versão 1.2.3 *Applied Biosystems*).

Como controlo de qualidade da genotipagem, o seu procedimento foi repetido em 10% das amostras e foram usados controlos negativos para confirmar a ausência de contaminação.

3.4. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, versão 17.0).

Os diferentes níveis de expressão de miRNA nas duas linhas celulares foram avaliados por quantificação relativa, e as diferenças médias de expressão foram determinadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*Livak Method*).

Considerando o intervalo de tempo entre o início da TBA e a aquisição de HR, definimos dois tempos até HR: HR precoce (< 20 meses) e HR tardia (> 60 meses).

Atendendo à distribuição normal dos valores de expressão dos diferentes miRNAs, foi utilizado o teste *t de student* para comparação dos valores médios entre os diferentes grupos de estudo.

De modo a avaliar a influência dos diferentes níveis de miR-7-2 e miR-221 no tempo até desenvolvimento de HR e na sobrevivência global destes doentes foram definidos dois perfis de expressão, nomeadamente alta expressão e baixa expressão. A análise do desenvolvimento de HR e da sobrevivência global foi realizada recorrendo ao método de *Kaplan-Meier*, efectuando-se as respectivas curvas *Hazard* e *Survival*.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo do perfil de expressão de microRNAs em linhas Celulares e em doentes com cancro da próstata

Na figura 11 encontra-se representado o gráfico respeitante à expressão relativa normalizada dos miRNAs selecionados para o presente estudo nas linhas celulares de cancro da próstata, LnCaP e PC3.

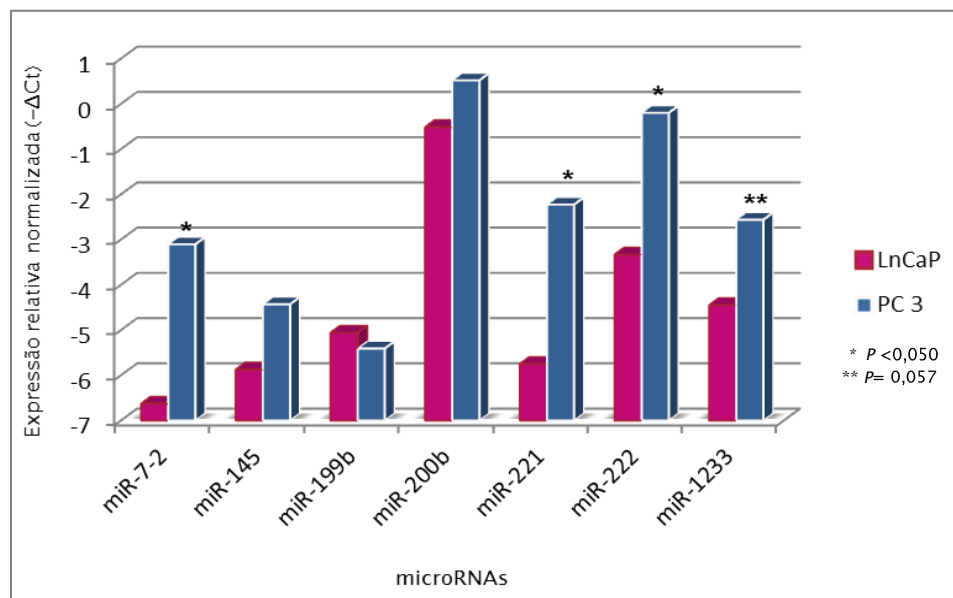


Figura 11. Estudo comparativo da expressão relativa normalizada dos miRNAs selecionados nas duas linhas celulares LnCaP (hormono-dependente) e PC3 (hormono-resistente).

De acordo com os resultados obtidos, observamos diferentes níveis de expressão relativamente aos miR-7-2, miR-221 e miR-222 quando comparamos as linhas celulares LnCaP e PC3, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Verificamos uma expressão aumentada destes quatro miRNAs nas células PC3 em relação às células LnCaP (miR-7-2: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 11,3$, $P=0,012$; miR-221: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 11,3$, $P=0,002$; miR-222: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 8,6$, $P=0,002$) (Figura 12). Relativamente ao miR-1233, observamos uma tendência para níveis aumentados deste miRNA nas células PC3 (miR-1233: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 3,7$, $T\ test\ P=0,057$).

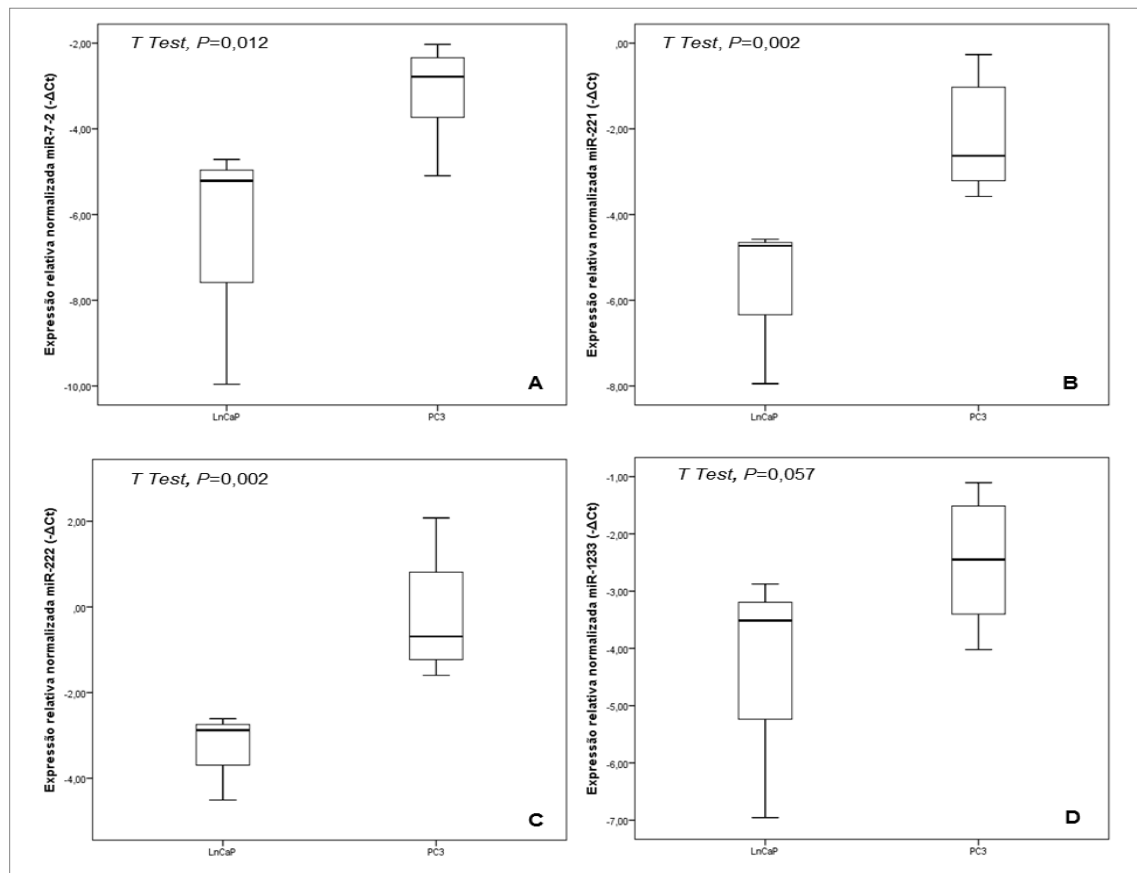


Figura 12. Expressão relativa normalizada dos miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 nas linhas celulares LNCaP e PC3.

Relativamente à expressão dos miR-145, miR-199b e miR-200b não encontramos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos os níveis de expressão destes miRNAs na linha celular PC3 com a linha celular LNCaP (*T test* $P=0,176$, $P=0,753$ e $P=0,242$, respetivamente) (Figura 13).

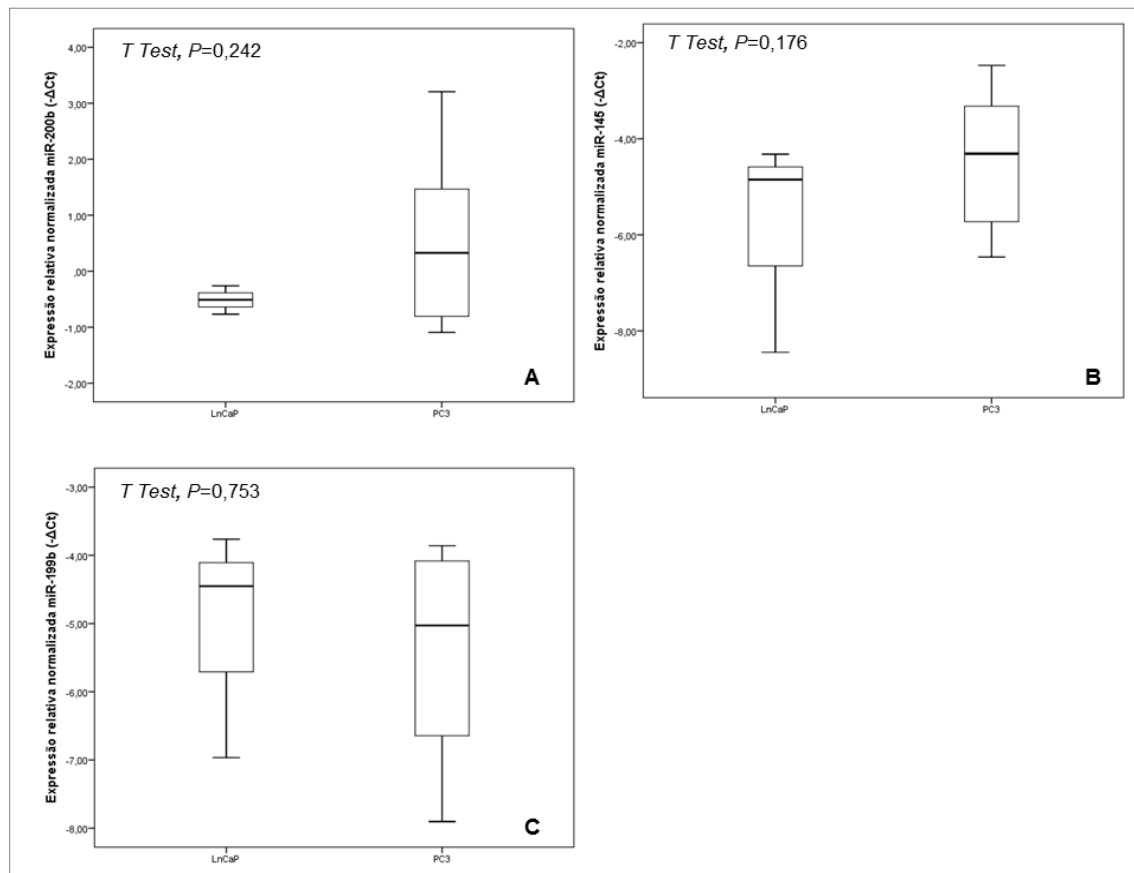


Figura 13. Expressão relativa normalizada dos miR-145, miR-199b e miR-200b nas linhas celulares LnCaP e PC3.

