

MESTRADO

ONCOLOGIA LABORATORIAL

**Cancro da Próstata Resistente à Castração:
influência da interação de vias de sinalização proliferativas**

Bruna Inês Azevedo Barbosa

M
2020



Bruna Inês Azevedo Barbosa

Cancro da Próstata Resistente à Castração:
influência da interação de vias de sinalização proliferativas



M.I.CBAS 2020

**Cancro da Próstata Resistente à Castração:
influência da interação de vias de sinalização proliferativas**

Bruna Inês Azevedo Barbosa



Bruna Inês Azevedo Barbosa

Cancro da Próstata Resistente à Castração: influência da interação de vias de sinalização proliferativas

Dissertação de Candidatura ao Grau de **Mestre em Oncologia** – Especialização em Oncologia Laboratorial – Submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientadora – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Categoria- Investigadora Júnior

Afiliação- Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Coorientador – Doutor Carlos Alberto Trindade Resende

Categoria- Investigador Júnior

Afiliação- Grupo de Intercellular Communication and Cancer do i3S/IPATIMUP

Agradecimentos

Com o terminar desta etapa quero demonstrar o meu profundo agradecimento a todos aqueles que permitiram que isto fosse possível:

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Carmen Jerónimo pela oportunidade de ingressar neste mestrado permitindo-me aprofundar os conhecimentos em Oncologia.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros pela oportunidade da realização desta dissertação no Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral.

À minha orientadora, Doutora Ana Luísa Teixeira, pela forma empenhada com que sempre trabalhou comigo, pela sua paciência, compreensão, apoio incondicional e sábias palavras. As conversas consigo ajudaram-me a crescer, não só a nível profissional, mas essencialmente a nível pessoal. Levo comigo, mais do que ensinamentos experimentais, lições para a vida! Um obrigado não é suficiente para demonstrar toda a gratidão que sinto por si.

Ao meu coorientador, Doutor Carlos Resende por toda a partilha científica e apoio para a realização deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade e toda a ajuda.

A todos os elementos do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral por me terem recebido muito bem e sempre se mostrarem prontos a ajudar em qualquer situação. À Doutora Francisca Dias e à Doutora Vera Machado por toda a partilha de conhecimentos e apoio. Não posso deixar de agradecer de uma forma muito especial à Mestre Inês Nogueira e à Mestre Mariana Morais que estiveram sempre prontas a me ensinar e ajudar desde o primeiro momento. A vossa ajuda nesta fase final foi fundamental! Obrigada pela vossa dedicação, paciência e por me fazerem perceber que pedir e aceitar ajuda não é um sinal de fraqueza, mas sim de coragem e maturidade. Muito obrigada por tudo!

Não posso deixar de agradecer também à Cristina, à Catarina Ribeiro, à Catarina Almeida e à Ângela, parceiras de jornada que estavam sempre lá para tudo o que fosse preciso.

À Tatiana, uma amizade de 5 anos que parece que foi desde sempre. És a prova que a distância se vence com uma simples mensagem. Estarei sempre aqui para ti como sei que estás para mim. Obrigada por me aturares, Tatix!

À Catarina pelas conversas de horas, pelos lanches nos bons e maus momentos, pelos planos loucos para o futuro e pelas conversas sobre tudo e nada. Sobretudo obrigada por sempre me compreenderes quando nem eu própria me entendia...

O meu mais sincero agradecimento a toda a minha família por me apoiarem sempre desde o primeiro momento, pela preocupação e pela força para continuar.

Finalmente aos meus pais por sempre acreditarem em mim. Obrigada por tudo!

Obrigada a todos vós, uma caminhada destas não se percorre sozinha e sem a ajuda de todos nada disto seria possível!

Índice

Resumo	15
Abstract	17
1. Introdução.....	21
1.1. Cancro: Conceitos Gerais	21
1.2. Cancro da Próstata	24
1.2.1. Cancro da próstata resistente à castração: mecanismos moleculares associados.....	28
1.3. Modulação da via de sinalização do EGFR e progressão para CaP.....	32
2. Objetivos.....	39
2.1. Objetivo geral.....	39
2.2. Objetivos específicos	39
3. Material e Métodos	43
3.1. Avaliação do efeito funcional do polimorfismo genético EGFR-216G>T	43
3.2. Estudos <i>in vitro</i>	44
3.2.1. Caracterização das linhas celulares	44
3.2.2. Estabelecimento de uma linha celular resistente à bicalutamida.....	45
3.2.3. Efeito do erlotinib na dinâmica entre as vias de sinalização do AR e do EGFR	46
3.2.4. Análise proteica: <i>Western-Blot</i>	46
3.2.5. Extração de mRNA, miRNA e síntese de cDNA	47
3.2.6. Quantificação relativa por PCR em tempo real	48
3.3. Ensaio de tumorigénese <i>in vivo</i>	48
3.4. Análise estatística	49
4. Resultados.....	53
4.1. Avaliação do efeito funcional do polimorfismo genético EGFR-216G>T	53
4.2. Estabelecimento de uma linha celular resistente à bicalutamida	53

4.3. Efeito da modulação <i>in vitro</i> das vias de sinalização do AR e do EGFR e avaliação de potenciais alvos terapêuticos no CPRC	54
4.4. Efeito da modulação <i>in vivo</i> das vias de sinalização do AR e do EGFR	57
4.5. Efeito da modulação das vias de sinalização AR e EGFR nos níveis de expressão de <i>mTOR</i> e <i>HIF-2α</i>	59
4.6. Efeito da modulação <i>in vitro</i> do AR num perfil de expressão de miRNAs	60
5. Discussão	65
6. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	71
7. Referências Bibliográficas	75
8. Material Suplementar.....	85

Índice de Figuras

Figura 1 – Hallmarks of Cancer (adaptado de Hanahan, D. e Weinberg, R., 2011) ⁽²¹⁾	23
Figura 2 – Incidência do cancro da próstata no mundo (Globocan 2018, IARC) ⁽²²⁾ . ..	24
Figura 3 – Carcinogénese da próstata (adaptado de Shen MM e colaboradores, 2010) ⁽³⁶⁾ . ..	25
Figura 4 – Biogénese dos microRNAs (adaptado de Patrao AS e colaboradores, 2018) ⁽⁹¹⁾ . ..	35
Figura 5 – Imagem microscópica da linha celular (A) LNCaP adquirida pelo microscópio Olympus® IX51, (B) DU-145 (ATCC) e (C) PC-3 (ECACC). ..	44
Figura 6 – Níveis de expressão de mRNAs de EGFR, C-myc e FOS de acordo com o polimorfismo genético EGFR-216G>T.	53
Figura 7 – (A) Capacidade metabólica da linha celular LNCaP ^{+bic} . em diferentes períodos de tempo após exposição a diferentes concentrações de bicalutamida (média ± desvio padrão); (B) Níveis de mRNA de PSA nas diferentes linhas celulares analisadas no presente estudo (média ± erro da média).....	54
Figura 8 – Efeito da adição de bicalutamida em linhas diferentes celulares. (A) níveis de expressão de mRNA de EGFR ao final de 24 horas após adição de bicalutamida; (B) western-blot para os níveis de proteína de EGFR e pEGFR ao final de 24 horas após adição de bicalutamida; (C) capacidade metabólica das linhas celulares após exposição contínua à bicalutamida (média ± desvio padrão).	55
Figura 9 – Níveis de expressão de mRNA EGFR e dos genes induzíveis FOS e C-myc em linhas celulares expostas continuamente à bicalutamida: (A) níveis de expressão de mRNA de EGFR; (B) e (C) níveis de expressão de mRNAs de FOS e C-myc nas linhas celulares LNCaP e DU-145, respetivamente.....	56
Figura 10 - Níveis de expressão de mRNA: (A) EGFR e (B) genes induzíveis pelo EGFR após a adição de erlotinib na linha DU-145 ^{+bic}	57

Figura 11 – Efeito da dupla inibição do AR e do EGFR in vivo. (A) determinação do IC₅₀ relativo ao erlotinib nas linhas celulares LNCaP e DU-145^{+bic}. (média); (B) curva de crescimento tumoral nos murganhos submetidos a diferentes tratamentos (média ± desvio padrão); (C) níveis de expressão de mRNA de EGFR nos tecidos dos murganhos submetidos a diferentes tratamentos..... 58

Figura 12 – Níveis de expressão de mRNA: (A) mTOR e (B) HIF-2α nas linhas DU-145, DU-145^{+bic} e DU-145^{-bic}. 59

Figura 13 – Níveis de expressão de mRNA: (A) mTOR e (B) HIF-2α nos tecidos derivados de murganhos submetidos a diferentes tratamentos. 60

Figura 14 – Níveis de expressão de miRNAs: (A) miRNA-21; (B) miRNA-370 e (C) miRNA-223 nas linhas celulares LNCaP, DU-145^{+bic}. e DU-145^{-bic}. 61

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estratificação dos doentes com CaP de acordo com o risco que apresentam para a recorrência bioquímica (adaptado de Mottet N. e colaboradores, 2017) ⁽⁴²⁾	26
---	----

Abreviaturas

A

A - Adenina

ADT - *Androgen deprivation therapy*

aLHRH - Agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante

AKT - *Protein kinase B*

AR - Recetor de androgénios

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Trifosfato de adenosina

B

B2M - Beta-2- microglobulina

BSA – *Bovine serum albumin*

C

C - Citosina

CaP - Cancro de Próstata

cDNA - DNA complementar

CPRC - Cancro de próstata resistente à castração

CRPC - *Castration-resistant prostate cancer*

ECACC - *European Collection of Authenticated Cell Culture*

D

DHT - Di-hidrotestosterona

DLD - Domínio de ligação ao DNA

DLL - Domínio de ligação ao ligando

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

E

EAU - *European Association of Urology*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF - *Epidermal growth factor*

EGFR - *Epidermal growth factor receptor*

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase*

F

FBS - *Fetal bovine serum*

FSH - *Hormona foliculo estimulante*

G

G - *Guanina*

GUSB - *Beta glucuronidase*

H

HER - *Human epidermal growth receptor*

HIF - *Hypoxia - inducible factors*

HIF-2 α - *Hypoxia - inducible Factor 2*

I

IARC - *International Agency for Cancer Research*

ISUP - *International Society of Urological Pathology*

L

LH - *Hormona luteinizante*

LHRH - *Hormona libertadora da hormona luteinizante*

M

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

miRNA - *microRNA*

mRNA - *RNA mensageiro*

mTOR - *Mammalian target of rapamycin complex*

P

PC - *Prostate Cancer*

PCR - *Polymerase chain reaction*

pEGFR - *Forma fosforilada EGFR*

PIN - *Prostatic intraepithelial neoplasia*

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

Pré-miRNA - miRNA precursor

Pri-miRNA - miRNA primário

PSA - *Prostate specific antigen*

PTEN - *Protein phosphatase and tensin homolog*

PVDF - *Polyvinylidene difluoride*

R

RNA - *Ribonucleic acid*

RORENO - Registo Oncológico Regional do Norte

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

S

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SNP - *Single-nucleotide-polymorphism*

STR - *Short tandem repeat*

T

T - Timina

TBA - Terapia de bloqueio androgénico

TGFβ1 - Fator de crescimento de transformação beta 1

TBS-T - Tris-buffered saline (10X) com Tween20

W

WST-1 - *Water-soluble tetrazolium salt 1*

X

XPO5 - Proteína exportina nuclear

Resumo

O cancro de próstata (CaP) é o segundo cancro mais incidente e a quinta causa de morte por cancro no mundo. O tratamento para o CaP é baseado na estratificação dos doentes de acordo com o risco de recorrência bioquímica. Após recorrência, ou em doentes definidos como de alto risco, é usual a realização da terapia de bloqueio androgénico (TBA).

Durante o tratamento com TBA, é frequente que num reduzido espaço de tempo os doentes apresentarem progressão da doença desenvolvendo assim cancro de próstata resistente à castração (CPRC). O CPRC está associado a pior prognóstico, bem como a uma maior mortalidade e morbilidade, existindo limitadas estratégias terapêuticas. Atualmente, admite-se que durante o bloqueio do recetor de androgénios (AR), uma das abordagens realizadas no âmbito da TBA, possam ser também ser sobre-expressas outras vias de sinalização, de modo a compensar a pressão seletiva induzida no microambiente tumoral. Uma dessas vias de sinalização é a via *EGF/EGFR* que leva à ativação de diferentes cascatas de sinalização celular, como a *PI3K/AKT/mTOR* e a *MAPK/ERK*, modulando vários processos celulares, estando a sua sobre-expressão associada a pior prognóstico.

Atualmente, admite-se que a expressão do EGFR pode ser modulada genética e epigeneticamente. Deste modo, a ocorrência de polimorfismos genéticos funcionais do gene EGFR poderá condicionar a progressão tumoral e a aquisição de resistência à TBA por potenciarem a sobre-expressão deste recetor. Por outro lado, alterações no perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) em consequência da TBA poderão modular processos de regulação influenciando a expressão deste recetor. Assim, o estudo destas alterações durante o desenvolvimento de CPRC mostra particular interesse, elucidando a influência destas na aquisição de fenótipos de resistência bem como a sua influência na ativação de cascatas de sinalização proliferativas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da interação de vias de sinalização proliferativas no desenvolvimento de CPRC, de modo a definir potenciais novos alvos terapêuticos.

Considerando o potencial papel da via *EGF/EGFR* na aquisição de resistência à TBA analisou-se o efeito funcional do polimorfismo *EGFR-216G>T*, uma vez que previamente verificou-se que esta variação influencia o tempo até desenvolvimento de CRPC. Foi também avaliada a dinâmica das vias de sinalização ativadas pelo AR e EGFR em diferentes linhas celulares: LNCaP, PC-3, DU-145, e nas DU-145^{+bic}, LNCaP^{+bic}, resistentes à bicalutamida (estabelecidas durante o desenvolvimento do estudo), avaliando-se o perfil de transcrição (mRNAs e miRNAs) e a capacidade

metabólica. Adicionalmente, foram realizados estudos *in vivo* de modo a se compreender o benefício da dupla inibição do AR e do EGFR.

No presente estudo observou-se que o polimorfismo genético *EGFR-216G>T* apresenta um efeito funcional, sendo que indivíduos homocigóticos *EGFR-216TT* apresentam maiores níveis de expressão de mRNA de *EGFR*, assim como dos níveis de mRNAs de *FOS* e *C-myc*. Para além disso, verificou-se que a exposição aguda à bicalutamida na linha celular LNCaP aumentou os níveis de mRNA de *EGFR*, bem como os níveis de proteína de EGFR e pEGFR. Similarmente, a adição contínua de bicalutamida na linha LNCaP (LNCaP^{+bic}) diminuiu os níveis de mRNA *PSA* e aumentou a capacidade metabólica destas células. Na linha celular DU-145^{+bic}, observou-se também um aumento da capacidade metabólica sendo este acompanhado por um aumento da expressão de mRNA do *EGFR*, bem como dos mRNAs de genes induzíveis, *FOS* e *C-myc*. Adicionalmente, verificou-se que a adição de bicalutamida resultou num aumento dos níveis de mRNA de *mTOR* e *HIF-2α* assim como num aumento dos níveis do miRNA-21. Relativamente aos estudos *in vivo*, observou-se que a dupla inibição com bicalutamida e erlotinib é capaz de reduzir para metade o volume tumoral.