Os quatro miRNAs que apresentaram uma expressão aumentada, na linha celular PC3 relativamente à linha celular LnCaP foram usados como alvo de investigação em amostras biológicas de doentes com CaP submetidos a TBA.

Cumulativamente, observamos que os níveis de expressão em circulação dos miR-7-2 e miR-221 se encontravam aumentados nos indivíduos que apresentavam HR precoce (*T test* $P=0,034$ e $P=0,036$, respetivamente) (Figura 14A, 14B). Para os miR-222 e miR-1233 não observamos esta diferença (*T test* $P=0,474$ e $P=0,434$, respetivamente) (Figuras 14C e 14D, respetivamente).

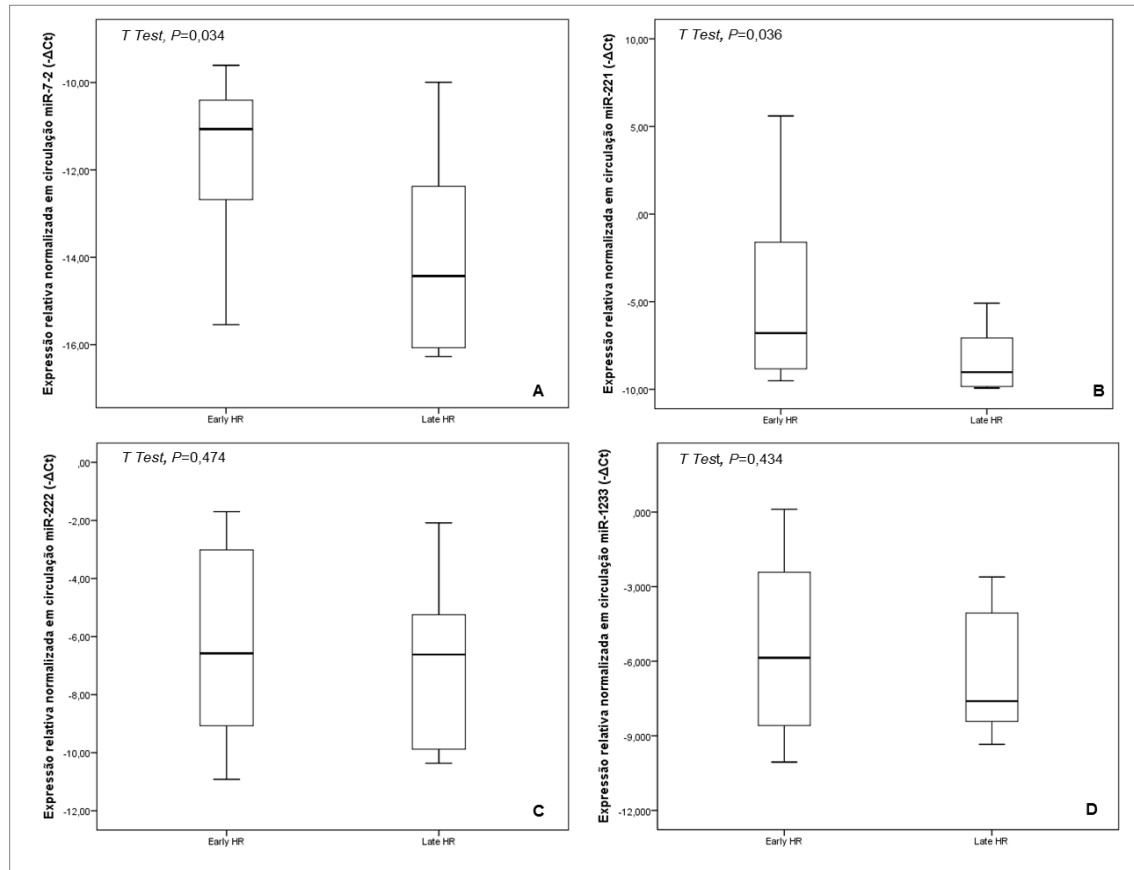


Figura 14. Expressão relativa normalizada em circulação dos miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 em indivíduos com diagnóstico de CaP, atendendo ao tempo até à aquisição de HR.

Considerando os resultados obtidos definimos dois perfis de expressão: perfil de alta expressão e perfil de baixa expressão, para os miR-7-2 e miR-221.

4.2. Influência da expressão do microRNA-7-2 e do microRNA-221 na resposta à terapia de bloqueio androgénico

Na figura 15 encontra-se representada a influência dos diferentes níveis de expressão do miR-7-2 e do miR-221 no desenvolvimento de HR. Observamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e com alta expressão do miR-7-2 apresentam um menor tempo até à aquisição de HR em comparação com indivíduos com baixa expressão do miR-7-2 (11 vs. 51 meses, *Log Rank test* $P=0,004$) (Figura 15A). Nos indivíduos com tumores de Grau de Gleason < 8 , a alta ou baixa expressão de miR-7-2 não parece ter qualquer influência na aquisição de HR (*Log Rank test* $P=0,292$) (Figura 15B).

Relativamente ao miR-221, o tempo até desenvolvimento de HR é menor em indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e com elevada expressão do miR-221, contrariamente aos indivíduos com baixa expressão deste miRNA (10 vs. 46 meses, *Log Rank test* $P=0,012$) (Figura 15C). Em indivíduos cujos tumores são classificados com Grau de Gleason < 8 , o nível de expressão do miR-221 parece não influenciar a resposta à TBA (*Log Rank test* $P=0,415$) (Figura 15D).

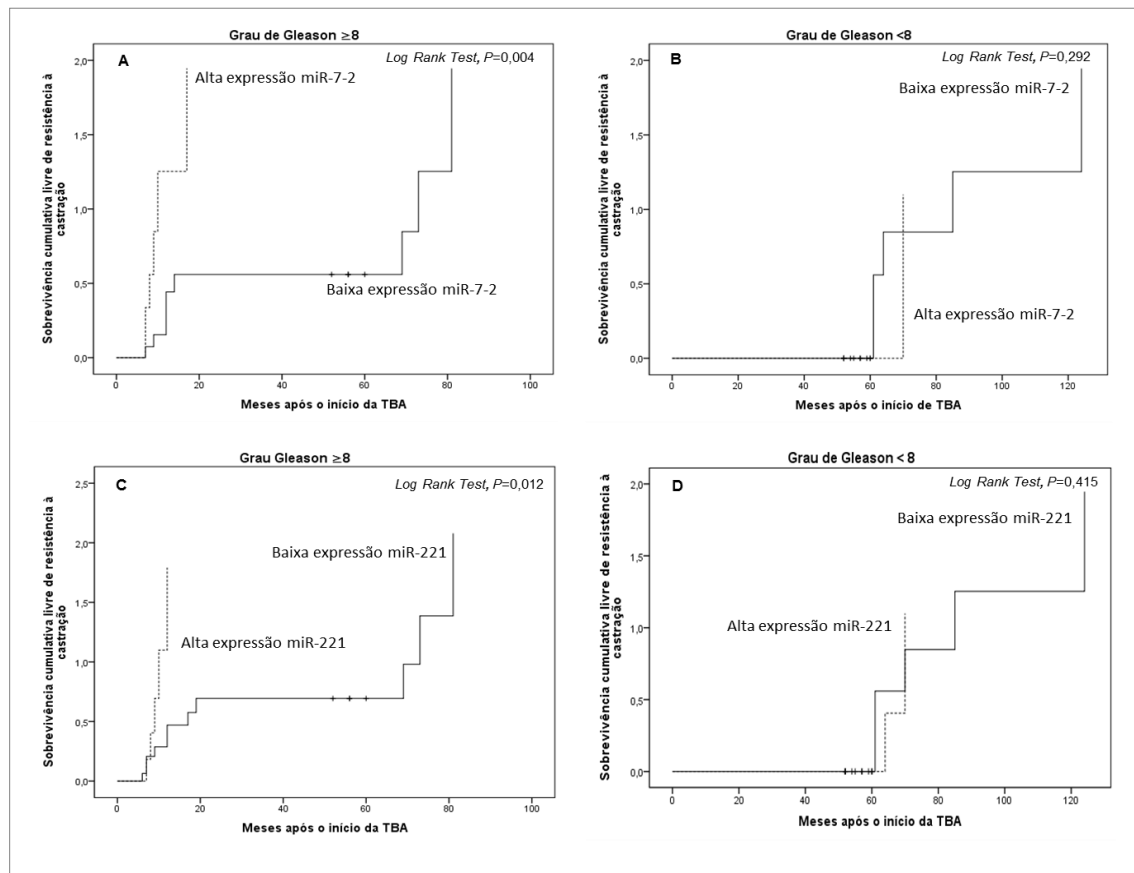


Figura 15. Influência dos níveis de expressão dos miR-7-2 e miR-221 no tempo até aquisição de HR: estratificação segundo o Grau de Gleason.

A mesma análise foi efetuada tendo em consideração o biomarcador PSA. Observamos que indivíduos com valores de PSA ≥ 20 ng/ml e cumulativamente com níveis de expressão elevados de miR-7-2 apresentam menor tempo até desenvolvimento de HR do que os indivíduos com níveis de expressão inferiores deste miRNA (24 vs. 68 meses, *Log Rank test P=0,022*) (Figura 16A). Quando o valor de PSA é < 20 ng/ml, não observamos diferenças no tempo até HR comparando os indivíduos com elevada expressão do miR-7-2 com os indivíduos com baixos níveis de expressão do miRNA (*Log Rank test P=0,275*) (Figura 16B).

Relativamente ao miR-221, não observamos diferenças no tempo até HR em indivíduos com elevada expressão vs. baixa expressão deste miRNA (*Log Rank test P=0,370* para PSA ≥ 20 ng/ml e *P=0,104* para PSA < 20 ng/ml) (Figuras 16C e 16D, respetivamente).

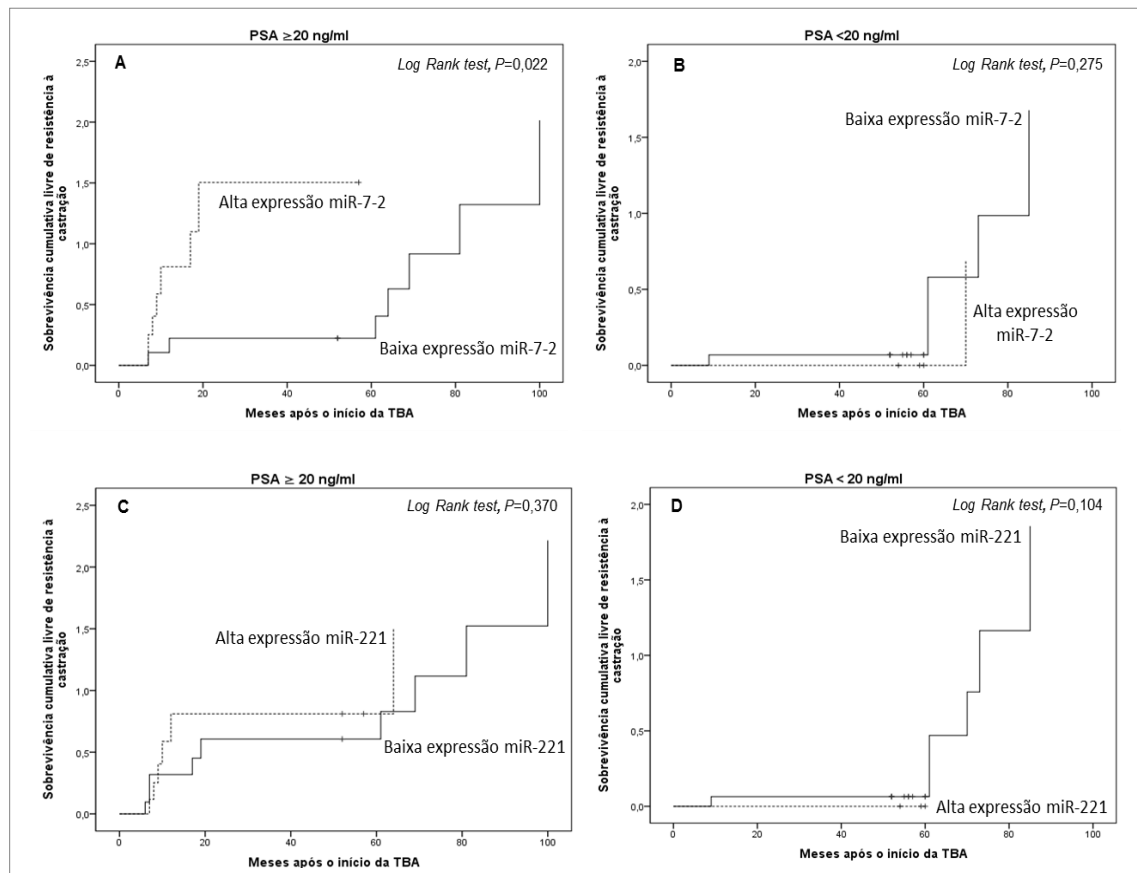


Figura 16. Influência dos níveis de expressão dos miR-7-2 e miR-221 no tempo até aquisição de HR: estratificação segundo o valor de PSA.

4.3. Influência da expressão do microRNA-7-2 e do microRNA-221 na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata

Na figura 17 encontram-se representadas as curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*, estratificadas segundo o Grau de Gleason do tumor. Observamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e que apresentam simultaneamente níveis de expressão elevados do miR-7-2 apresentam uma sobrevivência reduzida relativamente aos indivíduos com baixa expressão deste miRNA (28 vs. 116 meses, *Log Rank test* $P=0,001$) (Figura 17A). Contudo, esta diferença nos indivíduos com tumores melhor diferenciados, ou seja, com Grau de Gleason <8 , não foi observada (*Log Rank test* $P=0,929$) (Figura 17B).

Relativamente ao miR-221 verificamos que embora elevados níveis deste miRNA diminuam a sobrevivência de 98 para 65 meses, esta diferença não é estatisticamente significativa (*Log Rank test* $P=0,307$) (Figura 17C). Não observamos também qualquer diferença estatisticamente significativa nos indivíduos com tumores de Grau de Gleason <8 (*Log Rank test* $P=0,799$) (Figura 17D).

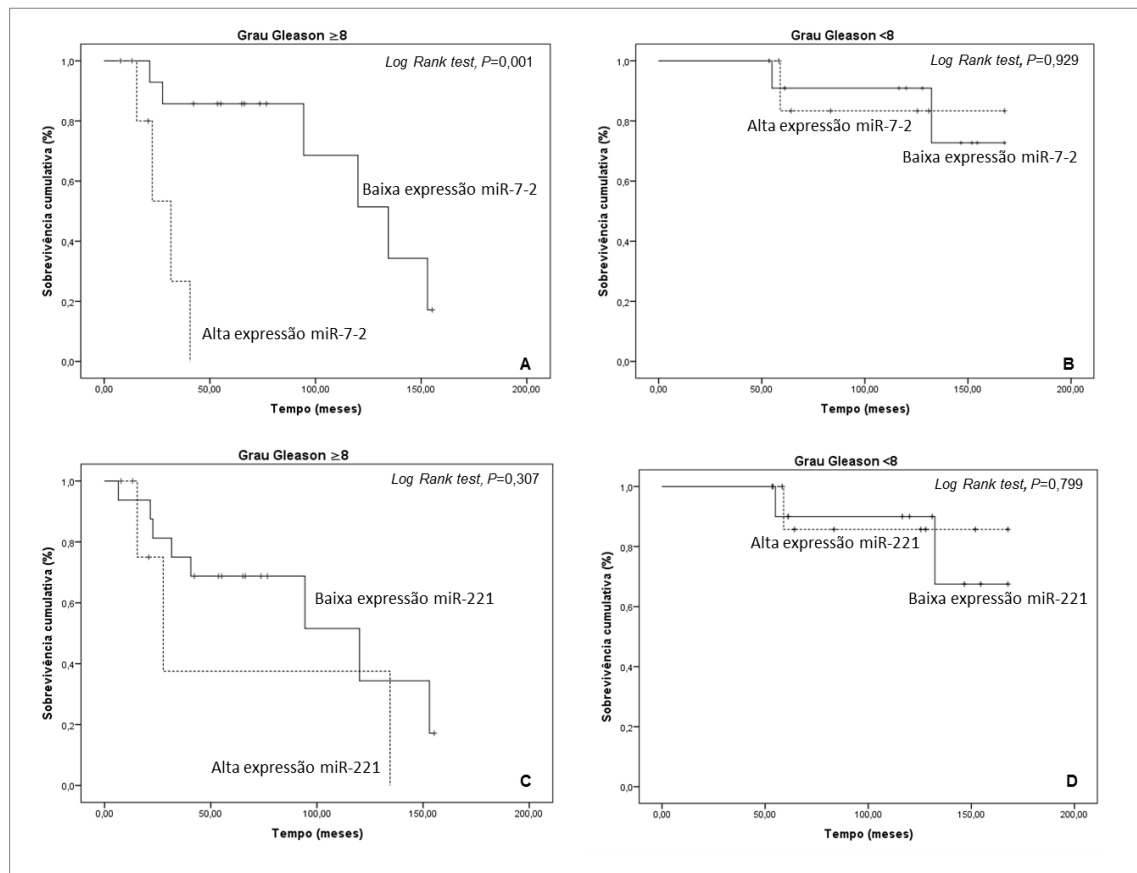


Figura 17. Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*, estratificadas pelo Grau de Gleason, e teste *Log Rank* após TBA em doentes com CaP: influência da expressão dos miR-7-2 e miR-221.

Verificamos também que indivíduos com valores de $PSA \geq 20$ ng/ml e que apresentam elevados níveis de expressão do miR-7-2 apresentam uma sobrevivência reduzida relativamente aos indivíduos com baixa expressão do miR-7-2 (43 vs. 125 meses, *Log Rank test* $P=0,004$), não se observando esta diferença em indivíduos com valores de $PSA < 20$ ng/ml (*Log Rank test* $P=0,397$) (Figuras 18A e 18B, respetivamente).

Relativamente ao miR-221 não observamos diferenças na sobrevivência global dos indivíduos com elevada expressão vs. baixa deste miRNA, para valores de $PSA \geq 20$ ng/ml e < 20 ng/ml (*Log Rank test* $P=0,664$ e $P=0,431$, respetivamente) (Figuras 18C e 18D, respetivamente).

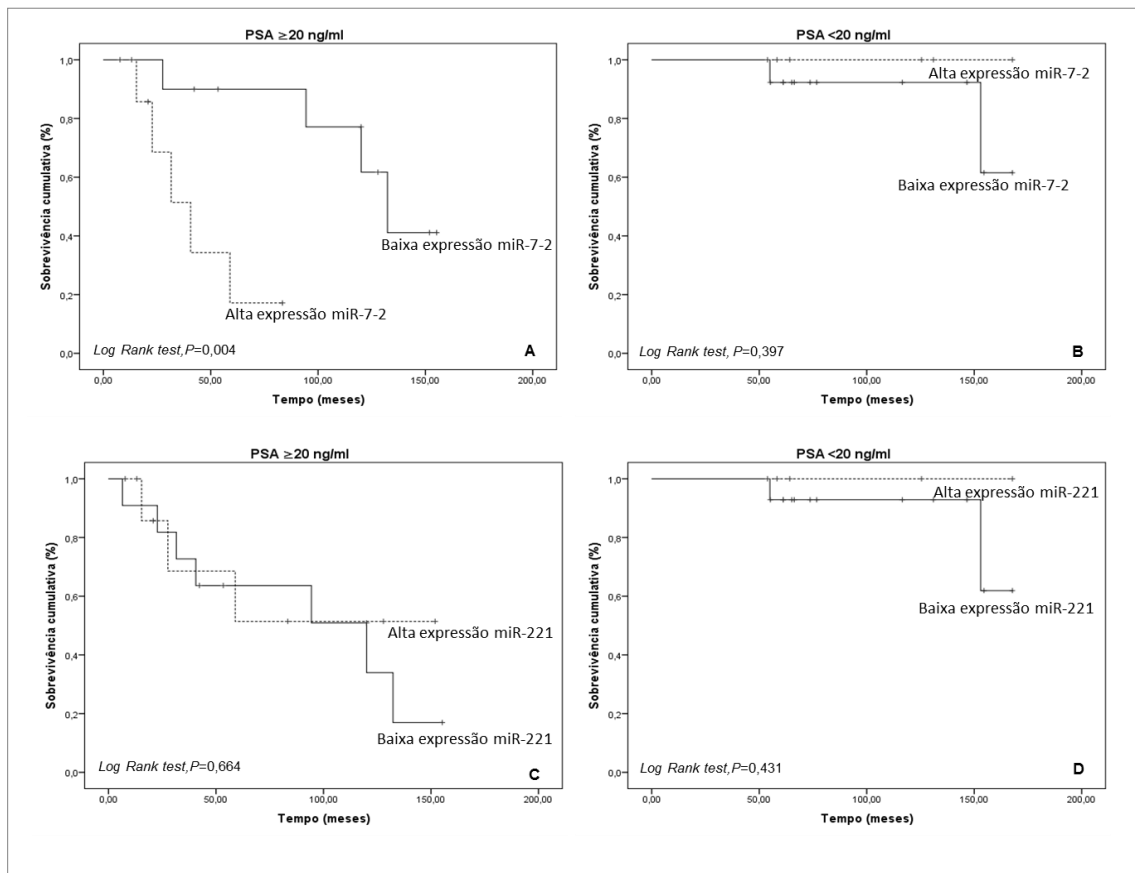


Figura 18. Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*, estratificadas pelo valor de PSA, e teste *Log Rank* após TBA em doentes com CaP: influência da expressão dos miR-7-2 e miR-221.