Em conclusão, a inibição contínua da via de sinalização do AR leva à sobre-expressão de outras vias proliferativas, como a via *EGF/EGFR*. Adicionalmente, observamos que doentes homocigóticos *EGFR-216GT/TT* apresentam maiores níveis *EGFR*, o que lhes poderá potenciar uma progressão tumoral acelerada. Deste modo, este subgrupo de doentes apresentará um maior benefício quando submetidos a uma terapêutica dirigida anti-EGFR. Contudo, o bloqueio do AR influencia também a ativação de *targets* adicionais, o que revela a complexidade do mecanismo molecular envolvido na aquisição de resistência. Cumulativamente, a modificação do perfil de miRNAs observada em consequência da dinâmica estabelecida entre o AR e EGFR poderá revelar potenciais novos biomarcadores úteis na monitorização dos doentes.

Abstract

Prostate cancer (PC) is the second most incident and the fifth leading cause of cancer death in the world. Treatment for PC is based on patient stratification according to the risk of developing biochemical recurrence. After recurrence or in high-risk patients, androgen deprivation therapy (ADT) is a common therapeutic strategy.

During treatment with ADT, patients usually show disease progression in a short period of time, developing castration-resistant prostate cancer (CRPC). CRPC is associated with a worse prognosis, as well as with a higher mortality and morbidity and there are limited therapeutic approaches for this stage of disease. Nowadays, it is accepted that during androgen receptor (AR) blockage, which is one of the approaches carried out by ADT, other signaling pathways may be overexpressed in order to compensate the selective pressure induced on the tumoral microenvironment. One of these pathways is the *EGF/EGFR* signaling pathway, which leads to the activation of different cell signaling cascades, such as *PI3K/AKT/mTOR* and *MAPK/ERK*, modulating several cellular processes, having their overexpression been associated with a worse prognosis.

Currently, it is known that *EGFR* expression can be genetically or epigenetically modulated. Hence, the occurrence of functional genetic polymorphisms of the *EGFR* gene may condition tumor progression and the acquisition of resistance to ADT by potentiating the overexpression of this receptor. On the other hand, changes in the expression profile of microRNAs (miRNAs) as a result of ADT may modulate regulatory processes influencing the expression of this receptor. Thus, the study of these changes during the development of CRPC is of particular interest since it can elucidate their influence on the acquisition of resistance phenotypes as well as their influence on the activation of proliferative signaling cascades. Therefore, the present study aimed to assess the effect of the interaction of proliferative signaling pathways on the development of CRPC, in order to define potential new therapeutic targets.

Considering the potential role of the *EGF/EGFR* pathway in the acquisition of resistance to ADT, the functional effect of the *EGFR-216G>T* polymorphism was evaluated, since it was previously verified that this variation influences the time until development of CRPC. The dynamics of the signaling pathways activated by AR and EGFR were also evaluated in different cell lines: LNCaP, PC-3, DU-145, and in DU-145^{+bic.}, LNCaP^{+bic.} which were resistant to bicalutamide (established during the development of the study). In these, the transcription profile (mRNAs and miRNAs) and metabolic capacity were evaluated. In addition, *in vivo* studies were performed in order to understand the benefit of the double inhibition of AR and EGFR.

In the present study, it was observed that the *EGFR-216G>T* genetic polymorphism shows a functional effect, since *EGFR-216TT* homozygous individuals display higher levels of *EGFR*'s mRNA expression, as well as *FOS* and *C-myc*. Furthermore, the acute exposure to bicalutamide in the LNCaP cell line lead to an increase of *EGFR*'s mRNA levels, as well as EGFR and pEGFR protein levels. Similarly, the continuous addition of bicalutamide in the LNCaP line (LNCaP^{+bic.}) decreased the *PSA*'s mRNA and increased the metabolic capacity of cells. In the DU-145^{+bic.} cell line, an increase in metabolic capacity was also observed, along with an increase in the expression of *EGFR*'s mRNA, as well as the mRNAs of inducible genes *FOS* and *C-myc*. In addition, it was observed that the addition of bicalutamide resulted in an increase in *mTOR* and *HIF-2 α* mRNA's levels as well as an increase in miRNA-21's levels. Regarding the *in vivo* studies, it was observed that the double inhibition with both bicalutamide and erlotinib was able to decrease the tumor volume to half.

In conclusion, the continuous inhibition of the AR signaling pathway leads to the overexpression of other proliferative pathways, such as the *EGF/EGFR* pathway. In addition, we observed that homozygous *EGFR-216GT/TT* patients present higher *EGFR* levels, which may promote their accelerated tumor progression. Thus, this subgroup of patients may have a greater benefit when undergoing anti-EGFR targeted therapy. However, the blockage of the AR also influences the activation of additional targets, revealing the complexity of the molecular mechanisms involved in the acquisition of resistance. Cumulatively, the modification of the miRNAs profile observed as a result of the dynamics established between AR and EGFR may reveal potential new biomarkers which can be useful in patients' monitorization.

Introdução

1. Introdução

1.1. Cancro: Conceitos Gerais

O cancro é um importante problema de saúde pública sendo uma das principais causas de morte a nível mundial (1). De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência de cancro irá aumentar, sendo estimada a ocorrência de 29,5 milhões de casos de cancro em 2040, comparativamente aos 18,1 milhões de casos registados em 2018 (2). Em Portugal, estima-se a ocorrência de 58 199 novos casos de cancro em 2018, contabilizando-se 28 960 de mortes no mesmo ano (3, 4). Segundo os dados do Registo Oncológico Regional do Norte publicados em 2010, o cancro mais incidente no homem é o da próstata seguido pelo do pulmão e colorretal. Já no género feminino, o cancro mais incidente é o cancro de mama seguido pelo colorretal e o da tiróide (5). Vários fatores são apontados como responsáveis por este aumento acentuado da incidência de cancro a nível global, destacando-se o aumento da população e da esperança média de vida, assim como vários comportamentos e estilos de vida, como o tabagismo, hábitos de vida sedentários e uma dieta pouco saudável (6, 7).

O cancro é uma doença heterogénea que se caracteriza pelo crescimento anormal de células alteradas (7). Sendo uma doença genética, o desenvolvimento do cancro é originado por uma acumulação de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem nas células (8). A maioria destas alterações carecem de relevância funcional, contudo a sua acumulação é considerada fator determinante para o desenvolvimento de cancro (8). As alterações genéticas que contribuem funcionalmente para o surgimento e progressão do cancro denominam-se alterações oncogénicas. Estas estão intimamente envolvidas no crescimento celular, promovendo a divisão celular descontrolada e induzindo perda de senescência, uma vez que alteram passos fundamentais no ciclo celular, permitindo uma ativação constante de vias de sinalização que contribuem para a proliferação celular (9).

A dinâmica de interações entre fatores genéticos e o ambiente envolvente desencadeia um processo multifatorial e multifásico que originará a formação de uma neoplasia - carcinogénese. Este processo pode ser dividido em três principais fases : a iniciação, a promoção e a progressão (10). A fase de iniciação caracteriza-se pelo surgimento de alterações no DNA (*deoxyribonucleic acid*: DNA) causadas por agentes químicos, físicos ou biológicos (vírus e/ ou bactérias), ou durante o processo normal de divisão celular (10, 11). A fase de promoção consiste na expansão das células que passaram pela fase de iniciação, sendo um processo que promove o crescimento e favorece a expansão de células com maior vantagens adaptativas (10, 12). Deste

modo, a evolução tumoral inicia-se quando uma única célula presente num tecido normal se transforma e prolifera, originando uma massa tumoral (13). A proliferação dos subclones que apresentam maiores vantagens adaptativas origina uma colônia heterogênea de células com fenótipos variáveis que podem adquirir um potencial mais agressivo conforme a ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas adicionais (11). A neoplasia não é composta exclusivamente pelos clones com maior vantagem adaptativa, mas também por numerosos tipos celulares normais, tais como macrófagos e células endoteliais, que constituem o microambiente tumoral (14). Durante o processo de carcinogênese, o microambiente tumoral também é alterado e moldado pelo tumor promovendo, o estabelecimento de um microambiente favorável ao desenvolvimento e à progressão neoplásica (15).

Existem duas principais classes de genes implicados no desenvolvimento de cancro: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes, em condições normais, promovem a divisão celular (16). Em condições de neoplasia, os proto-oncogenes sofrem alterações somáticas, podendo ser mutações, amplificações ou translocações, dando origem a oncogenes que promovem uma excessiva proliferação celular (17). Os oncogenes codificam fatores de transcrição, proteínas envolvidas na sobrevivência e crescimento celular bem como proteínas envolvidas na apoptose. Alterações nesses genes são consideradas dominantes, pois a alteração de apenas um alelo pode levar à transformação celular (11). Por sua vez, os genes supressores tumorais codificam proteínas que regulam negativamente a proliferação celular (11). Os genes supressores tumorais desempenham um papel fundamental em células normais uma vez que estes genes controlam a entrada das células no ciclo celular, promovendo, por exemplo, a correção de erros na fase de replicação do DNA (18, 19). Assim, alterações nesta classe de genes, como o gene *PTEN* (*phosphatase tensin homolog*), normalmente implicam perda da função que em condições normais iria prevenir a proliferação celular descontrolada, a promoção da reparação do DNA e a ativação de *checkpoints* do ciclo celular (16). Em genes supressores tumorais, é necessário que ambos os alelos sofram alterações para se verificarem alterações da expressão do gene (17).

Durante o processo de carcinogênese, as células tumorais adquirem diversas características que irão alterar a fisiologia celular e por sua vez determinar um fenótipo de malignidade, dando-lhes vantagens sobre as células normais (11, 20, 21). Hanahan e Weinberg sugeriram que, recorrendo a várias estratégias, as células neoplásicas adquirem um conjunto de capacidades funcionais durante o desenvolvimento da neoplasia. Essas características, conhecidas como *Hallmarks of Cancer*, compreendem a capacidade das células neoplásicas terem autossuficiência de fatores

de crescimento, potencial replicativo ilimitado, evasão à apoptose, capacidade de evitar a ação de supressores de crescimento, indução de angiogénese e capacidade de invasão local e formação de metástases (20). Recentemente, Hanahan e Weinberg propuseram novos *Hallmarks* tendo em conta o importante papel do microambiente tumoral para a progressão do cancro: a capacidade das células neoplásicas evitarem a sua destruição pelo sistema imune, a desregulação do metabolismo celular, a promoção da inflamação e a instabilidade genética que irá promover o desenvolvimento tumoral (Figura 1) (21).



Figura 1 – *Hallmarks of Cancer* (adaptado de Hanahan, D. e Weinberg, R., 2011) (21).

Embora nas últimas décadas tenham sido significativos os avanços na compreensão da biologia molecular do cancro, esta doença continua a estar associada a elevadas taxas de incidência e mortalidade no mundo. Este facto fundamenta a necessidade de se aprofundar a investigação na área da oncologia, permitindo não só melhorar o conhecimento dos processos moleculares inerentes à carcinogénese, como também contribuir para o desenvolvimento de novos esquemas de tratamento.

1.2. Cancro da Próstata

O cancro da próstata (CaP) é o segundo cancro mais incidente a nível mundial no homem e a quinta causa de morte relacionada com cancro no mundo, tendo-se registado 358 989 mortes em 2018 associadas a este tipo de cancro (Figura 2) (6, 22, 23). Na Europa, o CaP é o segundo cancro mais incidente e a quarta causa de morte no homem (24). De acordo com os dados da RORENO (Registo Oncológico Regional do Norte), em Portugal observa-se a mesma tendência, sendo que o CaP é o cancro mais incidente no homem (25).

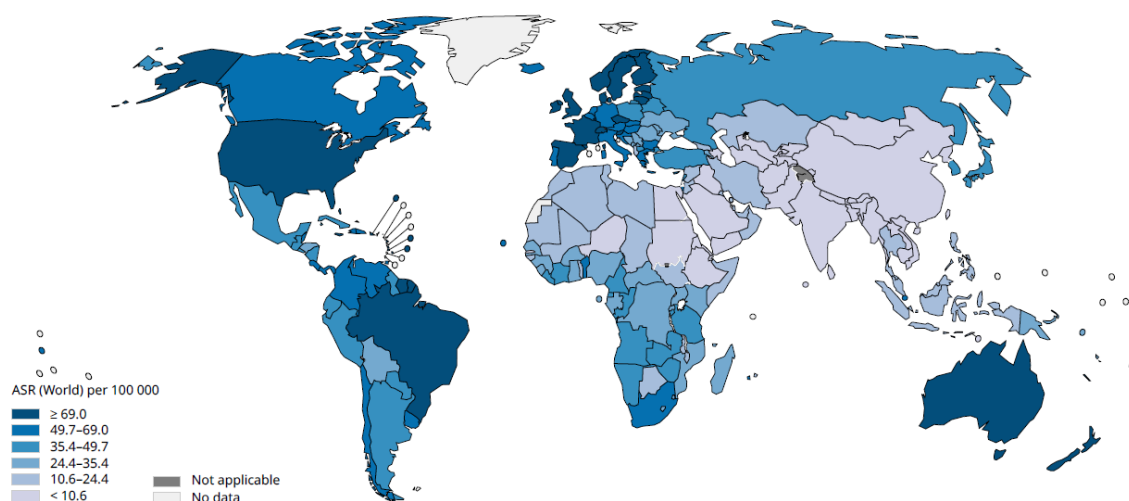


Figura 2 – Incidência do cancro da próstata no mundo (Globocan 2018, IARC) (22).

As taxas de incidência de CaP são muito variáveis observando-se as mais altas taxas no Norte e Oeste da Europa (6). De acordo com a literatura, esta maior incidência parece estar associado ao uso generalizado do teste do doseamento do antígeno específico da próstata (*prostate specific antigen: PSA*) como método de *screening* bem como a predominância de uma população mais envelhecida (26, 27).

O uso generalizado deste biomarcador poderá estar a contribuir para um sobrediagnóstico e sobretratamento de casos indolentes, levando a um aumento do número de casos tratados (28). Os resultados anormais do exame do toque retal associado ao doseamento dos níveis de PSA com valores elevados levam à suspeita de CaP. Contudo, o diagnóstico só é estabelecido após confirmação histopatológica de amostras de tecido colhidas por biópsia (27, 29, 30).

A etiologia do CaP ainda não é completamente conhecida. Sabe-se que a história familiar da doença e a etnia estão associadas a um aumento do risco de CaP,

sugerindo predisposição genética para o desenvolvimento da doença. No entanto, apenas 9% dos doentes com CaP apresentam predisposição genética (27, 31). Vários são os outros fatores de risco implicados no desenvolvimento de CaP, sendo o principal a idade avançada. É importante referir que a obesidade está associada a um aumento do risco de CaP com fenótipo mais agressivo e, por outro lado, a atividade física está associada a um risco diminuído para desenvolver CaP (7, 32). Bono e colaboradores reportaram que o microbioma gastrointestinal alterado e inflamações intra-prostáticas são igualmente fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasia uma vez que o recrutamento de células inflamatórias pode promover danos na dupla cadeia do DNA (33).

A transformação neoplásica da próstata é um processo multifásico iniciando-se como neoplasia prostática intraepitelial (*prostatic intraepithelial neoplasia: PIN*), que é caracterizada pela proliferação de células da camada luminal com displasia ao longo dos ductos. Esta é seguida da neoplasia da próstata localizada que por sua vez poderá progredir para adenocarcinoma prostático avançado com invasão local à medida que a camada basal das células é degradada e as células neoplásicas invadem a lâmina basal. Este processo pode culminar em desenvolvimento de CaP metastático, sendo o osso o local mais comum de ocorrência de metastização (Figura 3) (34, 35).

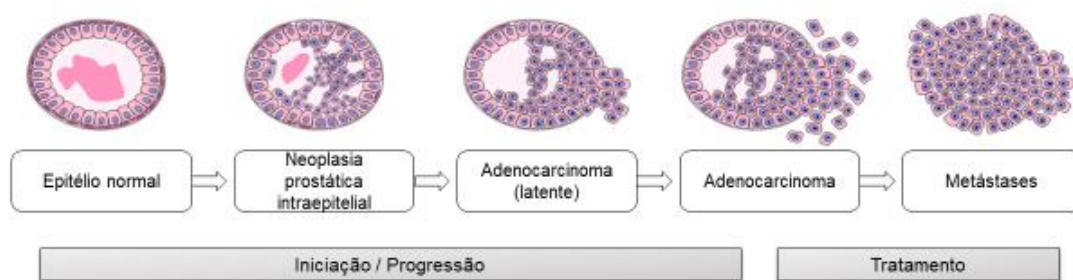


Figura 3 – Carcinogênese da próstata (adaptado de Shen MM e colaboradores, 2010) ⁽³⁶⁾.

Por ser muito heterogêneo e apresentar um comportamento variável, o CaP representa um enorme desafio na prática clínica. Assim, os níveis séricos de PSA, a estratificação de Gleason bem como a mais atual estratificação da *International Society of Urological Pathology* (ISUP) revelam-se fatores chave para a orientação terapêutica (27, 30).

A classificação de Gleason é um sistema de classificação usado para determinar a agressividade do CaP de acordo com as características histopatológicas do tecido. Baseada na aparência celular, esta classificação varia de 1 a 5, sendo

Gleason grau 1 a forma que tem uma apresentação bem diferenciada e que apresenta um prognóstico mais favorável, e Gleason grau 5 a forma mais indiferenciada e que está correlacionada com um pior prognóstico (30, 36). Uma vez que os adenocarcinomas da próstata podem apresentar mais do que um padrão de Gleason devido à heterogeneidade intratumoral, criou-se a pontuação de Gleason, que consiste na soma de dois graus de Gleason e tem como objetivo a melhor compreensão do comportamento biológico do CaP (36).

Nos últimos anos, a ISUP trouxe mudanças significativas à classificação de Gleason permitindo uma estratificação mais precisa de um subconjunto clinicamente heterogéneo de doentes incluídos no grupo de risco intermédio. A adoção do atual sistema de classificação ISUP, definindo a divisão dos cancros de pontuação de Gleason 7 em ISUP grau 2 e ISUP 3, devido ao seu impacto prognóstico distinto reforça essa separação do grupo de risco intermédio em um grupo de risco intermédio favorável e risco intermédio desfavorável (27, 37, 38). Dados clínicos apoiam esta distinção entre diferentes categorias de doentes com risco favorável e desfavorável dentro do grupo de risco intermédio uma vez que o CaP de risco intermediário apresenta um comportamento heterogéneo, apresentando diferenças no prognóstico favorecendo a utilização de diferentes abordagens terapêuticas nos doentes com CaP de acordo com o grupo de risco que se encontram (27, 39-41).

De acordo com as *guidelines* europeias da EAU (*European Association of Urology: EAU*), a classificação dos doentes de acordo com o risco que apresentam para recorrência bioquímica baseia-se no grau de Gleason e no grau de ISUP, baseando-se também nos níveis de PSA e no sistema de estadiamento TNM (42). O sistema de estadiamento TNM tem por base no tumor primário (T), o envolvimento de nódulos linfáticos (N) e a presença de metástases (M) (42) (Tabela 1).

Tabela 1 – Estratificação dos doentes com CaP de acordo com o risco que apresentam para a recorrência bioquímica (adaptado de Mottet N. e colaboradores, 2017) (42).

Localizado			Localmente avançado
Baixo risco	Risco intermédio	Alto risco	Alto risco
- PSA < 10 ng/mL	- PSA 10 – 20 ng/mL	- PSA > 20 ng/mL	- Qualquer PSA
- Pontuação de Gleason < 7	- Pontuação de Gleason 7	- Pontuação de Gleason > 7	- Qualquer pontuação de Gleason
- ISUP grau 1	- ISUP grau 2/3	- ISUP grau 4/5	- Qualquer grau ISUP
- T1-2a	- T2b	- T2c	- T3-4 ou N+

Atualmente existem diferentes abordagens de tratamento para homens com CaP (27). Segundo a EAU, muitos homens diagnosticados com CaP podem não beneficiar de tratamentos mais invasivos por apresentarem um CaP com um comportamento indolente (27). Desta forma, para evitar tratamentos invasivos, são indicadas duas estratégias: vigilância ativa e espera vigilante (27, 30). Para o tratamento de CaP localizado, são várias as opções terapêuticas com intuito curativo, incluindo cirurgia (prostatectomia radical), radioterapia (externa ou braquiterapia) e criocirurgia (43). No entanto, 20 a 30% dos doentes diagnosticados com CaP localizado irão desenvolver metástases. Para além disso, existe um grupo de doentes que já apresentam metástases no momento do diagnóstico (44, 45). Para os doentes com CaP que exibem recorrência bioquímica após o tratamento primário, ou os doentes de alto risco, a terapia de bloqueio androgénico (TBA) é a abordagem terapêutica mais comum (27).

A TBA tem por objetivo bloquear a produção ou impedir a ação dos androgénios impossibilitando a sua ligação com o recetor de androgénios (*androgen receptor*: AR) tendo em vista o bloqueio da via de sinalização dos androgénios, já que o CaP apresenta uma dependência de androgénios para a sua proliferação (46, 47). Atualmente, admite-se que o AR desempenha um papel fundamental não só no desenvolvimento, mas também na progressão de CaP, podendo ser a reativação da via de sinalização dos androgénios considerada como um dos mecanismos de progressão do cancro de próstata resistente à castração (CPRC) (48). Assim, a TBA compreende agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (aLHRH), antagonistas da LHRH e anti-androgénios. Os aLHRH atuam ao nível da hipófise suprimindo a produção da hormona luteinizante (LH) bem como da hormona folículo-estimulante (FSH) levando ao bloqueio da produção de testosterona (27). Os antagonistas da LHRH, menos usados, ligam-se imediatamente aos recetores LHRH provocando uma diminuição nos níveis de LH, FSH e testosterona (27). Já os anti-androgénios competem com o androgénio para a ligação ao AR inibindo desta forma o crescimento das células neoplásicas e induzindo a apoptose (27, 47). A bicalutamida é um anti-androgénio não-esteróide que é amplamente utilizado na TBA, uma vez que demonstrou ter menos efeitos adversos comparativamente a outras classes de fármacos usados na TBA particularmente ao nível da proteção óssea (49). O tratamento com bicalutamida em CaP localizado demonstrou um benefício significativo no tempo até à progressão (50).

No entanto, e apesar de os doentes submetidos a TBA demonstrarem remissão radiológica, clínica e biológica, a maioria deles deixa de responder num curto período de tempo, compreendido entre 18 a 36 meses, progredindo para um estado de cancro

de próstata resistente à castração (CPRC), que está associado a limitadas opções terapêuticas (45, 51).

1.2.1. Cancro da próstata resistente à castração: mecanismos moleculares associados

De acordo com a literatura, existem vários mecanismos de resistência envolvidos na progressão do CaP e estes variam não só entre doentes, mas, devido à heterogeneidade intratumoral e à evolução da doença induzida pela pressão seletiva do tratamento, podem observar-se mecanismos diferentes no mesmo doente (38). Admite-se que as células neoplásicas desenvolvam várias estratégias de forma a escapar à apoptose induzida pela TBA e muitos desses modelos propostos para aquisição de um fenótipo de resistência consistem em adaptações funcionais do AR e de interação deste com outras vias de sinalização celular (52-56).

O AR tem um papel preponderante na organogénese masculina, sendo necessário para a diferenciação e crescimento e exercendo uma função regulatória indispensável no desenvolvimento da próstata e na manutenção da sua normal fisiologia (47, 54). Este recetor controla a transcrição de um painel de genes implicados no crescimento das células da próstata, podendo a sua sobre-expressão promover a proliferação de CaP e a formação de metástases (49). O gene que o codifica encontra-se localizado no cromossoma X e este recetor nuclear pertence à família de recetores de hormonas esteroides (47, 52). O AR compreende quatro domínios funcionais diferentes: o domínio amino-terminal, o domínio de ligação ao DNA (DLD), a região *hinge* e o domínio de ligação ao ligando (DLL), sendo os seus ligandos a di-hidrotestosterona (DHT) e a testosterona (52, 57). Na ausência da ligação do ligando, quando este não se encontra ativo, o AR encontra-se no citoplasma associado a proteínas do citoesqueleto, *heat-shock proteins* e a chaperonas.

Segundo o modelo canónico da ativação da via de sinalização do AR, assim que ocorre a ligação do ligando, o AR sofre alterações conformacionais que causam a dissociação dos complexos associados ao AR, dimerização e a sua fosforilação permitindo a sua translocação para o núcleo, onde se liga aos elementos responsivos ao androgénio e inicia a transcrição (52, 57, 58). Muitas das respostas celulares aos androgénios não se enquadram no modelo de ativação canónico e não requerem transcrição mediada pelo AR (57). Neste caso de sinalização, denominada *non-genomic signaling*, o AR é capaz de se associar a substratos moleculares presentes

no citoplasma e na membrana celular de modo a ativar cascatas de cinases intracelulares, tal como a cascata de sinalização *MAPK/ERK* (59). Essas ações levam a um aumento da proliferação e da sobrevivência celular por meio de rápida transdução do sinal (57, 59, 60).

Existem diversos mecanismos de aquisição de resistência à TBA e consequente progressão do CaP dependentes do AR, nomeadamente a amplificação ou mutações do gene, desregulação da expressão dos seus complexos regulatórios, variantes de *splicing* alternativas do gene e ativação por parte de fatores de crescimento ou citoquinas (51, 52, 54, 61).

A amplificação do gene AR é uma das alterações genéticas mais comumente observada, ocorrendo em mais de 80% dos casos de CPRC (52). Esta amplificação permite que a via do AR seja ativada na presença de baixos níveis de androgénios sendo, portanto, uma via de resistência conhecida como via da hipersensibilidade (52, 53). Não são somente a amplificação do gene e a expressão elevada de mRNA que aumentam os níveis da proteína AR, mas o aumento do tempo de semi-vida da proteína contribui para os níveis elevados de AR observados em CPRC. Através da amplificação génica e da atividade transcripcional aumentada é assegurada a sobre-expressão do AR o que induz a sua hipersensibilidade a baixos níveis de androgénio, podendo assim as células neoplásicas proliferarem mesmo com baixas concentrações de androgénios. (52, 53).

Por outro lado, apesar de raras numa fase inicial de CaP, as mutações no gene do *AR* são comuns no CPRC e podem levar à ocorrência de uma menor especificidade do AR ao ligando - um mecanismo de resistência também chamado por via da promiscuidade (52, 53). As ocorrências de mutações resultam num aumento da atividade do AR na presença de baixos níveis de androgénios e podem diminuir a especificidade do AR ao ligando, o que faz com que a via seja ativada na presença de outros esteroides não-androgénicos (52). Mutações no *AR* têm ainda a capacidade de transformar os antagonistas do recetor em potenciais agonistas aumentando a atividade da via (53, 54).

O recrutamento de vários complexos co-regulatórios por parte do AR pode aumentar (co-ativadores) ou reprimir (co-repressores) a sua atividade transcripcional (55). No CPRC sabe-se que os co-repressores do AR se encontram em níveis reduzidos (55). Quando o recetor de androgénios interatua com co-ativadores verifica-se uma ativação anormal do AR o que irá resultar numa atividade transcripcional aumentada (55). Os co-ativadores favorecem a atividade do AR uma vez que melhoram a sua capacidade de se ligar ao androgénio, mantendo o AR numa conformação com alta estabilidade para o ligando, promovendo a atividade

transcricional e conseqüentemente o crescimento celular, bem como aumentam a sensibilidade do AR para ligandos alternativos na ausência de androgénios (55).

Variantes de *splicing* alternativos do gene do AR também demonstram desempenhar um papel importante não só na aquisição de resistência à TBA como também na progressão para CPRC (61). As variantes do recetor de androgénio (AR-V) são formas truncadas do AR que perdem o DLL sendo, portanto, formas do AR transcricionalmente ativadas independentemente da presença ou ausência da ligação com o ligando ou do efeito de antagonistas (61). AR-V7 é a variante mais frequente e abundante em CPRC e está associada a maior malignidade e sobrevivência reduzida (53).

A ativação do AR por fatores de crescimento ou citocinas, na ausência de androgénios, também está implicada na aquisição de resistência, uma vez que são ativadas vias de sinalização celulares que limitam a apoptose e facilitam o crescimento celular (52). São exemplos disso a perda do gene supressor tumoral *PTEN* que está associado ao crescimento celular bem como com a progressão para CPRC e a via de sinalização *NF-kB* que se encontra constitutivamente ativa no CaP e no CPRC (52).

No entanto, mesmo em linhas celulares em que o estado do AR é pouco consensual, esta via ainda demonstra ter importância na proliferação celular. Vários estudos foram realizados com o propósito de clarificar o papel do AR em CPRC utilizando diferentes linhas celulares de CaP com diferentes níveis de dependência de androgénios (62, 63). As linhas PC-3 e DU-145 são consideradas linhas com pouca dependência de androgénios. No entanto, estudos demonstram que estas linhas expressam níveis detetáveis de mRNA e de proteína de AR que aumentam após o tratamento com DHT (62, 64). Por sua vez, Vicentini e colaboradores, recorrendo a várias linhas celulares de CaP, como LNCaP, PC-3 e DU-145, demonstraram que a bicalutamida apresentou a capacidade de inibir a proliferação celular quer em células que expressam o AR, quer em células que demonstram baixa dependência de androgénios (53). Também Koukourakis e colaboradores, recorrendo às linhas celulares LNCaP, DU-145 e PC-3, verificaram que tanto um novo anti-androgénio em estudo bem como a bicalutamida suprimiram o crescimento celular de todas as linhas celulares usadas, o que poderá indicar a existência de vias de proliferação alternativas que ignorem a via do recetor de androgénios (54).

Outro mecanismo proposto para a aquisição de um fenótipo de resistência à TBA consiste na produção persistente de androgénios (43, 46). Os níveis intratumorais de androgénios presentes no microambiente demonstram ser suficientes para manter a via de sinalização pelo AR, sugerindo que existam locais alternativos para a produção de androgénios como é o exemplo da glândula suprarrenal. Estes

percursores androgénicos, uma vez que são sintetizados pelas glândulas suprarrenais, não são afetados pela TBA. A passagem para um estado de resistência à castração envolve a sobre-regulação de várias enzimas esteroides o que leva a uma maior produção de androgénios intratumorais (43, 46).

Para além disso, a sobre-expressão de recetores e fatores de crescimento, alterações oncogénicas ou a inativação de genes supressores tumorais estão implicados no desenvolvimento e aquisição de um fenótipo de resistência, igualmente alterações em vias de sinalização intracelulares estão envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de CaP (51). No CaP observam-se níveis anormais de fatores de crescimento no tecido tumoral, não secretados pelas células neoplásicas, mas também por células presentes no microambiente tumoral, de que são exemplo os fibroblastos, células estromais e constituintes da matriz extracelular (50).

Deste modo, outras vias de sinalização poderão ser ativadas, levando à progressão de doença para CPRC (54).