4.4. Influência do polimorfismo *GEMIN4* T/C na resposta à terapia de bloqueio androgénico

Nos indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 , o intervalo livre de doença é significativamente menor nos portadores TT/TC em comparação com os homozigóticos CC (51 vs. 84 meses, *Log Rank test* $P=0,035$) (Figura 19A). Relativamente aos indivíduos com Grau de Gleason < 8 não se verifica qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos do polimorfismo e a média de progressão da doença (*Log Rank test* $P=0,702$) (Figura 19B).

Considerando o biomarcador PSA, observamos que o genótipo não tem influência no tempo até à aquisição de HR, independentemente do valor deste (*Log Rank test* $P=0,259$ para PSA ≥ 20 ng/ml e $P=0,438$ para PSA < 20 ng/ml) (Figuras 19C e 19D, respetivamente).

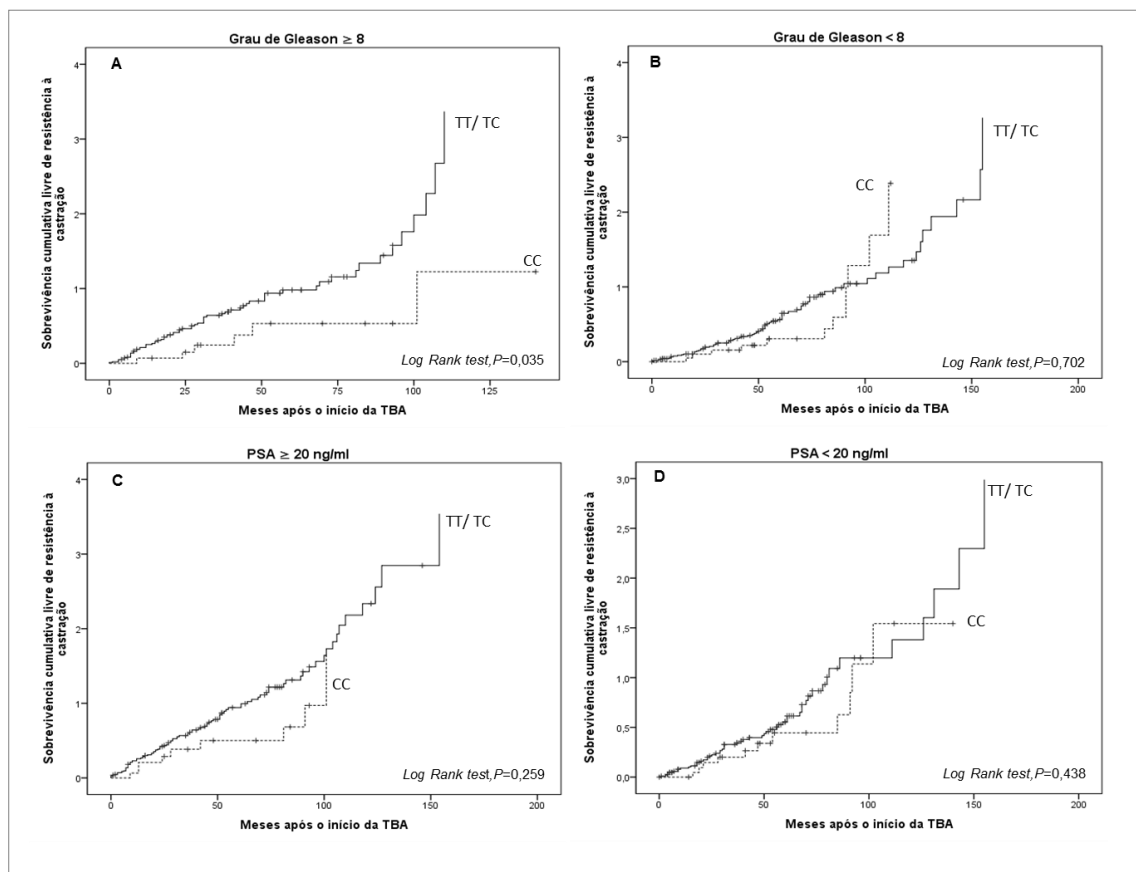


Figura 19. Influência do polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) no tempo até aquisição de HR: estratificação segundo o Grau de Gleason e o valor de PSA.

4.5. Influência do polimorfismo *GEMIN4* T/C na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata

Na figura 20 estão representadas as curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* para o polimorfismo *GEMIN4* T/C. Observamos que o genótipo não tem influência na sobrevivência dos indivíduos para qualquer valor de Grau de Gleason do tumor (*Log Rank test* $P=0,531$ para Grau de Gleason ≥ 8 e $P=0,859$ para Grau de Gleason < 8) (Figuras 20A e 20B, respetivamente). Para o PSA, verificamos que para qualquer valor deste biomarcador, o genótipo não influencia a sobrevivência dos indivíduos (*Log Rank test*, $P= 0,614$ para PSA ≥ 20 ng/ml e $P= 0,871$ para PSA < 20 ng/ml) (Figuras 20C e 20D, respetivamente).

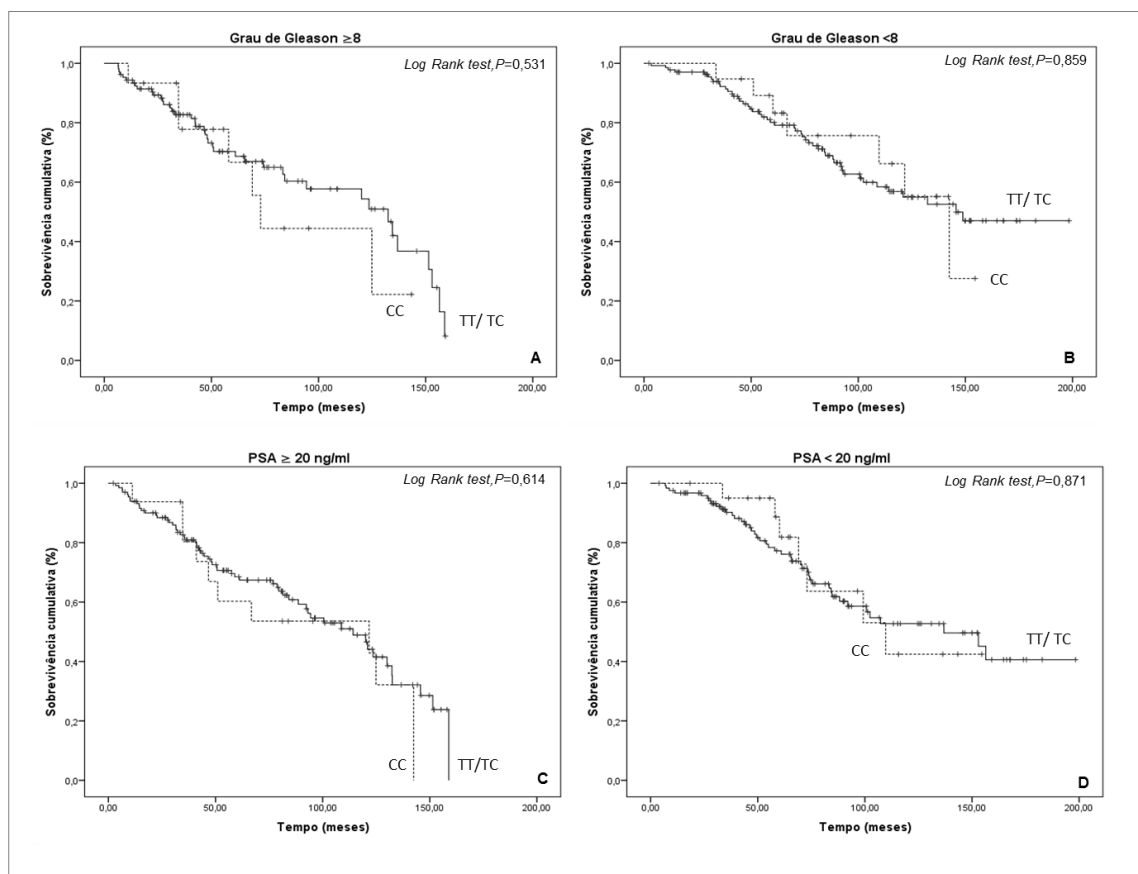


Figura 20. Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste *Log Rank* para o polimorfismo *GEMIN4* T/C: estratificação segundo o Grau de Gleason e o valor de PSA.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços da Biologia Molecular nos últimos anos terem permitido esclarecer muitas das questões na área da Oncologia, esta ainda continua a ser um alvo permanente de estudo, dada a elevada complexidade e heterogeneidade que caracterizam o cancro. A identificação de genes e das suas alterações, associadas ao desenvolvimento de neoplasias malignas, permitiu uma melhor compreensão do processo de carcinogénese, tornando-se uma ferramenta de auxílio na área de diagnóstico e terapêutica.

O CaP, apesar da vasta área de investigação de que é alvo, ainda permanece uma doença enigmática com diversas questões por esclarecer. Um dos maiores problemas centra-se na resistência à TBA desenvolvida por indivíduos com CaP. A aquisição deste fenótipo de resistência, denominado CaPHR, é uma forma ainda complexa e letal de CaP, caracterizada por um elevado potencial de progressão e de metastização, existindo atualmente opções terapêuticas bastante limitadas e ineficazes, traduzindo-se esta realidade em elevadas taxas de mortalidade e morbilidade [25,27]. Apesar de todos os avanços da investigação oncológica, os mecanismos moleculares associados à aquisição deste fenótipo tumoral maligno ainda permanecem por esclarecer. A definição de biomarcadores moleculares preditivos do desenvolvimento de HR, poderão revelar-se uma estratégia promissora no desenho de novos alvos de tratamento e no desenvolvimento de novas estratégias mais eficazes no prolongamento da sobrevivência destes doentes.

Os miRNAs têm sido definidos como uma nova classe de genes reguladores com envolvimento na homeostasia celular, controlo da proliferação celular, da apoptose e da diferenciação celular [15,37,57,108,109]. Devido à sua capacidade de atuarem como promotores da evolução neoplásica, promovendo a expressão de genes favoráveis ao seu desenvolvimento, ou como inibidores dessa evolução, bloqueando a expressão dos mesmos genes, os miRNAs têm-se tornado alvos de estudo na área da oncologia [67,110–114].