Alterações na via *PI3K/Akt/mTOR*, incluindo alterações de *copy number*, mutações e expressão alterada de vários componentes desta via, são relatadas em 42% dos tumores da próstata primários e em 100% dos tumores metastáticos (65). Estas alterações levam a um aumento da atividade desta via, que por sua vez está implicada na tumorigénese, na resistência às terapias e na progressão para doença metastática (66, 67). A perda do gene supressor tumoral *PTEN*, um regulador negativo desta via, é normalmente encontrada em doentes com CaP metastático (43). O *mTOR* é um efetor *downstream* da via de sinalização *PI3K/AKT* que pode ser ativado por alterações genéticas, como por exemplo a perda de função do *PTEN*, que permite a ativação do *PI3K* e, que por sua vez regula positivamente a ativação do *AKT* e consequentemente do *mTOR* (56). Para além disso, também já se encontra descrito na literatura que a expressão dos fatores induzíveis de hipóxia (*HIF: Hypoxia-inducible factors*) é dependente da expressão de *mTOR* (68). Os *HIF* são compostos por uma subunidade α (*HIF-1 α* , *HIF-2 α* e *HIF-3 α*) e por uma subunidade β (*HIF-1 β*) (68). De facto, a sobre-expressão destas vias desempenha um papel importante na tumorigénese uma vez que estão envolvidas em diferentes processos celulares como a angiogénese, proliferação celular, formação de metástases e aquisição de resistência às terapias (69).

Deste modo, a implementação de novos esquemas terapêuticos recorrendo a terapias dirigidas ao *mTOR*, poderão ser uma mais valia para doentes com CPRC. Atualmente, já existem vários estudos que tentam elucidar o efeito de inibidores do *mTOR* em combinação com a TBA em doentes com CaP, tendo esta dupla inibição diminuído a capacidade proliferativa das células tumorais (70-73).

Do mesmo modo, a ativação da via do recetor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*: EGFR) demonstra ser uma importante via de sinalização oncogénica, envolvida na diferenciação e proliferação celular (74). A expressão de mRNA de *EGFR* é baixa em tecidos de próstata normal, contudo este recetor é altamente expresso em tecidos de CaP primários e metastáticos (60). Estudos em CaP demonstram que a sobre-expressão e ativação da via do *EGFR* está implicada no desenvolvimento da doença bem como na progressão para CPRC, estando esta via frequentemente aumentada em estadios avançados da doença, quer pelo aumento da expressão deste recetor quer pelo aumento dos seus ligandos (66, 75-78). Muga e colaboradores verificaram que um aumento da expressão de *EGFR* em CaP, estando este aumento associado a fatores de pior prognóstico, uma maior pontuação de Gleason e à progressão para CPRC (79). Estudos anteriormente realizados no nosso grupo demonstraram que diferentes níveis dos ligandos do EGFR podem influenciar a resposta à TBA, originando a hipótese de que a modulação da via *EGF/EGFR* poderia afetar o desenvolvimento de CPRC (76, 77).

1.3. Modulação da via de sinalização do EGFR e progressão para CaP

O EGFR é uma glicoproteína transmembranar que pertence à família de recetores ErbB da qual fazem parte os recetores EGFR, HER2, HER3 e HER4 (52). A ativação do EGFR é induzida por ligando o que leva à dimerização do recetor, sendo conhecidos vários ligandos capazes de o ativar, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o *transforming growth factor alpha* (TGF- α), a epiregulina (EPR) entre outros (52).

A ativação do EGFR induz a ativação de várias cascatas de sinalização intracelulares que incluem as vias *KRAS-BRAF-MEK/ERK*, *PI3K/AKT/mTOR*, *STAT* e *fosfolipase C gama* (52). Estas vias de sinalização intracelulares modulam a transcrição genética estimulando a proliferação celular, angiogénese, migração e a inibição da apoptose, processos celulares frequentemente desregulados em contexto de malignidade (52, 57).

Para além do CaP, o EGFR demonstra estar sobre-expresso noutros modelos tumorais, como por exemplo em cancro da mama e cancro do pulmão (58). Assim, o bloqueio do *EGFR*, dada a importância desta via proliferativa, é uma estratégia terapêutica usada em vários tipos de tumores sólidos (80). Das terapêuticas usadas para o bloqueio deste recetor fazem parte anticorpos monoclonais, de que é exemplo o cetuximab, e também os inibidores de tirosina-cinase, de que é exemplo o erlotinib

(58). No entanto, ainda não faz parte da prática clínica o uso destas terapias anti-EGFR em doentes com CPRC, o que evidencia a necessidade de estudar o impacto de terapias direcionadas ao EGFR, como por exemplo o erlotinib, no tratamento de CPRC (81).

A expressão de EGFR pode ser modulada genética ou epigeneticamente, pela ocorrência de polimorfismos genéticos ou pela modificação do padrão de expressão de microRNAs (miRNAs), respetivamente (76, 77, 82). A compreensão dos mecanismos que levam a uma expressão alterada desta via poderá auxiliar a clarificar o processo molecular associado a um fenótipo de maior malignidade bem como o processo que culmina na aquisição de resistência à TBA.

No contexto da Oncologia, os biomarcadores, genéticos e/ou epigenéticos, são importantes na prática clínica dado que auxiliam no diagnóstico precoce da neoplasia, na estratificação do risco de recorrência e na monitorização da resposta às terapias e consequentemente da progressão da doença (83-85).

Os polimorfismos genéticos são variações no DNA cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1% da população (84, 86). Os polimorfismos mais frequentes no genoma são os *single nucleotide polymorphisms* (SNP) que consistem na alteração de uma única base e admite-se a sua ocorrência a cada 600pb (84). São a maior fonte de variabilidade individual e, dependendo da sua localização, têm efeitos biológicos distintos (84). Assim, os SNPs podem ser silenciosos, não causando qualquer alteração na proteína, ou podem ser responsáveis por mudança de aminoácidos e levar a alterações estruturais e funcionais. Quando estes se encontram localizados em regiões promotoras de genes podem influenciar a ligação de fatores de transcrição, podendo aumentar ou diminuir a ligação destes (84, 87). Uma vez que os SNPs podem levar a alterações da expressão génica, estes podem ser correlacionados com o risco de cancro (88).

A utilização de SNPs como biomarcadores moleculares, revela-se uma estratégia útil na definição de grupos de risco para o desenvolvimento de cancro, bem como na definição de grupos de risco que irão apresentar diferentes respostas à terapia (84). Os SNPs podem ser igualmente preditivos do *outcome* clínico dado que determinados SNPs são marcadores de bom ou mau prognóstico, podendo ser usados como preditivos da resposta ao tratamento, permitindo uma orientação do tratamento mais personalizada (84, 86).

O gene do *EGFR* é altamente polimórfico, podendo a sua expressão ser modulada por SNPs na região promotora deste gene (89). Estudos anteriormente realizados no nosso grupo identificaram o polimorfismo genético no promotor do gene *EGFR - EGFR-216G>T*, que modula a resposta à TBA e demonstra estar implicado no

desenvolvimento precoce de CPRC (87). O polimorfismo genético funcional no ligando do EGFR, EGF, *EGF+61G>A* está associado a uma maior expressão de EGF no microambiente tumoral e ao aumento do risco de CaP que irá demonstrar pior resposta à TBA (76). A identificação de um sub-grupo de indivíduos com maior risco de desenvolvimento de resistência à TBA poderá no futuro auxiliar na identificação dos doentes que apresentarão maior benefício se realizarem uma terapia direcionada ao EGFR, como por exemplo, com erlotinib.

Para além disso, a expressão do EGFR e a ativação de outras cascatas de sinalização podem ser também moduladas epigeneticamente pela expressão de miRNAs.

Os miRNAs pertencem a uma classe de pequenos RNAs altamente conservados, não codificantes, que têm um tamanho compreendido entre 19 a 25 nucleótidos e são responsáveis pela regulação génica a nível pós-transcricional (90, 91). A descoberta dos miRNAs teve um grande impacto no que diz respeito aos desenvolvimentos na área da biologia do cancro uma vez que estes demonstram elevado potencial como biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico bem como futuros *targets* ou agentes terapêuticos (92). O seu potencial como biomarcador útil na prática clínica está associado ao facto de os miRNAs serem diferencialmente expressos nos tecidos, facilmente detetados recorrendo a métodos não invasivos, tendo uma expressão estável e fácil de quantificar em diferentes fluidos biológicos, como por exemplo plasma ou saliva (91, 93).

A biogénese dos miRNAs é um processo multifásico que se inicia com a transcrição nuclear do DNA pela enzima RNA polimerase II originando os pri-miRNAs (94-96). Os pri-miRNAs são processados no núcleo em sequências de menor tamanho (pré-miRNAs) pelo complexo formado pela endonuclease RNase III DROSHA e o co-fator DGR8 e posteriormente são transportados para o citoplasma da célula pela proteína exportina nuclear (XPO5) (88, 94, 96). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela proteína DICER num duplex maduro. O miRNA de cadeia dupla é então separado num processo independente de ATP e a cadeia de miRNA-guia é carregada no complexo de indução de silenciamento de RNA que guia o miRNA para seus locais alvo, onde regulam a transcrição de proteínas, por degradação ou repressão do mRNA alvo dependendo do nível de complementaridade (Figura 4) (88, 94).

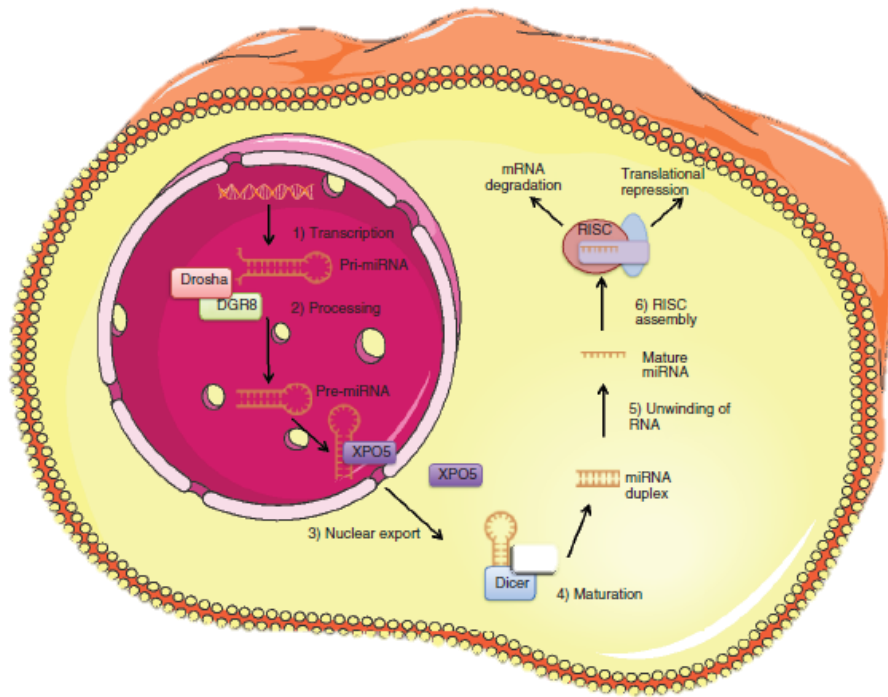


Figura 4 – Biogênese dos microRNAs (adaptado de Patrao AS e colaboradores, 2018) ⁽⁹¹⁾.

A sua expressão é dinâmica o que torna os miRNAs potentes modeladores do comportamento celular, uma vez que vários miRNAs podem ter como alvo o mesmo mRNA e um único miRNA pode ter como alvo diferentes mRNAs (94). Desta forma, os miRNAs estão envolvidos em importantes processos celulares relacionados com a proliferação celular, o metabolismo, a inflamação e a angiogênese (92, 97). Assim, os miRNAs têm um papel chave no cancro pois têm a capacidade de influenciar os *Hallmarks of Cancer* e desregular vias de sinalização celular com potencial oncogénico ou supressor tumoral, sendo estes subclassificados em oncomiRNAs ou miRNAs supressores tumorais, respetivamente (21, 95). Os oncomiRNAs têm como genes alvo os genes supressores tumorais, ligando-se ao mRNA destes, e foram relatados como sobre-expressos no cancro, por outro lado, miRs supressores tumorais são responsáveis pela regulação negativa de oncogenes, fazendo o *target* de mRNA de oncogenes, e apresentam uma expressão diminuída no cancro (91, 94).

Atualmente, já existem descritos miRNAs que regulam a expressão do AR tendo, portanto, um papel preponderante no CPRC (98). Por exemplo, o aumento da expressão do miRNA-21, que é induzível pela via do AR, promove o crescimento celular em CaP mediando a resistência à castração e a formação de metástases (98, 99). O miRNA-21 é considerado um oncomiRNA dado a sua capacidade de regular negativamente a expressão do *PTEN* (98). Para além disto, a ativação da sinalização celular pela via *EGF/EGFR* e níveis mais elevados de *EGFR* promovem a sobre-

expressão do miRNA-21 (100). O miRNA-223 encontra-se sub-expresso em carcinoma de pulmão de não pequenas células e a sua sobre-expressão faz aumentar a apoptose através da ativação da via *PI3K/AKT* pois faz o *target* direto do *EGFR* (101). Sabe-se que este miRNA apresenta uma expressão ectópica em diferentes neoplasias urológicas, contudo o seu papel em CaP ainda não está completamente elucidado (102). O miRNA-370 faz o *target* direto do *EGFR* e a sua sobre-expressão inibe a proliferação, a angiogénese e a formação de metástases em carcinoma de pulmão de não pequenas células (103). O aumento da expressão deste miRNA está associada à iniciação e progressão do CaP (104).

Considerando a importância da via de sinalização *EGF/EGFR* na progressão do CaP e desenvolvimento de CPRC, será importante perceber a dinâmica entre as vias de sinalização do AR e do EGFR bem como de outras vias de sinalização proliferativas que poderão estar ativadas em CPRC. Sendo, deste modo, possível definir novos esquemas terapêuticos e subgrupos de doentes que apresentarão diferentes respostas à TBA de acordo com o seu perfil genético e epigenético.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar o potencial efeito e interação de vias de sinalização proliferativas no desenvolvimento de CPRC.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliação do efeito funcional do polimorfismo genético *EGFR-216G>T* a partir de amostras de tecidos de doentes com CaP;
- Estabelecimento de uma linha celular hormono-resistente e avaliação da dinâmica entre as vias de sinalização do AR e EGFR;
- Avaliação do efeito da modulação *in vitro* e *in vivo* das vias de sinalização do AR e do EGFR e avaliação de potenciais novos alvos terapêuticos em CPRC;
- Avaliação do efeito da modulação *in vitro* do AR num perfil de expressão de miRNAs.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Avaliação do efeito funcional do polimorfismo genético EGFR-216G>T

De forma a avaliar o efeito funcional do polimorfismo *EGFR-216G>T* foram selecionados como população de estudo um subgrupo de doentes com diagnóstico de CaP incluídos na coorte de doentes estudada no estudo efetuado por Teixeira e colaboradores (87). O estudo realizado por Teixeira e colaboradores analisou em 194 doentes com CaP, submetidos a tratamento hormonal no IPO-Porto, o polimorfismo genético *EGFR-216G>T* (doença localizada:16.8%; doença localmente avançada: 38.1% e doença metastática: 45.1%). Observou-se que os doentes com os genótipos *EGFR-216GG/TG* apresentam desenvolvimento precoce de resistência à TBA em comparação com indivíduos homocigóticos *EGFR-216GG*.

O presente estudo foi realizado com autorização prévia da Comissão de Ética do IPO-Porto (CES 123/020), tendo-se recorrido à utilização de amostras de tecido que estavam atualmente disponíveis no Banco de Tumores do IPO-Porto a partir da coorte inicialmente estudada. Considerando a biodisponibilidade de amostra biológica, foi possível recorrer à análise molecular de 14 doentes com genótipo *EGFR-216GG*, 10 doentes com genótipo *EGFR-216GT* e de 3 doentes com genótipo *EGFR-216TT*.

Resumidamente, para cada amostra de tecido parafinado, áreas representativas foram macrodissecadas a partir de seções de tecido com 10 µm de espessura para maximizar a proporção de células malignas (> 70%). O RNA total foi extraído usando o *kit FFPE RNA/DNA Purification Plus* (Cat. 54300, Norgen®), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e pureza do RNA foram avaliadas no espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™) e o RNA extraído armazenado a -80°C até análise molecular.

Após o isolamento de RNA das amostras selecionadas, estas foram utilizadas para a síntese de cDNA usando o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®) de acordo com as recomendações do fabricante, sendo as condições térmicas usadas no termociclador as seguintes: 10 minutos a 25°C, seguidos de 120 minutos a 37°C e, por último, 5 minutos a 85°C. Posteriormente, a expressão de mRNAs foi analisada por PCR (*polymerase chain reaction*: PCR) quantitativo em tempo real. As reações foram realizadas num aparelho de PCR em tempo real, StepOne™ PCR, contendo 1X *Master Mix* (Applied

Biosystems[®]), 1X sondas específicas (*TaqMan*[®] *Gene Expression Assays EGFR*: Hs01076078; *C-myc*: Hs00153408 e *FOS*: Hs04194186 *Applied Biosystems*[®]), uma amostra de cDNA. Como controlo endógeno foi utilizado o *B2M* (β 2-microglobulina, 4332653, *Applied Biosystems*[®]) de forma a normalizar os resultados. A quantificação de mRNA foi efetuada em duplicado e em cada placa existiam controlos negativo. A análise dos resultados foi realizada com recurso ao *StepOne*[™] *Software v2.2* (*Applied Biosystems*[®]).

3.2. Estudos *in vitro*

3.2.1. Caracterização das linhas celulares

Para a realização dos estudos *in vitro*, foram utilizadas três linhas celulares comerciais de CaP: LNCaP, PC-3 e DU-145 (Figura 5). As linhas celulares de LNCaP e PC3 foram adquiridas nos Biobancos American Type Culture Collection (ATCC) e *European Collection of Authenticated Cell Culture* (ECACC), respetivamente. A linha celular DU-145 foi cedida pelo Grupo de Oncogenética do Centro de Investigação do IPO-Porto.

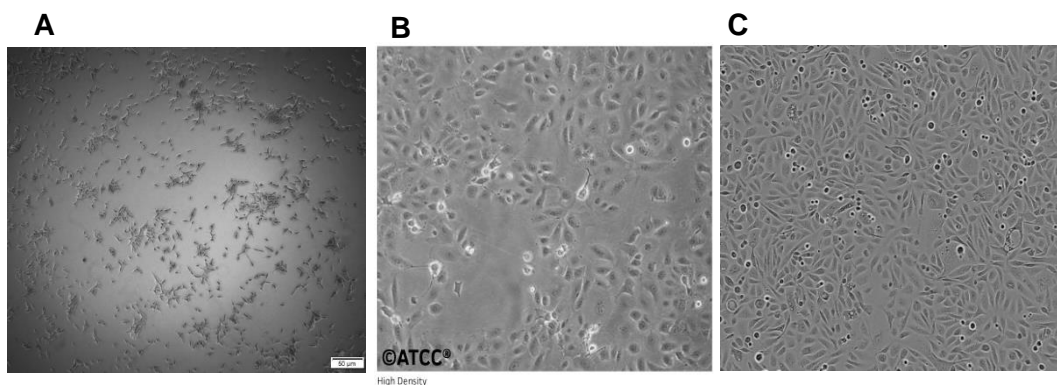


Figura 5 – Imagem microscópica da linha celular (A) LNCaP adquirida pelo microscópio Olympus[®] IX51, (B) DU-145 (ATCC) e (C) PC-3 (ECACC).

Nas três linhas celulares foram analisados os perfis de STRs (*Short tandem repeats*) de modo a se confirmar a sua identidade genética. Para tal, utilizou-se o *PowerPlex*[®] 16 *HS System* (*Promega*[®]), e a deteção dos produtos amplificados foi obtida através de eletroforese em capilar usando o *3500 Genetic Analyzer Sequencer* (*Applied Biosystems*[®]). A identificação dos genótipos foi obtida usando o *GeneMapper*

Software v5.0 (Applied Biosystems®). A identificação genética das linhas celulares foi efetuada no serviço de genômica do i3S.

De modo a avaliar a dinâmica entre as vias de sinalização do AR e do EGFR as células foram submetidas a tratamentos com os fármacos bicalutamida (QUIMIGEN®) e erlotinib (QUIMIGEN®). Após o descongelamento de um *vial* criopreservado de cada linha celular, as células foram mantidas em cultura usando meio RPMI 1640 GlutaMAX™ (1X) (*Gibco*®) suplementado com 10% de FBS (*fetal bovine serum*) (*Gibco*®) e 1% de Pen-Strep (mistura de penicilina e estreptomicina 10000 U/mL) (*Gibco*®). As linhas celulares foram mantidas numa incubadora a 37°C com atmosfera húmida na presença de 5% de CO₂.

3.2.2. Estabelecimento de uma linha celular resistente à bicalutamida

Inicialmente, um *vial* criopreservado da linha celular LNCaP foi descongelado. Posteriormente, uma linha celular resistente à bicalutamida (LNCaP^{+bic.}) foi originada após a exposição da linha LNCaP a concentrações crescentes de bicalutamida (QUIMIGEN®). Para tal, a linha LNCaP foi exposta a 2,5 µM durante 15 dias, seguido da exposição a 5 µM de bicalutamida durante um período de 2 meses. De modo a confirmar o estabelecimento da resistência, foram realizados ensaios de viabilidade celular usando o *water-soluble tetrazolium salt 1 (WST-1 assay reagente, Abcam®)*. O ensaio com WST-1 baseia-se na formação do corante formazan a partir da clivagem do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais. Assim, a quantidade de corante produzido foi avaliada recorrendo a uma metodologia baseada na medição de absorvâncias (corante de formazan: 450nm e referência: 650nm). A densidade celular e o tempo de incubação são características importantes que podem interferir com a realização do ensaio. Deste modo, foram determinadas estas variáveis para a linha celular LNCaP, sendo a densidade celular ótima a ser plaqueada de 20 000 células por poço e o tempo de incubação de 2 horas.

Após otimizações do protocolo, foi analisada a viabilidade celular das linhas celulares LNCaP e LNCaP^{+bic.} de modo a confirmar a aquisição de um fenótipo de resistência à bicalutamida. Em microplacas de 96 poços, foram plaqueadas 20 000 células/poço de LNCaP e de LNCaP^{+bic.} existindo seis réplicas para cada condição. Após 24 horas do plaqueamento, foram adicionados 10 µL de WST-1 a cada poço. Após 2h da adição do WST-1, a absorvância foi medida a 450nm e 650nm usando um leitor de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha). Este ensaio foi realizado após 15 dias de exposição a 2,5 µM de bicalutamida, 15 dias após a exposição a 5 µM de bicalutamida, 1 mês após a exposição a 5 µM de bicalutamida

e 2 meses após a exposição a 5 µM de bicalutamida de forma a comprovar que o fenótipo de resistência foi estabelecido.

De modo a calcular a capacidade metabólica das células, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Capacidade Metabólica} = \frac{[(Abs450 - Abs650)_{teste} - (Abs450 - Abs650)_{branco}]}{Média [(Abs450 - Abs650)_{controle} - (Abs450 - Abs650)_{branco}]} \times 100$$

Para além disso, foi também utilizada uma linha celular resistente à bicalutamida previamente estabelecida pelo nosso grupo (DU-145^{+bic}). Posteriormente, esta linha celular foi mantida durante 1 mês com a ausência de suplementação com bicalutamida (DU-145^{-bic}).

3.2.3. Efeito do erlotinib na dinâmica entre as vias de sinalização do AR e do EGFR

A linha celular DU-145^{+bic} foi sujeita a uma exposição aguda, durante 24 horas, ao erlotinib (QUIMIGEN[®]) de modo a avaliar a dinâmica da via do EGFR numa linha hormono-resistente (DU-145^{+bic.erl.}).

Para determinar o efeito do bloqueio da via do EGFR nas linhas celulares LNCaP e DU-145^{+bic}, determinou-se a concentração de erlotinib que inibe em 50% o crescimento celular, IC₅₀, através de curvas dose-resposta. Para isso, 20 000 células foram plaqueadas incubadas *overnight* e posteriormente foi adicionado o erlotinib (QUIMIGEN[®]), em concentração crescentes, sendo a concentração mais baixa 1,25 µM e a concentração mais elevada de 40 µM. Após uma incubação correspondente ao tempo de duplicação das linhas celulares (LNCaP: 33h e DU-145^{+bic}: 29h), foi realizado o ensaio de viabilidade celular WST-1 descrito anteriormente, mas otimizado para linha celular DU-145^{+bic}. (densidade celular: 20 000 células; tempo de incubação:1h30).

3.2.4. Análise proteica: *Western-Blot*

Para a extração de proteína, após atingirem uma confluência de 80-90%, as células foram tripsinizadas usando 0,05% tripsina – EDTA (1X) (Gibco[®]), contadas usando o corante azul de tripano (Gibco[®]) e um contador automático (EVE[™] Automated Cell Counter) (NanoEnTek[®]). Aproximadamente 2,5 milhões de células

foram centrifugadas a 2500 x g e a 4°C, de modo a formar um pellet para se proceder à extração.

A extração de proteína foi realizada usando 150µL de *lysis buffer* 1X (Abcam®) com a adição de 1,5µL de um *cocktail* de inibidores de protease e fosfatase (Thermo Scientific®). O lisado celular foi novamente centrifugado durante 15 minutos, a 14 000 x g a 4°C recuperando-se o sobrenadante para posterior quantificação. A proteína foi quantificada recorrendo ao método de Lowry usando-se o kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad®) e a concentração foi determinada medindo-se a absorvância da solução a 750nm num leitor de microplacas (*iMark™ Microplate Absorbance Reader*, BioRad Laboratories®). Seguidamente à quantificação, 30 µg de proteína total foram carregadas num gel de poliacrilamida a 10% e separadas por *SDS-PAGE* sob condições desnaturantes e transferidas para uma membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) durante 7 minutos a 25V, usando o sistema de transferência *Trans-Blot Turbo™* (Bio-Rad®). Após o bloqueio das membranas com 5% BSA (*bovine serum albumin*), em agitação constante durante 1 hora, estas foram incubadas *over-night* a 4°C com os diferentes anticorpos primários (anti-EGFR, anti-pEGFR e α-tubulina) numa diluição de 1:1000 (*Cell signalling*®). As membranas foram depois lavadas três vezes com TBS-T 1% (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.6, 0.05% (v/v) Tween 20) e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário correspondente, numa diluição de 1:10000 (*Santa Cruz Biotechnology*®). Para a deteção das bandas foi usado o kit *Clarity™ Western ECL Substrate* (BioRad Laboratories®), usando o sistema *ChemiDoc XRS* (Bio-Rad Laboratories®) e analisadas recorrendo ao programa *Bio-Rad Image Lab Software* (Bio-Rad Laboratories®).

3.2.5. Extração de mRNA, miRNA e síntese de cDNA

Para a extração de mRNA e miRNAs, as células foram tripsinizadas e contadas usando o método descrito anteriormente. Após a contagem, aproximadamente 1,5 milhões de células foram centrifugadas de modo a formar um *pellet* para se proceder à extração de mRNAs e de miRNAs recorrendo aos kits de extração *GRS Total-Blood & Cultured Cells* (Grisp®) e *GRS microRNA kit* (Grisp®), respetivamente.

A síntese de cDNA de mRNA foi realizada de acordo com o procedimento experimental descrito no ponto 3.1 e a síntese de cDNA de miRNAs foi feita recorrendo ao kit comercial *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®) de acordo com as recomendações do fabricante, sendo as condições

térmicas usadas as seguintes: 16°C por 30 minutos, seguido de 60 minutos a 42°C e 85°C por 10 minutos.

3.2.6. Quantificação relativa por PCR em tempo real

A expressão de mRNA e miRNAs foi analisada por PCR quantitativo em tempo real de acordo com o protocolo experimental descrito no ponto 3.1. Para a quantificação de mRNAs, as sondas específicas usadas foram: *TaqMan*[®] *KLK3 (PSA)*: Hs02576345; *MTOR*: Hs00234508; *EPAS1 (HIF2 α)*: Hs01026149 Applied Biosystems[®]. Como controlo endógeno foi utilizado o *GUSB* (Beta Glucuronidase, 433376F, Applied Biosystems[®]). Para a quantificação de miRNAs, as sondas específicas usadas foram: *TaqMan*[®] *microRNA Expression Assays hsa-miR-223*: TM002098; *hsa-miR-370*: TM002275 e *hsa-miR-21*: TM002428 e o RNU-6B (TM – 001093) que foi utilizado como controlo endógeno.

As quantificações de mRNAs e miRNAs foram efetuadas em duplicado e cada placa continha um controlo negativo. A análise dos resultados foi realizada com recurso ao *StepOne*[™] *Software v2.2 (Applied Biosystems[®])*.

3.3. Ensaios de tumorigénese *in vivo*

De forma a avaliar o efeito da modulação *in vivo* das vias de sinalização do AR e do EGFR procedeu-se à inoculação subcutânea das linhas celulares LNCaP e DU-145^{+bic} em murganhos imunodeficientes (*Nude CBA*). Tanto para as LNCaP como para DU-145^{+bic}, 13 murganhos foram inoculados subcutaneamente com 2 milhões de células por animal.

O desenvolvimento e crescimento tumoral foi monitorizado 3 vezes por semana com auxílio de uma craveira, e assim que os tumores atingiram um volume de 100-200 mm³ (105), os murganhos foram divididos aleatoriamente por três grupos experimentais, sendo um grupo controlo, um grupo em que foi administrado subcutaneamente erlotinib (21,50 μ M) e um grupo onde se administrou uma combinação de bicalutamida e erlotinib (10 μ M e 21,50 μ M, respetivamente). As concentrações testadas tiveram como base os valores de IC₅₀ previamente determinados *in vitro* para cada uma das linhas celulares. O volume tumoral foi determinado utilizando a fórmula, $Volume\ tumoral = \frac{1}{2} (comprimento \times largura^2)$ (106). Como veículo foi utilizado soro fisiológico. Após as administrações em teste, o volume tumoral foi avaliado a cada 2 dias. Os murganhos foram sacrificados ao *timepoints* experimental definido quando o volume tumoral excedeu 1500 cm³ em pelo menos um

murganho. Seguidamente, os tumores recuperados foram fixados em parafina até posterior utilização.

Posteriormente, dois cortes de 10 μm de espessura foram efetuados nos tecidos fixados em parafina obtidos dos murganhos tratados com as diferentes combinações. A desparafinação dos cortes bem como a extração de RNA e de miRNA foi feita utilizando o kit *Absolutely RNA FFPE (Agilent®)* segundo as instruções do fabricante.

A síntese de cDNA bem como a quantificação dos níveis de mRNA e miRNAs de interesse foram realizadas de acordo com o previamente descrito nos pontos 3.2.5. e 3.2.6., respetivamente.

De salientar que não se observou a formação de tumores após inoculação com LNCaP no período experimental definido num número significativo de animais, pelo que não foi possível iniciar-se as várias condições em teste.

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software *IBM®SPSS®Statistics* para Windows (versão 24.0). O método Livak ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) e o teste *t' student* foi utilizado para avaliar as diferenças nos níveis de expressão dos miRNAs e mRNAs normalizados.

Os gráficos foram obtidos através do programa *GraphPad Prism* versão 8.4.3.