Alguns estudos demonstraram que no CaP ocorre uma desregulação da expressão dos miRNAs, como é exemplo o miR-125b, com função supressora tumoral, cuja transcrição é modulada pela via dos androgénios [115]. Os miR-221 e miR-222, com transcrição regulada pela via EGF/EGFR, bastante importante na proliferação celular, têm uma expressão aumentada em linhas celulares de CaPHR comparativamente a linhas hormono-dependentes [54].

Não só em estudos *in vitro* é possível encontrar diferenças nos níveis de expressão de miRNAs, podendo também essas diferenças ser observadas em

amostras biológicas em circulação. Estudos realizados em amostras de soro de indivíduos com CaP vs. indivíduos saudáveis, demonstraram uma expressão aumentada do miR-21 nos primeiros [116]. Também o miR-141 e o miR-200b têm uma expressão diferencial dependendo da agressividade da doença, encontrando-se aumentados em amostras de soro de indivíduos com CaP de alto grau [117].

A ocorrência de polimorfismos genéticos em elementos da via de biogênese dos miRNAs parece modular os seus níveis de expressão [81-83]. O polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) parece influenciar o processo de carcinogênese, estando o alelo T associado a aumento do risco de desenvolvimento de CaP [106].

A definição de perfis de expressão de miRNAs associados à HR poderá auxiliar não só a previsão deste fenótipo de resistência, como também abrir caminho para o desenvolvimento de potenciais novas terapias dirigidas a miRNAs desregulados.

5.1. Estudo do perfil de expressão de microRNAs em linhas celulares e em doentes com cancro da próstata

Na avaliação dos níveis de expressão dos miRNAs em linhas celulares, observamos uma maior expressão dos miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 na linha celular PC3 comparativamente à linha celular LnCaP ($P=0,012$, $P=0,002$, $P=0,002$ e $P=0,057$, respetivamente). Relativamente aos miR-145, miR-199b e miR-200b não observamos diferença nos seus níveis de expressão entre as duas linhas celulares usadas para estudo.

O aumento dos níveis de miR-7-2, miR-221, miR-222 e miR-1233 podem induzir a estimulação da proliferação e sobrevivência celular por ativação simultânea da via mediada pelo EGFR e por indução da progressão do ciclo celular via inibição da p53.

Cumulativamente, estes miRNAs foram analisados em amostras biológicas em circulação de indivíduos com CaP e submetidos a TBA. Quando avaliamos os níveis de expressão em circulação destes miRNAs, verificamos que os níveis dos miR-7-2 e miR-221 se encontravam aumentados nos indivíduos que desenvolvem HR precocemente (< 20 meses) relativamente aos indivíduos que desenvolvem mais tardiamente HR (> 60 meses) ($P=0,034$ e $P=0,036$, respetivamente). Para os miR-222 e miR-1233 não observamos diferenças estatisticamente significativas na sua expressão relativa entre os dois grupos de indivíduos ($P=0,474$ e $P=0,434$, respetivamente).

Rai e colaboradores mostraram que o miR-7-2 inibe a fosforilação de AKT, o que resulta na supressão da via EGFR-PI3K-AKT e conseqüentemente numa menor proliferação celular em linhas celulares de cancro do pulmão [79]. Contrariamente, *Chou* e colegas demonstraram que este miRNA se comporta como oncomiR em linhas celulares de cancro do pulmão, sugerindo que o papel deste miRNA em cancro do pulmão ainda não está definido [75]. A expressão ectópica de miR-7 nessas mesmas linhas mostrou ter a capacidade de promover o crescimento celular e a formação de tumores [75]. Similarmente ao observado por *Yu* e colaboradores em CCR, também no presente trabalho verificamos um aumento de expressão do miR-7-2 numa linha celular de fenótipo mais agressivo. *Yu* e colaboradores observaram *in vitro* que o miR-7 tem a capacidade de estimular a proliferação e migração celulares [74]. Tal como já foi referido, elevados níveis de expressão do miR-7 podem promover a proliferação celular de

células de CCR, podendo este aumento de proliferação nas células de CaP traduzir-se na aquisição precoce de HR [74].

Simultaneamente, observamos níveis aumentados dos miR-221 e miR-222 na linha PC3 comparativamente à linha LnCaP, o que é concordante com o trabalho de *Sun* e colaboradores que observaram um aumento da expressão dos miR-221 e miR-222 em linhas celulares de CaP caracterizadas como HR comparativamente a linhas celulares hormono-dependentes [54]. Os elevados níveis de expressão destes miRNAs podem resultar de um aumento da ativação da via de sinalização EGFR-RAS-RAF-MEK, responsável pela modulação da sua expressão [18,118]. A ativação desta via em CaP encontra-se associada ao desenvolvimento de tumores mais agressivos, ocorrendo um aumento da expressão do recetor EGFR durante a progressão para HR [18,96].

Recentemente, o miR-1233 surge na literatura como um miRNA oncogénico por apresentar a capacidade de inibir a tradução da proteína p53, favorecendo a progressão do ciclo celular e consequentemente a proliferação celular [73]. Deste modo, admitimos que um aumento deste miRNA nas células de fenótipo agressivo possa contribuir para a sua proliferação e consequentemente para fenótipos de HR.

Nos nossos indivíduos, os níveis aumentados dos miR-7-2 e miR-221 poderão resultar de uma maior atividade da via EGF/EGFR implicada no controlo da proliferação de tumores HR.

5.2. Influência dos níveis de expressão do microRNA-7-2 na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata

Atualmente, não existe nenhum estudo que clarifique o papel do miR-7-2 na carcinogénese prostática. No nosso estudo observamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e alta expressão do miR-7-2, adquirem HR mais precocemente quando comparados com indivíduos com tumores de igual Grau de Gleason e baixos níveis de expressão deste miRNA (11 vs. 51 meses, $P=0,004$). Nos indivíduos com tumores de Grau de Gleason < 8 os níveis de expressão do miR-7 parecem não ter influência no tempo até à aquisição de HR ($P=0,292$). Para o biomarcador PSA, observamos também que indivíduos com elevado valor deste, associado a alta expressão de miR-7-2, desenvolvem HR mais cedo do que indivíduos com o mesmo valor de PSA mas baixos níveis do miRNA (24 vs. 68 meses, $P=0,022$).

Relativamente à sobrevivência global, verificamos que indivíduos com alta expressão de miR-7-2 e com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 possuem uma menor sobrevivência, em média de 28 meses, em comparação com indivíduos cuja expressão do miRNA é mais baixa (28 vs. 116 meses, $P=0,001$). Podemos igualmente observar uma menor sobrevivência dos indivíduos quando cumulativamente existe elevada expressão do miR-7-2 e valores de PSA elevados (≥ 20 ng/ml) reduzindo de 125 para 43 meses a sobrevivência destes ($P=0,004$).

Tendo em conta os resultados obtidos, observamos que a alta expressão do miR-7-2 cumulativamente com elevado Grau de Gleason ou alto valor de PSA, estão associados a um desenvolvimento precoce de HR e a uma menor sobrevivência na nossa população em estudo. Este aumento dos níveis de miR-7-2 pode ser reflexo da hiperativação da via mediada pelo EGFR e implicada no desenvolvimento de HR [75].

O miR-7-2 pode também estar envolvido na via de sinalização mediada pelos androgénios. Sabe-se que os miRNAs para além de inibirem a tradução do mRNA podem também promover a transcrição genética [119]. Deste modo, o miR-7-2 poderá estimular a transcrição do gene do AR, ocorrendo uma amplificação no número de cópias do gene do recetor (uma das possíveis explicações para aquisição de HR).

A avaliação dos níveis de expressão do miR-7-2 em doentes com CaP pode assim tornar-se uma ferramenta útil como biomarcador de prognóstico permitindo a monitorização de indivíduos submetidos a TBA.

5.3. Influência dos níveis de expressão do microRNA-221 na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata

O miR-221 é considerado um miRNA oncogénico e encontra-se já associado com o desenvolvimento e metastização em CaP [84]. A sua expressão pode ser induzida pela ativação da via RAS-RAF-MEK, após transativação do recetor EGFR [38,95,96]. Está descrito na literatura que este miRNA se encontra associado ao desenvolvimento de CaPHR, sendo a sua expressão mais elevada em células de CaP com fenótipo agressivo, em comparação com células de CaP de crescimento mais lento e menos invasivas, o que se encontra de acordo com os resultados obtidos [54,69].

Atendendo aos resultados, observamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e alta expressão do miR-221 desenvolvem HR em média ao fim de 10 meses enquanto que os indivíduos com baixos níveis de expressão do miR-221 que desenvolvem HR ao fim de 46 meses ($P=0,012$). Para tumores de Grau de Gleason inferiores a 8 não se observam diferenças estatisticamente significativas atendendo aos diferentes níveis de expressão do miR-221 ($P=0,415$).

De acordo com os resultados obtidos, os níveis de expressão do miR-221 parecem apenas estar relacionados e influenciar o desenvolvimento de HR, em tumores de Grau de Gleason elevado. O miR-221 parece possuir a habilidade de modular a progressão do ciclo celular por apresentar a capacidade de inibir proteínas inibidoras do ciclo celular, como a p27^{kip1} e a p57, favorecendo a sua progressão e portanto, podendo levar a fenótipos de HR [120]. Este miRNA encontra-se também envolvido na promoção da metastização, por possuir a capacidade de inibir o gene supressor tumoral *TIMP3* (*metallopeptidase inhibitor 3*), inibidor das MMPs (*metalloproteinase*), por sua vez indutoras da EMT, e, conseqüentemente, podendo favorecer a aquisição de fenótipos tumorais mais agressivos e resistentes à TBA [121]. Recentemente, Sun e colaboradores demonstraram que o miR-221 promove o desenvolvimento de HR em células de CaP, provocando a *downregulation* de HECTD2 e de RAB1A [122]. Estes investigadores colocaram a hipótese de que o miR-221, ao diminuir a expressão de HECTD2 e RAB1A provoca uma reprogramação da via do AR e ativação de novas ciclinas, o que leva ao desenvolvimento de HR [122]. O HECTD2 tem função de degradação, podendo assim controlar pós-transcricionalmente a estabilidade ou a abundância de fatores específicos associados à maquinaria do AR e de

outros fatores que estimulam a proliferação celular. Se o miR-221 faz com que a expressão de HECTD2 diminua, possivelmente esta estabilidade e abundância poderão aumentar.

O RAB1A é um membro da superfamília das GTPases Ras, alternando entre o estado inativo (ligado a GDP) e ativo (ligado a GTP), e tem a função de controlar o tráfego de vesículas do retículo endoplasmático para o Complexo de Golgi. *Sun* e colegas verificaram que uma sub-expressão de RAB1A, provocada por um aumento do miR-221, aumenta o crescimento de células independentes de androgénios. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos permanecem por determinar [122].