Resultados

4. Resultados

4.1. Avaliação do efeito funcional do polimorfismo genético EGFR-216G>T

De acordo com os resultados obtidos, observaram-se diferenças no perfil de transcrição estudado consoante o polimorfismo genético *EGFR-216G>T*. Observou-se que os indivíduos homozigóticos *EGFR-216TT* apresentam uma tendência para um aumento dos níveis de expressão de mRNA de *EGFR* comparativamente aos indivíduos homozigóticos *EGFR-216GG* (*fold-increase*: 5,50; *P*=0,058). Cumulativamente, os indivíduos homozigóticos *EGFR-216TT* apresentaram também maior expressão de mRNA *C-myc* (*fold-increase*: 3,36; *P*=0,042) e mRNA *FOS* (*fold-increase*: 7,73; *P*= 0,029). Verificou-se também que os indivíduos heterozigóticos *EGFR-216GT* apresentaram níveis aumentados de mRNA de *FOS* comparativamente aos indivíduos homozigóticos *EGFR-216G>T* (*fold-increase*: 19,52; *P*=0,003) (Figura 6).

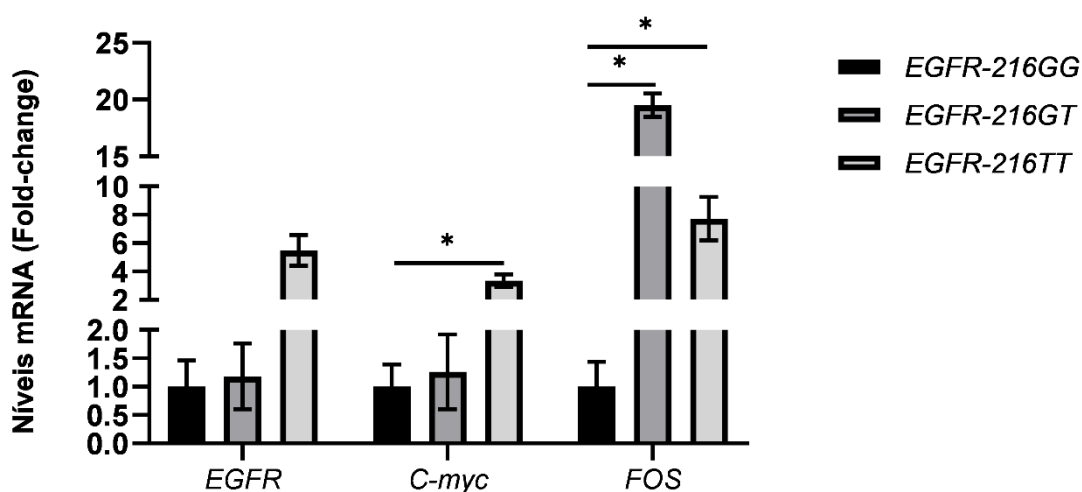


Figura 6 – Níveis de expressão de mRNAs de *EGFR*, *C-myc* e *FOS* de acordo com o polimorfismo genético *EGFR-216G>T*.

4.2. Estabelecimento de uma linha celular resistente à bicalutamida

Com a contínua exposição à bicalutamida e ao aumento da concentração administrada (5 μ M), observou-se uma ligeira diminuição da capacidade metabólica da linha LNCaP. Após um mês de exposição a 5 μ M de bicalutamida a capacidade metabólica da linha celular LNCaP diminuiu de uma forma acentuada. Contudo, ao fim

de 2 meses de exposição à bicalutamida, as células LNCaP^{+bic} recuperam a sua capacidade metabólica, o que indica que as células estão a adquirir resistência a 5 µM de bicalutamida (Figura 7A).

O efeito da adição contínua durante 2 meses de bicalutamida reflete-se numa diminuição dos níveis de mRNA de *PSA* na linha celular LNCaP^{+bic} comparativamente à linha LNCaP. Na linha celular DU-145 os níveis de mRNA de *PSA* são também detetáveis, observando-se ainda uma diminuição na condição DU-145^{+bic} e verificando-se uma atenuação do efeito da exposição contínua da bicalutamida após a interrupção da adição de bicalutamida, 1 mês, na linha celular DU-145^{-bic} (Figura 7B).

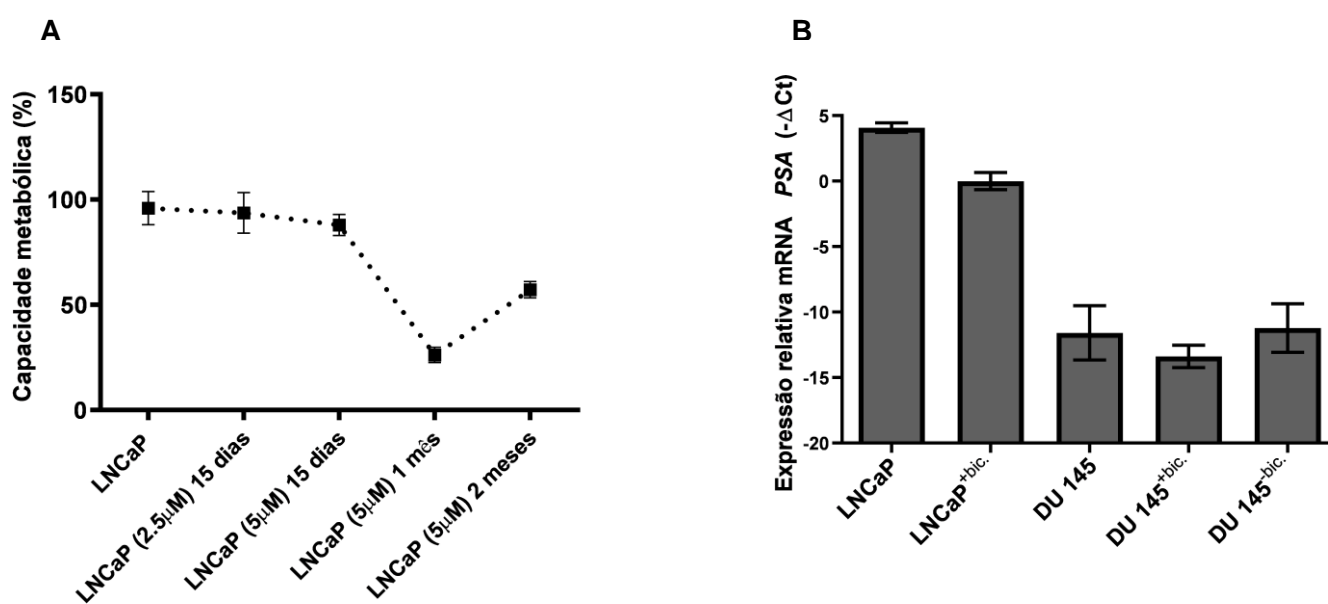


Figura 7 – (A) Capacidade metabólica da linha celular LNCaP^{+bic} em diferentes períodos de tempo após exposição a diferentes concentrações de bicalutamida (média ± desvio padrão); (B) Níveis de mRNA de *PSA* nas diferentes linhas celulares analisadas no presente estudo (média ± erro da média).

4.3. Efeito da modulação *in vitro* das vias de sinalização do AR e do EGFR e avaliação de potenciais alvos terapêuticos no CPRC

O efeito agudo da adição de 10 µM bicalutamida foi avaliado em linhas celulares representativas de CaP (Figura 8A-B). Na linha celular LNCaP, verificou-se um aumento de mRNA de *EGFR* após 24 horas da adição de bicalutamida (*fold-increase*: 1,30; $P=0,029$). No entanto, a adição de bicalutamida não parece ter efeito nos níveis de expressão de mRNA de *EGFR* nas linhas celulares DU-145 e PC-3. Do mesmo modo, observou-se que a adição de bicalutamida na linha celular LNCaP está

associada a um aumento dos níveis proteicos de EGFR total e pEGFR (forma fosforilada do EGFR) (Figura 8B).

De facto, a capacidade metabólica da linha celular LNCaP^{+bic.}, exposta continuamente à bicalutamida, está aumentada comparativamente à linha celular LNCaP ($P < 0,001$). Similarmente, a linha celular DU-145^{+bic.} também apresenta um aumento da sua capacidade metabólica comparativamente à linha celular DU-145 ($P = 0,008$), mantendo-se este aumento mesmo após a remoção da bicalutamida ($P = 0,004$) (Figura 8C).

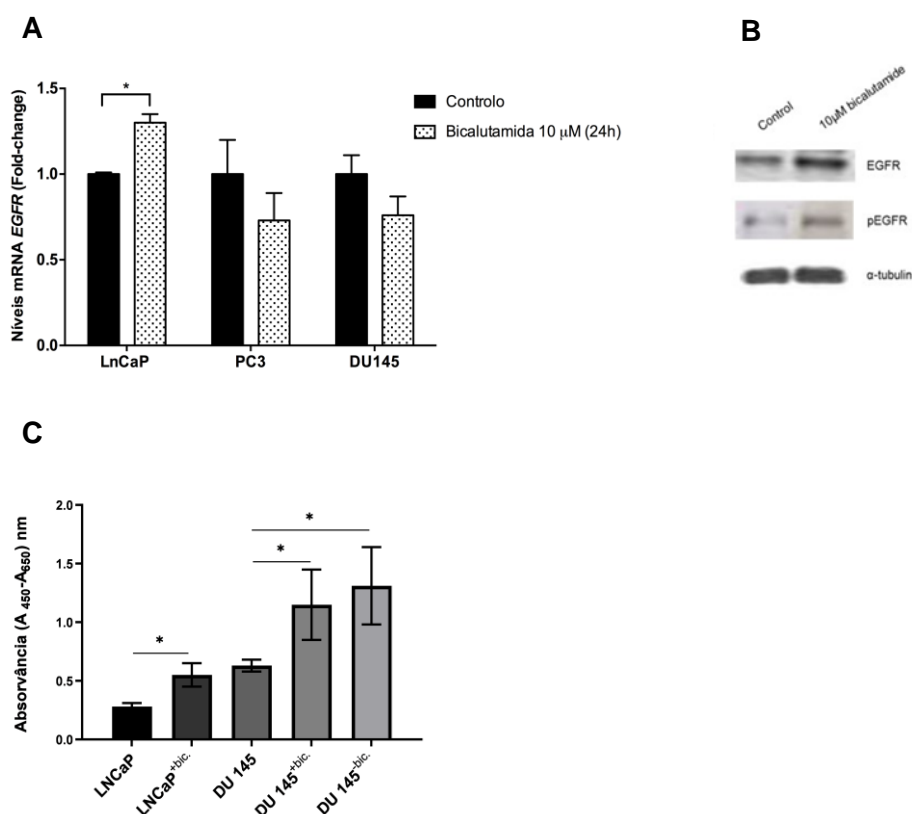


Figura 8 – Efeito da adição de bicalutamida em linhas diferentes celulares. (A) níveis de expressão de mRNA de *EGFR* ao final de 24 horas após adição de bicalutamida; (B) western-blot para os níveis de proteína de EGFR e pEGFR ao final de 24 horas após adição de bicalutamida; (C) capacidade metabólica das linhas celulares após exposição contínua à bicalutamida (média ± desvio padrão).

A par do aumento da capacidade metabólica, também se verificou um aumento da expressão dos níveis de mRNA de *EGFR* na linha celular LNCaP^{+bic.} (*fold-increase*: 6,23; $P < 0,001$) e na linha celular DU-145^{+bic.} (*fold-increase*: 1,47; $P = 0,022$). Para além disso, também se observou um aumento dos níveis de mRNA de *EGFR* na linha celular DU-145^{-bic.} comparativamente à linha celular DU-145 (*fold-increase*: 2,60; $P = 0,053$) (Figura 9A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de mRNA *FOS* (*fold-increase*: 2,87; $P = 0,284$) e *C-myc* (*fold-decrease*: 0,99;

$P=0,971$) com a adição contínua de bicalutamida na linha celular LNCaP (Figura 9B). Contrariamente, observou-se um aumento significativo nos níveis de expressão dos mRNAs *FOS* e *C-myc* na linha celular DU-145^{+bic.} comparativamente à linha DU-145 (*fold-increase*: 140,1; $P<0,001$; *fold-increase* = 2,20; $P<0,001$, respetivamente) (Figura 9C).

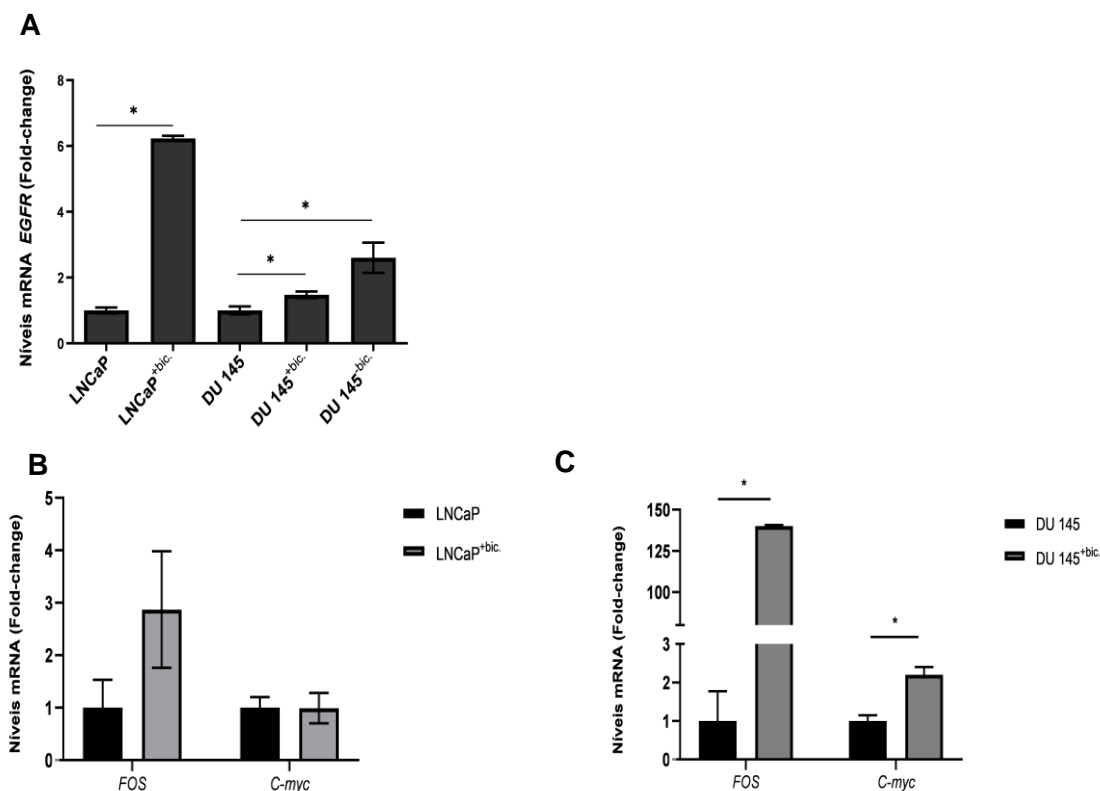


Figura 9 – Níveis de expressão de mRNA *EGFR* e dos genes induzíveis *FOS* e *C-myc* em linhas celulares expostas continuamente à bicalutamida: (A) níveis de expressão de mRNA de *EGFR*; (B) e (C) níveis de expressão de mRNAs de *FOS* e *C-myc* nas linhas celulares LNCaP e DU-145, respetivamente.

A adição simultânea de erlotinib e bicalutamida à linha celular DU-145 (DU-145^{+bic.+erl.}) resulta num decréscimo significativo nos níveis de expressão de mRNA de *EGFR* (*fold-decrease*: 0,26; $P=0,052$) (Figura 10A). Contudo, não se observam diferenças nos níveis de expressão de mRNAs de *FOS* e *C-myc* (*fold-decrease*: 0,75; $P=0,215$; *fold-increase*: 1,12; $P=0,071$, respetivamente). (Figura 10B).

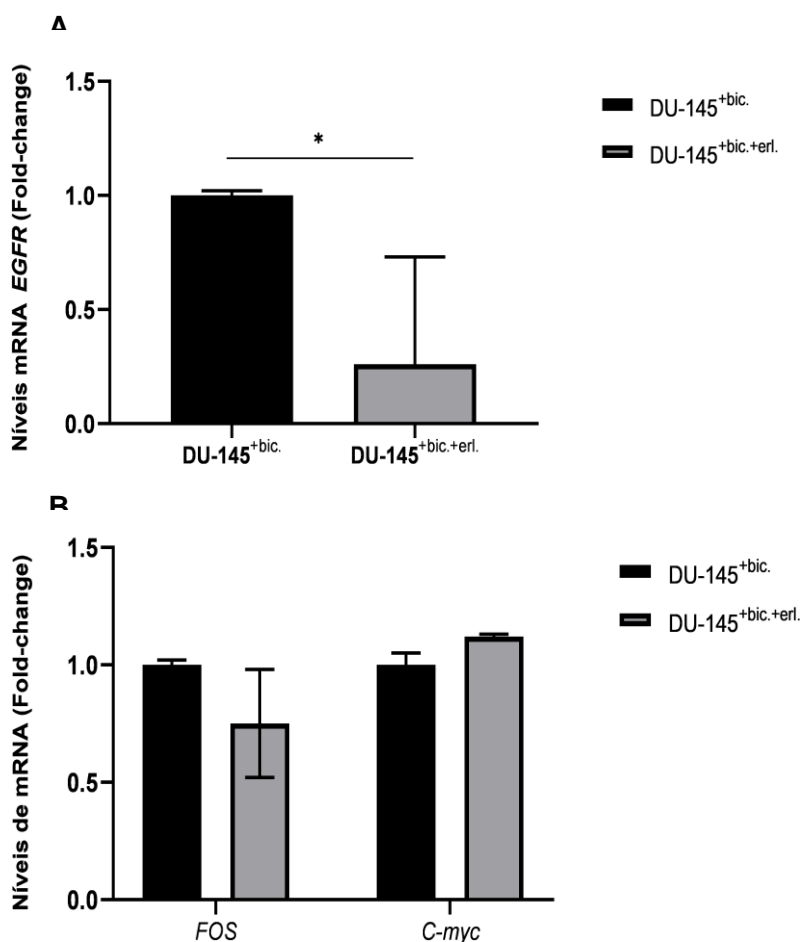


Figura 10 - Níveis de expressão de mRNA: (A) *EGFR* e (B) genes induzíveis pelo *EGFR* após a adição de erlotinib na linha DU-145^{+bic.}

4.4. Efeito da modulação *in vivo* das vias de sinalização do AR e do EGFR

De modo a clarificar o efeito da dupla inibição do AR e do EGFR, efetuou-se um estudo piloto com murganhos imunodeficientes Nude CBA, sendo estes inoculados subcutaneamente com a linha DU-145^{+bic.}. Dos 13 murganhos inicialmente inoculados, 10 desenvolveram tumor e seguidamente foram divididos aleatoriamente por três grupos experimentais. O grupo controlo era composto por três animais, o grupo tratado com de erlotinib, 21,50 μM de erlotinib dose determinada pelo ensaio de IC_{50} , (Figura 11A) composto por três animais e um grupo tratado com a combinação dos fármacos bicalutamida (10 μM) e erlotinib (21,50 μM) formado por quatro animais.

A média do volume tumoral dos murganhos que constituíram o grupo controlo era de 1262,34 mm^3 , os murganhos tratados com apenas o erlotinib apresentavam um volume tumoral médio de 836,38 mm^3 e os murganhos pertencentes ao grupo tratado

com bicalutamida em combinação com erlotinib apresentavam um volume tumoral médio de 630,67 mm³. Assim, a dupla inibição demonstra ser eficaz para promover uma redução do volume tumoral equivalente a 49,96% (Figura 11B). Adicionalmente, não se verificam diferenças nos níveis de expressão de *EGFR* derivados dos tecidos tumorais nos animais tratados com erlotinib e com a combinação dos fármacos comparativamente ao grupo controlo (*fold-decrease*:0,79; *P*=0,407 e *fold-increase*: 1,22; *P*=0,674, respetivamente) (Figura 11C).

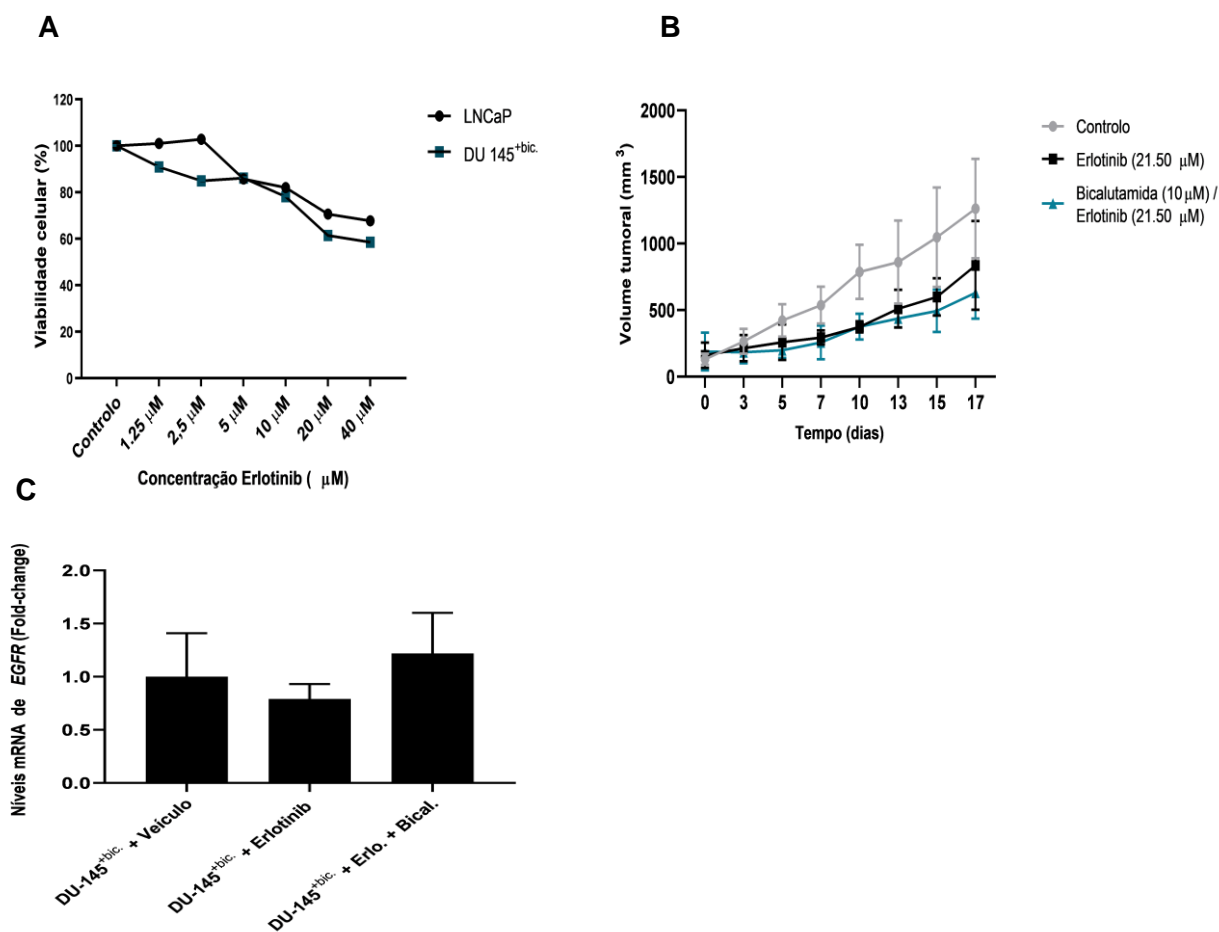


Figura 11 – Efeito da dupla inibição do AR e do EGFR in vivo. (A) determinação do IC₅₀ relativo ao erlotinib nas linhas celulares LNCaP e DU-145^{+biC}. (média); (B) curva de crescimento tumoral nos murganhos submetidos a diferentes tratamentos (média ± desvio padrão); (C) níveis de expressão de mRNA de *EGFR* nos tecidos dos murganhos submetidos a diferentes tratamentos.

4.5. Efeito da modulação das vias de sinalização AR e EGFR nos níveis de expressão de *mTOR* e *HIF-2 α*

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se um aumento de expressão de mRNA de *mTOR* quando a linha DU-145 é continuamente exposta à bicalutamida (*fold-increase*: 2,57; $P= 0,009$). Para além disso, também se observou que os níveis de mRNA de *mTOR* diminuem de uma forma estatisticamente significativa quando se retira o estímulo da bicalutamida à linha celular DU-145^{+bic} (*fold-decrease*: 0,85; $P= 0,007$) (Figura 12A). Adicionalmente, foi também observado que os níveis de expressão de *HIF-2 α* diminuem de forma significativa quando se retira o estímulo da bicalutamida à linha DU-145^{+bic}. (*fold-decrease*: 0,73; $P= 0,042$) (Figura 12B).

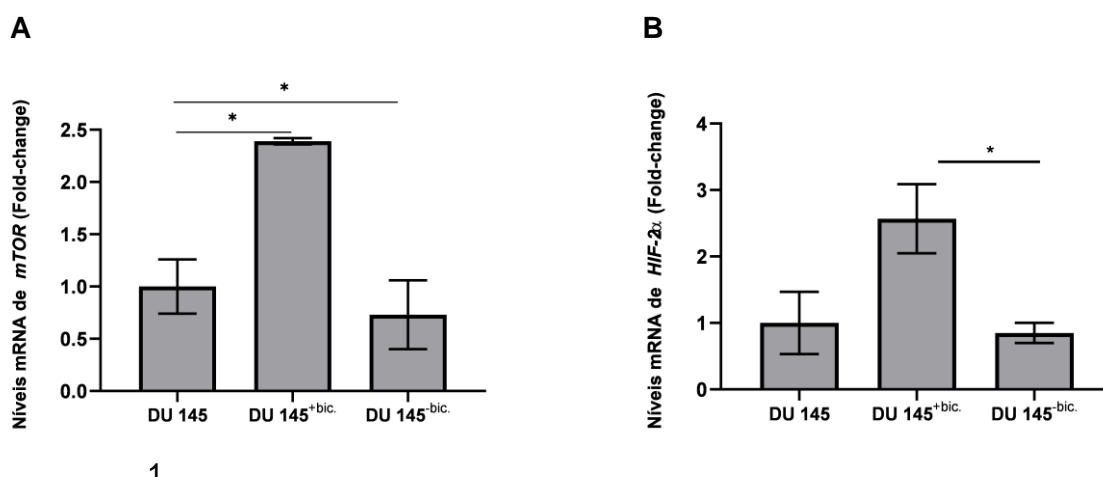


Figura 12 – Níveis de expressão de mRNA: (A) *mTOR* e (B) *HIF-2 α* nas linhas DU-145, DU-145^{+bic} e DU-145^{-bic}.

Contudo, em amostras de tecido tumoral obtidas a partir dos murganhos, não se observam diferenças nos níveis de expressão de mRNA de *mTOR* quando os animais foram tratados com erlotinib e com a combinação de bicalutamida com erlotinib comparativamente aos murganhos pertencentes ao grupo controlo (*fold-increase*: 1,13; $P=0,699$ e *fold-increase*: 1,11; $P=0,699$, respetivamente) (Figura 13A). De igual forma, também não se observam diferenças nos níveis de expressão de *HIF-2 α* nas diferentes condições analisadas (*fold-decrease*: 0,90; $P=0,354$ e *fold-increase*: 1,01; $P=0,977$, respetivamente) (Figura 13B).

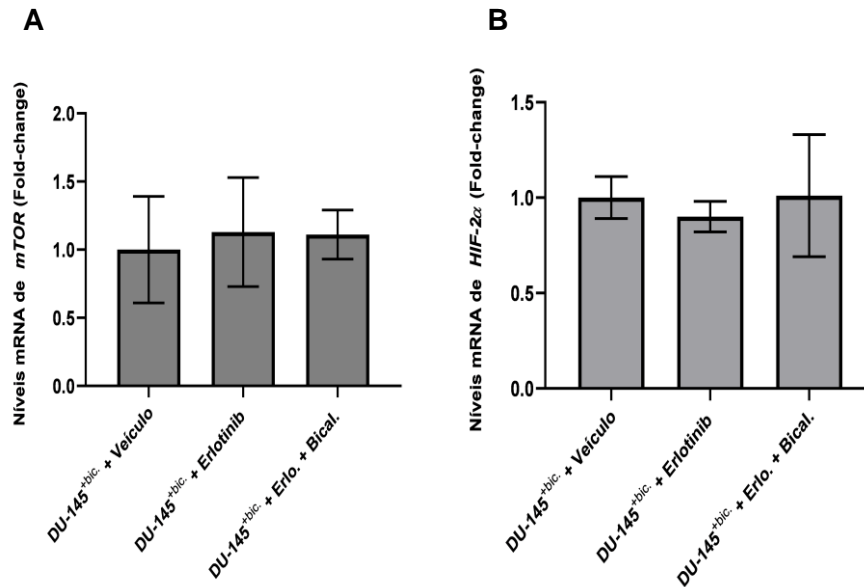


Figura 13 – Níveis de expressão de mRNA: (A) *mTOR* e (B) *HIF-2α* nos tecidos derivados de murganhos submetidos a diferentes tratamentos.

4.6. Efeito da modulação *in vitro* do AR num perfil de expressão de miRNAs

De acordo com os resultados obtidos, observou-se os níveis de expressão do miRNA-21 aumentam na linha DU-145^{bic}. comparativamente à linha LNCaP (*fold-increase*: 53,08; *P*= 0,043). No entanto, observou-se uma diminuição deste miRNA após suspensão do tratamento com a bicalutamida na linha celular DU-145^{bic}, (*fold-decrease*: 6,63; *P*= 0,021) (Figura 14A).

Na linha celular DU-145^{bic} não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão do miRNA-223 e do miRNA-370 comparativamente à linha celular LNCaP (*fold-decrease*: 0,28; *P*= 0,091; *fold-decrease*: 0,04; *P*= 0,903, respetivamente). Observou-se também que, para os níveis de expressão do miRNA-370 e miRNA-223, não se observam diferenças na linha celular DU-145^{bic}. (*fold-increase*: 0,22; *P*=0,334; *fold-decrease*: 0,03; *P*=0,803, respetivamente) (Figura 14B-C).