Dada a heterogeneidade de expressão dos miRNAs, torna-se importante a definição de um perfil de expressão nos doentes com CaP, associado à aquisição de HR, para a qual permanecem muitas questões por responder, e à sobrevivência global dos indivíduos.

5.4. Influência do polimorfismo *GEMIN4*T/C na resposta à terapia de bloqueio androgénico e na sobrevivência global de doentes com cancro da próstata

Vários estudos têm revelado a importância e o impacto funcional que os SNPs nos genes envolvidos na biogénese dos miRNAs podem apresentar no desenvolvimento tumoral [102,123–125]. Estudos desenvolvidos por *Sung* e colaboradores identificaram 3 SNPs, em regiões codificantes de genes da maquinaria dos miRNAs, *AGO2* e *DICER1*, associados com risco de desenvolvimento de cancro da mama [101]. Também *Liang* e colegas definiram 13 SNPs associados com aumento do risco para desenvolvimento de cancro do ovário [124].

O produto codificado pelo *GEMIN4* possui um papel fundamental na maturação e *splicing* do pré-miRNA e na ligação do miRNA maduro ao mRNA alvo, fazendo parte do complexo RISC [105,126,127]. Assim, anomalias na proteína *GEMIN4* podem resultar na expressão diferencial de miRNAs específicos com influência na carcinogénese.

Weng e colaboradores demonstraram recentemente que a variante C do polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) diminui o risco de tumores malignos da bainha dos nervos periféricos do pulmão [105]. No CaP, *Liu* e colegas observaram que o alelo T do polimorfismo confere um aumento do risco em cerca de três vezes no desenvolvimento da neoplasia, não existindo até ao momento nenhum estudo que associe a ocorrência deste polimorfismo com o desenvolvimento de HR em doentes com CaP [106].

No nosso estudo, observamos que indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 e portadores de genótipo TT/TC adquirem HR mais cedo relativamente aos indivíduos com genótipo CC (51 vs. 84 meses, $P=0,035$).

Uma das interpretações prováveis para este resultado poderá envolver o facto de o alelo T do polimorfismo *GEMIN4* T/C ter implicações funcionais na proteína *GEMIN4* resultando num estado mais funcional, podendo levar a um aumento da produção de miRNAs com função oncogénica, o que consequentemente poderá resultar em tumores mais agressivos, de Grau de Gleason mais elevado. Deste modo, e pela observação dos nossos resultados, indivíduos com genótipo TT/TC adquirem HR num menor intervalo de tempo.

Assim, a determinação do polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) dos indivíduos com CaP pode auxiliar no estabelecimento de um perfil genético de eficiência da TBA.

A descoberta dos miRNAs como uma nova classe de moléculas reguladoras torna-os cada vez mais um alvo de estudo nas mais diversas áreas, rapidamente passando para a área clínica como importantes e promissoras ferramentas terapêuticas.

Os miRNAs têm vindo a ser associados ao desenvolvimento de neoplasias, tendo já sido definidos como úteis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, com impacto na sobrevivência global e na resposta a tratamentos.

O miR-7-2 parece atuar como um oncomiR na carcinogénese prostática, estando, nos indivíduos envolvidos no estudo, altos níveis de expressão em circulação deste miRNA associados a aquisição de fenótipo de HR precoce e a uma menor sobrevivência global, para indivíduos portadores de tumores de Grau de Gleason elevados. Também nestes tumores a elevada expressão em circulação do miR-221 parece influenciar o desenvolvimento de HR nos doentes com CaP, diminuindo o intervalo de tempo até à sua aquisição. Deste modo, os níveis aumentados destes miRNAs em indivíduos com tumores de Grau de Gleason ≥ 8 poderão ser definidos como possíveis biomarcadores preditivos de desenvolvimento de HR. Além disso, o miR-7-2 poderá também ser definido como um possível biomarcador de sobrevivência global dos indivíduos com tumores de Grau de Gleason elevado.

Variações genéticas, como polimorfismos, presentes nos genes da via de biogénese dos miRNAs parecem influenciar o processo de carcinogénese por resultar na expressão diferencial de miRNAs específicos. A proteína GEMIN4, essencial para que o processo de regulação pelos miRNAs ocorra, parece ser portadora de alguns desses polimorfismos.

O alelo T do polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813) surge na literatura associado a um aumento do risco para o desenvolvimento de cancro da próstata. De acordo com os resultados observados, indivíduos com genótipo TT/TC e que cumulativamente possuem tumores de Grau de Gleason ≥ 8 , adquirem HR num menor intervalo de tempo comparativamente a indivíduos com genótipo CC e com tumores de mesmo Grau de Gleason. Assim, o genótipo dos indivíduos para o polimorfismo *GEMIN4* T/C poderá ser definido como um possível biomarcador preditivo de desenvolvimento de HR em tumores de Grau de Gleason elevado.

A definição de um perfil genético preditivo de resposta à TBA em doentes com CaPHR, poderá tornar-se um fator de prognóstico permitindo a orientação terapêutica nestes doentes.

Trabalhos futuros passarão por replicar os dois estudos numa nova amostragem com número superior de casos e em diferentes populações, para uma possível correlação entre os níveis de expressão em circulação dos miR-7-2 e miR-221 e o genótipo dos indivíduos para o polimorfismo *GEMIN4* T/C (rs7813). Mais ainda, poderão ser realizados estudos funcionais para avaliar o impacto do polimorfismo na proteína GEMIN4.

1. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D. and Bray, F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, **49**, 1374-1403.
2. Strahm, B. and Capra, M. (2005) Insights into the molecular basis of cancer development. *Paediatrics and Child Health*, **15**, 333-338.
3. DeVita, L., Lawrence, T. and Rosenberg, S. (2008) *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 8 ed.
4. Kumar, V., Cotran, R. and Collins, T. (2005) *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. 7 ed.
5. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
6. Center, M.M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O. and Bray, F. (2012) International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*, **61**, 1079-1092.
7. Villeirs, G.M., K, L.V., De Neve, W.J. and De Meerleer, G.O. (2005) Magnetic resonance imaging anatomy of the prostate and periprostatic area: a guide for radiotherapists. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, **76**, 99-106.
8. Chen, Y.C., Page, J.H., Chen, R. and Giovannucci, E. (2008) Family history of prostate cancer and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *Prostate*, **68**, 1582-1591.
9. Allen, N.E., Appleby, P.N., Travis, R.C. and *al., e.* (2008) Animal foods, protein, calcium and prostate cancer risk: the european prospective investigation into cancer and nutrition. *Br J cancer*, **98**, 1574-1581.
10. Gathirua-Mwangi, W.G. and Zhang, J. (2013) Dietary factors and risk for advanced prostate cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*.
11. Nicastro, H.L. and Dunn, B.K. (2013) Selenium and Prostate Cancer Prevention: Insights from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Nutrients*, **5**, 1122-1148.
12. Holmberg, L. (2013) Obesity, nutrition, and prostate cancer: insights and issues. *Eur Urol*, **63**, 821-822.
13. Heidenreich, A., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., Mottet, N. and Schmid, H.P. (2011) EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Treatment of Clinically Localised Disease. *Eur Urol*, **59**, 61-71.
14. Silva, F.C.d. (ed.) (2013) *Recomendações clínicas no tratamento do carcinoma da próstata*, Lisboa.
15. Zhang, J., Zhao, H., Gao, Y. and Zhang, W. (2012) Secretory miRNAs as novel cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta*, **1826**, 32-43.
16. Hao, Y., Zhao, Y., Zhao, X., He, C., Pang, X., Wu, T.C., Califano, J.A. and Gu, X. (2011) Improvement of prostate cancer detection by integrating the PSA test with miRNA expression profiling. *Cancer Invest*, **29**, 318-324.
17. Fontenete, S., Silva, J., Teixeira, A.L., Ribeiro, R., Bastos, E., Pina, F. and Medeiros, R. (2011) Controversies in using urine samples for Prostate Cancer detection: PSA and PCA3 expression analysis. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, **37**, 719-726.
18. Teixeira, A.L., Ribeiro, R., Morais, A., Lobo, F., Fraga, A., Pina, F., Calais-da-Silva, F.M., Calais-da-Silva, F.E. and Medeiros, R. (2009) Combined analysis of EGF+61G>A and TGFB1+869T>C functional polymorphisms in the time to androgen independence and prostate cancer susceptibility. *Pharmacogenomics J*, **9**, 341-346.

19. Na, R., Liu, F., Zhang, P., Ye, D., Xu, C., Shao, Q., Qi, J., Wang, X., Chen, Z., Wang, M. *et al.* (2013) Evaluation of reported prostate cancer risk-associated SNPs from genome-wide association studies of various racial populations in Chinese men. *Prostate*.
20. Teixeira, A.L., Gomes, M., Nogueira, A., Azevedo, A.S., Assis, J., Dias, F., Santos, J.I., Lobo, F., Morais, A., Mauricio, J. *et al.* (2013) Improvement of a Predictive Model of Castration-Resistant Prostate Cancer: Functional Genetic Variants in TGFbeta1 Signaling Pathway Modulation. *PLoS One*, **8**, e72419.
21. Cai, Q., Wang, Z., Zhang, W., Guo, X., Shang, Z., Jiang, N., Tian, J. and Niu, Y. (2013) Association between glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
22. Nicolas Mottet, J.B., Michel Bolla, Steven Joniau, Malcolm Masone, et al. (2011) EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *EUROPEAN UROLOGY*, **59**, 572–583.
23. Chin, K.Y. and Ima-Nirwana, S. (2012) Sex steroids and bone health status in men. *International journal of endocrinology*, **2012**, 208719.
24. Pienta, K.J. and Bradley, D. (2006) Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **12**, 1665-1671.
25. Feldman, B.J. and Feldman, D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews. Cancer*, **1**, 34-45.
26. Amaral, T., Macedo, D., Fernandes, I. and Costa, L. (2012) Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets, and Treatment. *Prostate Cancer*.
27. Attar, R.M., Takimoto, C.H. and Gottardis, M.M. (2009) Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res*, **15**, 3251-3255.
28. Humphreys, M.R., Fernandes, K.A. and Sridhar, S.S. (2013) Impact of Age at Diagnosis on Outcomes in Men with Castrate-Resistant Prostate Cancer (CRPC). *Journal of Cancer*, **4**, 304-314.
29. Attard, G., Sarker, D., Reid, A., Molife, R., Parker, C. and de Bono, J.S. (2006) Improving the outcome of patients with castration-resistant prostate cancer through rational drug development. *Br J Cancer*, **95**, 767-774.
30. Sethi, S., Kong, D., Land, S., Dyson, G., Sakr, W.A. and Sarkar, F.H. (2013) Comprehensive molecular oncogenomic profiling and miRNA analysis of prostate cancer. *American journal of translational research*, **5**, 200-211.
31. Ajit, S.K. (2012) Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors (Basel)*, **12**, 3359-3369.
32. Jackson, D.B. (2009) Serum-based microRNAs: are we blinded by potential? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, E5.
33. Ali, S., Almhanna, K., Chen, W., Philip, P.A. and Sarkar, F.H. (2010) Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. *American journal of translational research*, **3**, 28-47.
34. Li, T., Leong, M.H., Harms, B., Kennedy, G. and Chen, L. (2013) MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker. *World journal of gastroenterology : WJG*, **19**, 5615-5621.
35. Ow, T.J., Sandulache, V.C., Skinner, H.D. and Myers, J.N. (2013) Integration of cancer genomics with treatment selection: From the genome to predictive biomarkers. *Cancer*.
36. Sethi, S., Ali, S., Philip, P.A. and Sarkar, F.H. (2013) Clinical advances in molecular biomarkers for cancer diagnosis and therapy. *International journal of molecular sciences*, **14**, 14771-14784.
37. Ma, S., Chan, Y.P., Kwan, P.S., Lee, T.K., Yan, M., Tang, K.H., Ling, M.T., Vielkind, J.R., Guan, X.Y. and Chan, K.W. (2011) MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of

- prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2. *Cancer Res*, **71**, 583-592.
38. Shah, M.Y. and Calin, G.A. (2011) MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer. *Genome Med*, **3**, 56.
39. Ma, R., Jiang, T. and Kang, X. (2012) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, **31**, 38.
40. Erichsen, H.C. and Chanock, S.J. (2004) SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer*, **90**, 747-751.
41. Huang, C.N., Huang, S.P., Pao, J.B., Hour, T.C., Chang, T.Y., Lan, Y.H., Lu, T.L., Lee, H.Z., Juang, S.H., Wu, P.P. *et al.* (2012) Genetic polymorphisms in oestrogen receptor-binding sites affect clinical outcomes in patients with prostate cancer receiving androgen-deprivation therapy. *Journal of internal medicine*, **271**, 499-509.
42. Lin, J., Horikawa, Y., Tamboli, P., Clague, J., Wood, C.G. and Wu, X. (2010) Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, **31**, 1805-1812.
43. Wang, X.Q., Liu, L., Liu, Y. and Zhang, K. (2013) TLR-2 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Cancer: Evidence from Meta-Analysis. *Genetic testing and molecular biomarkers*.
44. Yang, Z., Fang, X., Pei, X. and Li, H. (2013) Polymorphisms in the ERCC1 and XPF Genes and Risk of Breast Cancer in a Chinese Population. *Genetic testing and molecular biomarkers*, **17**, 700-706.
45. Shi, X.B., Tepper, C.G. and deVere White, R.W. (2008) Cancerous miRNAs and their regulation. *Cell Cycle*, **7**, 1529-1538.
46. Horikawa, Y., Wood, C., Yang, H., Zhao, H., Ye, Y., Gu, J., Lin, J., Habuchi, T. and Wu, X. (2008) Single nucleotide polymorphisms of microRNA-machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **14**, 7956-7962.
47. Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B.J. and van den Berg, A. (2010) MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. *RNA*, **16**, 1087-1095.
48. Lee, Y.S. and Dutta, A. (2009) MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, **4**, 199-227.
49. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M. and Rai, K. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 15524-15529.
50. Croce, C.M. (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 704-714.
51. Cho, W.C. (2010) MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 1273-1281.
52. Yang, X., Bemis, L., Su, L.J., Gao, D. and Flaig, T.W. (2012) miR-125b Regulation of Androgen Receptor Signaling Via Modulation of the Receptor Complex Co-Repressor NCOR2. *Biores Open Access*, **1**, 55-62.
53. Ribas, J., Ni, X., Haffner, M., Wentzel, E.A., Salmasi, A.H., Chowdhury, W.H., Kudrolli, T.A., Yegnasubramanian, S., Luo, J., Rodriguez, R. *et al.* (2009) miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res*, **69**, 7165-7169.
54. Sun, T., Wang, Q., Balk, S., Brown, M., Lee, G.S. and Kantoff, P. (2009) The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, **69**, 3356-3363.
55. Fujita, Y., Kojima, K., Ohhashi, R., Hamada, N., Nozawa, Y., Kitamoto, A., Sato, A., Kondo, S., Kojima, T., Deguchi, T. *et al.* (2010) MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of

- hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem*, **285**, 19076-19084.
56. Walter, B.A., Valera, V.A., Pinto, P.A. and Merino, M.J. (2013) Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *Journal of Cancer*, **4**, 350-357.
57. Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer*, **6**, 857-866.
58. Hainaut, P. and Plymoth, A. (2013) Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy. *Current opinion in oncology*, **25**, 50-51.
59. Nana-Sinkam, S.P. and Croce, C.M. (2011) Non-coding RNAs in cancer initiation and progression and as novel biomarkers. *Molecular oncology*, **5**, 483-491.
60. Selth, L.A., Tilley, W.D. and Butler, L.M. (2012) Circulating microRNAs: macro-utility as markers of prostate cancer? *Endocr Relat Cancer*, **19**, R99-R113.
61. Sonia A. Melo, M.E. (2011) Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fir. *FEBS Letters*, **585**, 2087-2099.
62. Tong, A.W. and Nemunaitis, J. (2008) Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer gene therapy*, **15**, 341-355.
63. Chen, Y., Zhang, L. and Hao, Q. (2013) Candidate microRNA biomarkers in human epithelial ovarian cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *Cancer cell international*, **13**, 86.
64. Carlsson, J., Helenius, G., Karlsson, M.G., Andren, O., Klinga-Levan, K. and Olsson, B. (2013) Differences in microRNA expression during tumor development in the transition and peripheral zones of the prostate. *BMC Cancer*, **13**, 362.
65. Rohr, C., Kerick, M., Fischer, A., Kuhn, A., Kashofer, K., Timmermann, B., Daskalaki, A., Meinel, T., Drichel, D., Borno, S.T. et al. (2013) High-throughput miRNA and mRNA sequencing of paired colorectal normal, tumor and metastasis tissues and bioinformatic modeling of miRNA-1 therapeutic applications. *PLoS One*, **8**, e67461.
66. Szczyrba, J., Loprich, E., Wach, S., Jung, V., Unteregger, G., Barth, S., Grobholz, R., Wieland, W., Stohr, R., Hartmann, A. et al. (2010) The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res*, **8**, 529-538.
67. Watahiki, A., Wang, Y., Morris, J., Dennis, K., O'Dwyer, H.M., Gleave, M., Gout, P.W. and Wang, Y. (2011) MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS One*, **6**, e24950.
68. Shen, J., Hruby, G.W., McKiernan, J.M., Gurvich, I., Lipsky, M.J., Benson, M.C. and Santella, R.M. (2012) Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate*, **72**, 1469-1477.
69. Zheng, C., Yinghao, S. and Li, J. (2012) MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2. *Medical oncology*, **29**, 815-822.
70. Catto, J.W., Alcaraz, A., Bjartell, A.S., De Vere White, R., Evans, C.P., Fussel, S., Hamdy, F.C., Kallioniemi, O., Mengual, L., Schlomm, T. et al. (2011) MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol*, **59**, 671-681.
71. Fuse, M., Nohata, N., Kojima, S., Sakamoto, S., Chiyomaru, T., Kawakami, K., Enokida, H., Nakagawa, M., Naya, Y., Ichikawa, T. et al. (2011) Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol*, **38**, 1093-1101.
72. Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., Ahmad, A., Kim, H.R. and Sarkar, F.H. (2009) miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells*, **27**, 1712-1721.
73. Wulfken, L.M., Moritz, R., Ohlmann, C., Holdenrieder, S., Jung, V., Becker, F., Herrmann, E., Walgenbach-Brunagel, G., von Ruecker, A., Muller, S.C. et al. (2011) MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One*, **6**, e25787.

74. Yu, Z., Ni, L., Chen, D., Zhang, Q., Su, Z., Wang, Y., Yu, W. and Wu, X. (2013) Identification of miR-7 as an oncogene in renal cell carcinoma. *J Mol Hist*.
75. Chou, Y.T., Lin, H.H., Lien, Y.C., Wang, Y.H., Hong, C.F., Kao, Y.R., Lin, S.C., Chang, Y.C., Lin, S.Y., Chen, S.J. *et al.* (2010) EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res*, **70**, 8822-8831.
76. Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fine, H., Chiocca, E.A., Lawler, S. *et al.* (2008) microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res*, **68**, 3566-3572.
77. Torres, A., Torres, K., Pesci, A., Ceccaroni, M., Paszkowski, T., Cassandrini, P., Zamboni, G. and Maciejewski, R. (2012) Dereglulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*, **12**, 369.
78. Reddy, S.D., Ohshiro, K., Rayala, S.K. and Kumar, R. (2008) MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*, **68**, 8195-8200.
79. Rai, K., Takigawa, N., Ito, S., Kashiwara, H., Ichihara, E., Yasuda, T., Shimizu, K., Tanimoto, M. and Kiura, K. (2011) Liposomal delivery of MicroRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistance in lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, **10**, 1720-1727.
80. Saito Y, L.G., Egger G, *et al.* (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*, **9**, 435-443.
81. Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A. and Jones, P.A. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*, **9**, 435-443.
82. Tryndyak, V.P., Ross, S.A., Beland, F.A. and Pogribny, I.P. (2009) Down-regulation of the microRNAs miR-34a, miR-127, and miR-200b in rat liver during hepatocarcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Molecular carcinogenesis*, **48**, 479-487.
83. Pan, C., Chen, H., Wang, L., Yang, S., Fu, H., Zheng, Y., Miao, M. and Jiao, B. (2012) Down-regulation of MiR-127 facilitates hepatocyte proliferation during rat liver regeneration. *PLoS One*, **7**, e39151.
84. Hassan, O., Ahmad, A., Sethi, S. and Sarkar, F.H. (2012) Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *J Hematol Oncol*, **5**, 9.
85. Ambs, S., Prueitt, R.L., Yi, M., Hudson, R.S., Howe, T.M., Petrocca, F., Wallace, T.A., Liu, C.G., Volinia, S., Calin, G.A. *et al.* (2008) Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*, **68**, 6162-6170.
86. Leite, K.R., Tomiyama, A., Reis, S.T., Sousa-Canavez, J.M., Sanudo, A., Camara-Lopes, L.H. and Srougi, M. (2011) MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer—from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. *Urologic oncology*.
87. Zaman, M.S., Chen, Y., Deng, G., Shahryari, V., Suh, S.O., Saini, S., Majid, S., Liu, J., Khatri, G., Tanaka, Y. *et al.* (2010) The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer*, **103**, 256-264.
88. Garzia, L., Andolfo, I., Cusanelli, E., Marino, N., Petrosino, G., De Martino, D., Esposito, V., Galeone, A., Navas, L., Esposito, S. *et al.* (2009) MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One*, **4**, e4998.
89. Chao, A., Tsai, C.L., Wei, P.C., Hsueh, S., Chao, A.S., Wang, C.J., Tsai, C.N., Lee, Y.S., Wang, T.H. and Lai, C.H. (2010) Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels

- of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett*, **291**, 99-107.
90. Watanabe, R., Wei, L. and Huang, J. (2011) mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **52**, 497-500.
91. Sossey-Alaoui, K., Bialkowska, K. and Plow, E.F. (2009) The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion. *J Biol Chem*, **284**, 33019-33029.
92. Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E. and Peter, M.E. (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*, **22**, 894-907.
93. Gregory, P.A., Bracken, C.P., Smith, E., Bert, A.G., Wright, J.A., Roslan, S., Morris, M., Wyatt, L., Farshid, G., Lim, Y.Y. *et al.* (2011) An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, **22**, 1686-1698.
94. Korpál, M. and Kang, Y. (2008) The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA biology*, **5**, 115-119.
95. Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G.V., Ciafre, S.A. and Farace, M.G. (2007) miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, **282**, 23716-23724.
96. Stinson, S., Lackner, M.R., Adai, A.T., Yu, N., Kim, H.J., O'Brien, C., Spoerke, J., Jhunjunwala, S., Boyd, Z., Januario, T. *et al.* (2011) miR-221/222 targeting of trichorhinophalangeal 1 (TRPS1) promotes epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal*, **4**, pt5.
97. Stinson, S., Lackner, M.R., Adai, A.T., Yu, N., Kim, H.J., O'Brien, C., Spoerke, J., Jhunjunwala, S., Boyd, Z., Januario, T. *et al.* (2011) TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal*, **4**, ra41.
98. Li, Q., Shenb, K., Zhao, Y., He, X., Ma, C., Wang, L., Wang, B., Liu, J. and Ma, J. (2013) MicroRNA-222 promotes tumorigenesis via targeting DKK2 and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *FEBS Lett*.
99. Chen, M., Hildebrandt, M.A., Clague, J., Kamat, A.M., Picornell, A., Chang, J., Zhang, X., Izzo, J., Yang, H., Lin, J. *et al.* (2010) Genetic variations in the sonic hedgehog pathway affect clinical outcomes in non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer prevention research*, **3**, 1235-1245.
100. Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene*, **234**, 177-186.
101. Sung, H., Jeon, S., Lee, K.M., Han, S., Song, M., Choi, J.Y., Park, S.K., Yoo, K.Y., Noh, D.Y., Ahn, S.H. *et al.* (2012) Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival. *BMC Cancer*, **12**, 195.
102. Horikawa, Y., Wood, C.G., Yang, H., Zhao, H., Ye, Y., Gu, J., Lin, J., Habuchi, T. and Wu, X. (2008) Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **14**, 7956-7962.
103. Guihua Sun, J.Y., Katie Noltner, *et al.* (2009) SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, **15**, 1640-1651.
104. Hyuna Sung, S.J., Kyoung-Mu Lee, Sohee Han, Minkyong Song, *et al.* (2012) Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival. *BMC Cancer*, **12**.
105. Weng, Y., Chen, Y., Chen, J., Liu, Y. and Bao, T. (2013) Common genetic variants in the microRNA biogenesis pathway are associated with malignant peripheral nerve sheath tumor risk in a Chinese population. *Cancer epidemiology*.
106. Liu, J., Liu, J., Wei, M., He, Y., Liao, B., Liao, G., Li, H. and Huang, J. (2012) Genetic variants in the microRNA machinery gene GEMIN4 are associated with risk of prostate cancer: a case-control study of the Chinese Han population. *DNA and cell biology*, **31**, 1296-1302.

107. ATCC. (2012), Vol. 2013.
108. Cho, W.C. (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular cancer*, **6**, 60.
109. Rossbach, M. (2010) Small non-coding RNAs as novel therapeutics. *Current molecular medicine*, **10**, 361-368.
110. McDonald, R.A., Hata, A., MacLean, M.R., Morrell, N.W. and Baker, A.H. (2012) MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodelling. *Cardiovascular research*, **93**, 594-604.
111. Staszal, T., Zapala, B., Polus, A., Sadakierska-Chudy, A., Kiec-Wilk, B., Stepień, E., Wybranska, I., Chojnacka, M. and Dembinska-Kiec, A. (2011) Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, **121**, 361-366.
112. von Brandenstein, M., Richter, C. and Fries, J.W. (2012) MicroRNAs: Small but amazing, and their association with endothelin. *Life Sci*, **91**, 475-489.
113. Shi, J.B., Guo, Z.F., Zheng, X., Wang, Z.B. and Ma, Y.J. (2012) Circulating obestatin is increased in patients with cardiorenal syndrome and positively correlated with vasopressin. *Peptides*, **38**, 377-380.
114. Nana-Sinkam, S.P. and Croce, C.M. (2011) MicroRNAs as therapeutic targets in cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, **157**, 216-225.
115. Shi, X.B., Xue, L., Ma, A.H., Tepper, C.G., Kung, H.J. and White, R.W. (2011) miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate*, **71**, 538-549.
116. Zhang, H.L., Yang, L.F., Zhu, Y., Yao, X.D., Zhang, S.L., Dai, B., Zhu, Y.P., Shen, Y.J., Shi, G.H. and Ye, D.W. (2011) Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate*, **71**, 326-331.
117. Brase, J.C., Johannes, M., Schlomm, T., Falth, M., Haese, A., Steuber, T., Beissbarth, T., Kuner, R. and Sultmann, H. (2011) Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*, **128**, 608-616.
118. Teixeira, A.L., Gomes, M. and Medeiros, R. (2012) EGFR signaling pathway and related-miRNAs in age-related diseases: the example of miR-221 and miR-222. *Frontiers in genetics*, **3**, 286.
119. Lee, S. and Vasudevan, S. (2013) Post-transcriptional stimulation of gene expression by microRNAs. *Advances in experimental medicine and biology*, **768**, 97-126.
120. Miller, T.E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C.L., Jacob, S. and Majumder, S. (2008) MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, **283**, 29897-29903.
121. Zhang, C., Zhang, J., Hao, J., Shi, Z., Wang, Y., Han, L., Yu, S., You, Y., Jiang, T., Wang, J. et al. (2012) High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *Journal of translational medicine*, **10**, 119.
122. Sun, T., Wang, X., He, H.H., Sweeney, C.J., Liu, S.X., Brown, M., Balk, S., Lee, G.S. and Kantoff, P.W. (2013) MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. *Oncogene*.
123. Yang, H., Dinney, C.P., Ye, Y., Zhu, Y., Grossman, H.B. and Wu, X. (2008) Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res*, **68**, 2530-2537.
124. Liang, D., Meyer, L., Chang, D.W., Lin, J., Pu, X., Ye, Y., Gu, J., Wu, X. and Lu, K. (2010) Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response. *Cancer Res*, **70**, 9765-9776.

125. Jie Lin, Y.H., Pheroze Tamboli, Jessica Clague, Christopher G.Wood and Xifeng WU. (2010) Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, **31**, 1805–1812.
126. Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A. and Dreyfuss, G. (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, **9**, 180-186.
127. Nelson, P.T., Hatzigeorgiou, A.G. and Mourelatos, Z. (2004) miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA*, **10**, 387-394.

8. ANEXOS

Anexo I

Abstract aceite para publicação sob a forma de poster no *ESPT 2013- Second Conference: Pharmacogenomics: From cell to clinic*, Lisboa (Setembro de 2013).

Influence of *GEMIN4 rs7813 (T>C)* functional polymorphism in time to castration–resistance in prostate cancer patients submitted to androgen deprivation therapy

Juliana I Santos^{1,2}, Ana L Teixeira^{1,2}, Francisca Dias^{1,2}, Mónica Gomes^{1,2,3}, Augusto Nogueira^{1,3}, Joana Assis^{1,3}, Francisco Lobo⁴, António Morais⁴, Joaquina Maurício⁵, Rui Medeiros^{1,2,3,6}

¹ Molecular Oncology Group–CI, Portuguese Institute of Oncology, Porto Centre, Porto, Portugal

² ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal

³ LPCC, Research Department–Portuguese League Against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal

⁴ Urology Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto Centre, Porto,

⁵ Portugal Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto Centre, Porto, Portugal

⁶ CEBIMED, Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

Background:

Prostate cancer (PC) is an important public health problem, being the malignant neoplasia with the highest incidence rate in men in developed countries. Androgen deprivation therapy (ADT) is commonly used as the primary therapy for patients diagnosed in advanced stages. However, statistical data has shown that use of ADT only slightly improves the overall survival (OS) and disease usually progresses to castration resistant prostate cancer (CRPC). The CRPC is associated with tumor progression, metastatic disease development, acquisition of an aggressive PC phenotype and actually with no effective therapies. Recently, microRNAs (miRNAs) have been defined as a new class of regulatory genes that

modulate the gene expression by binding to its target messenger RNA (mRNA). Many cellular and physiological processes in health and disease were associated with changes in miRNAs expression. Increasing evidence suggests that miRNAs are involved in cancer development and progression, due to changes in regulation of miRNAs processing. The Gem-associated protein 4 (*GEMIN4*) belongs to a complex of four molecules – RISC complex– involved in binding of miRNAs to mRNAs. Recently, a *T>C* transition in *GEMIN4* gene was described, in which, the C variant was associated *in vitro* with cellular growth inhibition. Our purpose was to investigate the potential influence of the *GEMIN4 rs7813 (T>C)* functional polymorphism in acquisition of CR phenotype in response to ADT.

Material and Methods:

A follow-up study (100 months) was undertaken to evaluate response to ADT, in 295 patients, with histopathologically confirmed PC. Genotyping of *GEMIN4 rs7813 (T>C)* genetic polymorphism was performed by Real-Time PCR allelic discrimination method.

Results:

Concerning the time to CR after the beginning of ADT, we observed a significantly reduced time-to-CR in *GEMIN4 rs7813 TT/TC* carriers compared with CC genotype carriers (55.6 *versus* 70.3 months) (Breslow test, $P=0.043$). Furthermore, multivariate Cox regression model using tumor stage, Gleason ≥ 8 , and PSA levels at diagnosis as co-variants, demonstrated a higher risk of an earlier relapse in *GEMIN4 rs7813 TT/TC* genotypes patients carriers than CC carriers following ADT (hazard ratio– HR= 1.87, 95%CI: 1.08–3.20, $P= 0.024$).

Conclusions:

Our results suggest that *GEMIN4 rs7813 TT/TC* genotype may contribute to an early CR phenotype acquisition in patients submitted to ADT. Thereby, *GEMIN4 rs7813 T>C* genotypes may help to the establishment of a genetic profile to ADT efficacy in CRPC and support the impact of deregulation of miRNAs processing in PC progression.

Anexo II

Artigo intitulado *The role of TGF β 1 signalling pathway in miRNAs regulation*, submetido para publicação.