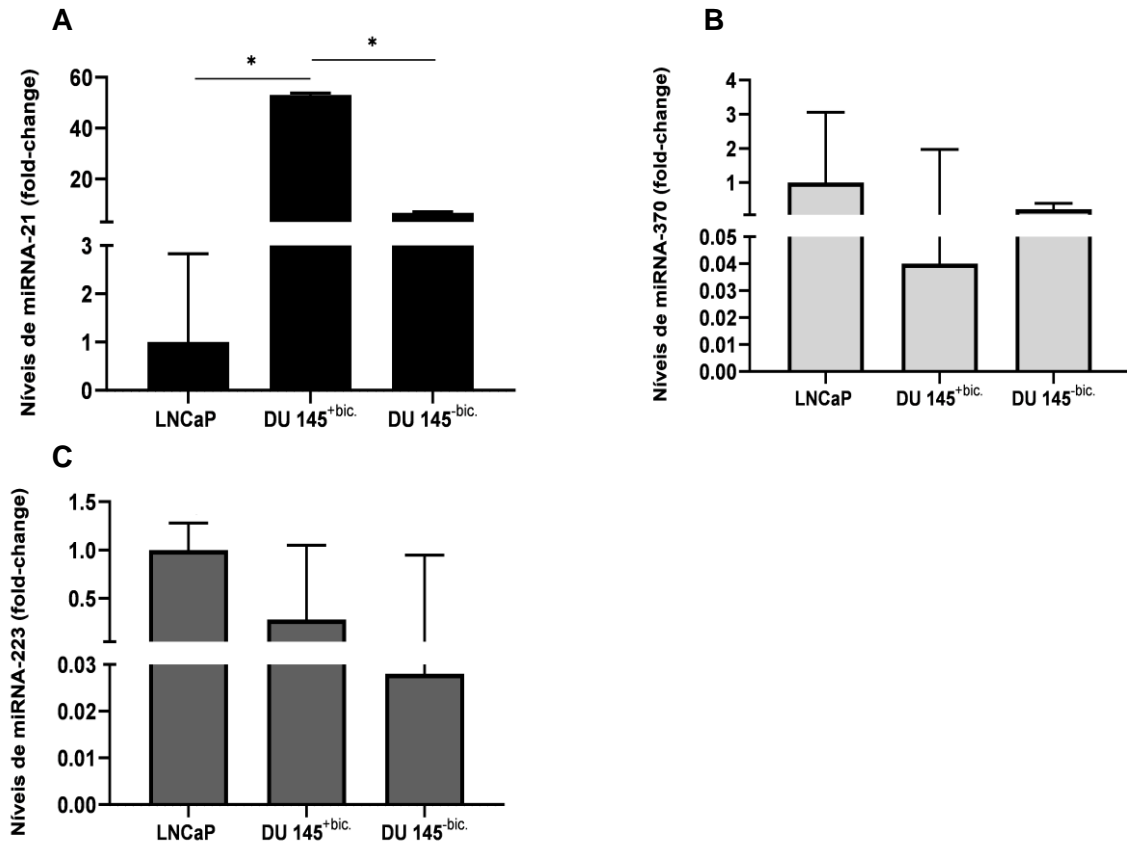


Figura 14 – Níveis de expressão de miRNAs: (A) miRNA-21; (B) miRNA-370 e (C) miRNA-223 nas linhas celulares LNCaP, DU-145^{+bic.} e DU-145^{-bic.}

Discussão

5. Discussão

O CaP é uma das neoplasias mais comuns nos homens, sendo que 1 em cada 9 homens será diagnosticado com CaP durante a sua vida, representando a quinta causa de morte por cancro (24). Uma das principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento deste tipo de cancro é a via de sinalização do AR (61). Assim, uma das principais abordagens terapêuticas em doentes com doença avançada é a TBA, que consiste no bloqueio da produção e/ou ação de androgénios, de forma a controlar a progressão tumoral (46). A TBA, ao potenciar a apoptose e inibir a proliferação celular, apresenta o potencial de controlar o desenvolvimento das células tumorais. Durante o tratamento com TBA, a maioria dos homens com CaP demonstra remissão clínica, bioquímica e radiológica, contudo, após um período de tempo limitado os doentes deixam de responder a estas terapias progredindo para CPRC, que está associado a altas taxas de morbilidade, mortalidade e com limitadas opções terapêuticas (51, 54, 107). Desta forma, admite-se que outras vias de sinalização celular poderão também estar associadas com a progressão da doença, promovendo o desenvolvimento tumoral, de que é exemplo a via de sinalização *EGF/EGFR* (61). Esta é uma via que está envolvida na diferenciação e proliferação celular, desempenhando um papel chave na oncogénese (74, 77). De facto, a sobre-expressão de EGFR tem sido associada a progressão tumoral e a um pior prognóstico em diferentes modelos tumorais (79, 80).

Atualmente, sabe-se que a expressão do EGFR pode ser influenciada pela ocorrência de polimorfismos genéticos funcionais, podendo a ocorrência destes modular o microambiente celular e desta forma influenciar a evolução tumoral. Recentemente, estudos desenvolvidos no grupo demonstram que a ocorrência de polimorfismos genéticos funcionais em genes codificantes de fatores de crescimento, nomeadamente *EGF* e *TGFB1*, influenciavam o risco para desenvolvimento de CaP, assim como o desenvolvimento de doença mais agressiva e de CPRC, mostrando que estas variações genéticas podem ser úteis na definição de grupos de risco para o desenvolvimento de resistência à TBA (76, 77). Adicionalmente, também foi observado que os indivíduos portadores dos génotipos *EGFR-216GT/TT* desenvolviam resistência à TBA mais precocemente comparativamente aos indivíduos homocigóticos *EGFR-216GG*. De facto, de acordo com os resultados do presente estudo, observou-se que a ocorrência do polimorfismo genético *EGFR-216G>T* apresenta um efeito funcional, sendo que os indivíduos homocigóticos *EGFR-216TT* apresentam maiores níveis de expressão de mRNA de *EGFR*, assim como dos níveis dos mRNAs de *FOS* e *C-myc*, o que poderá representar um estímulo adicional à

proliferação celular nestes indivíduos. Estes resultados vão de acordo ao que se encontra na literatura, em que é sugerido que a sobreativação do EGFR é um marco importante durante a progressão para o CPRC, sugerindo que esta via de sinalização poderá auxiliar a progressão destes tumores em resposta ao bloqueio do AR (54, 80).

Deste modo, a estratificação dos doentes com CaP mediante o polimorfismo genético estudado poderá ser útil na caracterização de grupos com maior potencial de serem submetidos a uma terapia dirigida anti-EGFR.

A via de sinalização *EGF/EGFR* está ativada durante a progressão do CaP, favorecendo a aquisição de um fenótipo mais agressivo (79). De facto, no presente estudo, observou-se que a exposição aguda à bicalutamida está associada a um aumento do mRNA de *EGFR*, assim como dos níveis de proteína de EGFR total e pEGFR na linha celular LNCaP. Adicionalmente verificou-se que a exposição crónica à bicalutamida, apesar de se mostrar eficaz na inibição da via de sinalização do AR, está associada a um aumento da capacidade metabólica, o que evidencia a possibilidade de estarem a ser ativadas vias de sinalização alternativas que medeiam a proliferação celular, de que é exemplo a via *EGF/EGFR*. Mesmo a linha celular DU-145^{+bic.}, que evidencia uma ativação da via do AR atenuada, apresenta um aumento da capacidade metabólica comparativamente à linha celular DU-145. Este aumento da capacidade metabólica na linha celular DU-145^{+bic.} é também acompanhado por um aumento da expressão de mRNA do *EGFR* bem como dos mRNAs de genes induzíveis pelo *EGFR*. Deste modo, colocou-se a hipótese de que o bloqueio contínuo do AR se traduzirá num aumento da expressão do EGFR e conseqüentemente da ativação de diferentes cascatas de transdução de sinal que culminam na proliferação celular, promovendo assim o desenvolvimento tumoral.

Os resultados vão de encontro com a literatura onde se encontra evidência que durante a progressão do CaP para CPRC a via de sinalização ativada pelo EGFR está sobre-expressa (76, 79-81).

Considerando a dinâmica da via do AR e do EGFR durante a progressão de CaP, principalmente após início da TBA, reveste-se de particular interesse a análise do efeito da administração de um agente dirigido anti-EGFR no controlo da progressão tumoral.

De facto, a dupla inibição com bicalutamida e erlotinib demonstrou ser eficiente, reduzindo para metade o volume tumoral induzido pela linha celular DU-145^{+bic.} inoculada em murganhos. Contudo, um maior efeito desta combinação pode não ser alcançado pois, verificou-se *in vitro*, que a adição de bicalutamida também resultou num aumento dos níveis de mRNA de *mTOR* e *HIF-2 α* , sendo esse aumento revertido ao final de 1 mês após retirar a bicalutamida, o que sugere a ativação de diferentes

cascatas de sinalização após o bloqueio do AR. De facto, a desregulação da via de sinalização *PI3K/AKT/mTOR* tem vindo a ser associada com a aquisição de resistência a terapias anti-neoplásicas (108). A ativação oncogénica desta cascata favorece a formação tumoral, progressão da doença e aquisição de resistência às terapias. De acordo com Shorning e colaboradores, existe um complexo *crosstalk* entre a via *PI3K/AKT/mTOR* e múltiplas cascatas de sinalização que promovem a progressão do CaP, influenciando a sensibilidade a diferentes esquemas terapêuticos (108). Os resultados obtidos no estudo *in vivo* demonstraram que a dupla inibição com erlotinib e bicalutamida não influencia os níveis de mRNA de *mTOR* e de *HIF-2 α* nos tecidos tumorais, o que sugere que outras cascatas de sinalização ou outros mecanismos de regulação genética estejam também a sofrer modulação. Contudo, estudos futuros deverão incluir mais animais por condição teste, de modo a validar algumas das associações verificadas, assim como a repetição das condições experimentais que englobam a inoculação da linha celular LNCaP. Adicionalmente reveste-se também de particular interesse a análise de condições experimentais que englobem a administração de agentes dirigidos ao mTOR e ao HIF-2 α .

A presença de bicalutamida condiciona alterações no microambiente celular, influenciando diferentes processos, nomeadamente de regulação epigenética. Modificações no microambiente celular podem alterar o padrão de expressão de miRNAs e deste modo influenciar a expressão genética.

De acordo com a literatura, a desregulação da expressão de miRNAs está associada com a aquisição de resistência à TBA (109). A adição contínua de bicalutamida à linha celular DU-145 está associada a um aumento dos níveis de miRNA-21 e a uma tendência de diminuição dos miRNA-370 e miRNA-223. Contudo, após a suspensão do tratamento com bicalutamida verificou-se uma descida dos níveis de miRNA-21, uma tendência para o aumento do miRNA-370, não se observando a tendência de inversão no caso do miRNA-223 que parece diminuir.

Similarmente aos resultados do presente estudo, Ribas e colaboradores demonstraram *in vivo* que a castração cirúrgica de murganhos inoculados com a linha celular LNCaP, estava associada a um aumento dos níveis de miRNA-21, assim como a uma promoção do crescimento tumoral, o que suporta o envolvimento deste miRNA nos mecanismos de resistência ao bloqueio do AR (110). Adicionalmente, Markou e colaboradores observaram que a sobre-expressão do miRNA-21 está também associada a níveis aumentados de mRNA de *EGFR*, o que está de acordo com o observado na linha DU-145 cronicamente exposta à bicalutamida (100). Considerando que um dos *targets* do miRNA-21 é o *PTEN*, regulador negativo da via de sinalização *PI3K/AKT/mTOR*, o aumento dos níveis deste miRNA, a par do aumento da expressão

do *EGFR* e diminuição do *PTEN*, poderá estar a influenciar a sobre-expressão do mRNA de *mTOR* e de *HIF-2 α* na linha celular DU-145^{bic}, potenciando assim a resistência à bicalutamida e conseqüentemente progressão tumoral.

De acordo com Wu e colaboradores, uma diminuição da expressão do miRNA-370 em CaP está associada com a progressão do ciclo celular (104). Adicionalmente, Ma e colaboradores, verificaram que a diminuição da expressão do miRNA-223 inibe a apoptose e conseqüentemente induz a proliferação celular (101). Contudo, no presente estudo, não se verificaram alterações nos níveis de expressão do miRNA-370 e do miRNA-223.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a inibição da via de sinalização do AR leva à sobre-expressão de outras vias proliferativas, como a via *EGF/EGFR*, sendo essas novos potenciais alvos terapêuticos. O polimorfismo genético funcional analisado no presente estudo, está associado com uma progressão mais rápida para CPRC, verificando-se que os indivíduos homozigóticos *EGFR-216GT/TT* apresentam maiores níveis *EGFR*, o que lhes poderá potenciar uma progressão tumoral acelerada. Deste modo, este sub-grupo de doentes apresentará um maior benefício quando submetidos a uma terapêutica dirigida anti-EGFR. A inibição do EGFR poderá ser uma abordagem terapêutica útil. Contudo, o bloqueio do AR influencia também a ativação de *targets* adicionais, o que revela a complexidade do mecanismo molecular envolvido na aquisição de resistência. Adicionalmente, a modificação do perfil de miRNAs observada em consequência da dinâmica estabelecida entre o AR e EGFR poderá revelar potenciais novos biomarcadores úteis na monitorização dos doentes.

Conclusões e Perspetivas

Futuras

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

O CaP é uma das principais neoplasias mais comuns nos homens, representando a quinta causa de morte por cancro. Considerando o papel chave da via de sinalização do AR neste tipo de cancro, a TBA é uma das principais abordagens terapêuticas na doença avançada. Contudo, a eficácia desta forma de tratamento é limitada e a maioria dos homens progride desenvolvendo CPRC.

De acordo com os resultados observados, verificou-se que a adição contínua de bicalutamida conduz a um aumento de expressão de *EGFR* e da capacidade metabólica celular, suportando assim o papel chave desta via em tumores prostáticos resistentes à castração. Deste modo, verificando-se que os doentes homozigóticos *EGFR-216TT* apresentam maiores níveis de expressão de mRNA *EGFR* e dos genes induzíveis *FOS* e *C-myc*, conseguiu-se clarificar a sua rápida progressão para CPRC, uma vez que estes apresentam uma dupla desvantagem como consequência do seu património genético, podendo ser definidos como um sub-grupo que terá maior benefício em fazer uma terapia anti-EGFR. A definição de sub-grupos de doentes com base na caracterização genética permitirá uma abordagem mais personalizada e com maior potencial de sucesso, podendo contornar assim algumas das limitações observadas em grandes estudos onde se verifica uma grande heterogeneidade da população submetida a tratamento.

De facto, *in vivo* observou-se uma diminuição do volume tumoral quando administrada a combinação de erlotinib e bicalutamida. Contudo, a eficiência dessa diminuição em consequência do esquema usado, poderá ser influenciada pela ativação de outras cascatas, nomeadamente do *mTOR* e *HIF-2 α* , uma vez que também se observou o aumento *in vitro* da expressão de *mTOR* e *HIF-2 α* após a administração de bicalutamida.

Futuramente, seria importante quantificar os níveis proteicos correspondentes às moléculas estudadas neste estudo de forma a validar os resultados obtidos. Adicionalmente, reveste-se de particular importância a replicação do estudo *in vivo* usando por cada condição experimental um maior número de animais e combinações terapêuticas adicionais e diferentes métodos de inoculação de modo a ultrapassar a limitação verificada na inoculação das LNCaP. Considerando a influência da adição de bicalutamida no perfil de expressão de miRNAs estudado, será importante estabelecer a associação funcional destes com o *target* EGFR realizando ensaios de luciferase bem como verificar o potencial deste perfil como biomarcador em circulação útil na monitorização de doentes submetidos a TBA.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
2. GLOBOCAN. Cancer Tomorrow: A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden worldwide from the current estimates in 2018 up until 2040. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019 [Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>].
3. GLOBOCAN. Cancer Today: Estimated number of new cases in 2018, all cancers, both sexes, all ages Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2018 [Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=5&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1].
4. GLOBOCAN. Cancer Today: Estimated number of deaths in 2018, all cancers, both sexes, all ages Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2018 [Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=5&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1].
5. RORENO. Registo Oncológico Nacional Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE; 2016.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
7. Society AC. Global Cancer Facts & Figures 4th Edition. 2018.
8. Takeshima H, Ushijima T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *NPJ Precis Oncol.* 2019;3:7.
9. Vincent T, DeVita J, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 6th edition. 2001.
10. Pitot HC. *The Molecular Biology of Carcinogenesis.* 1993.
11. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbison Patologia Básica*, 9ed. Elsevier. 2013.
12. Strahm B, Capra M. Insights into the molecular basis of cancer development. *Current Paediatrics.* 2005;15(4):333-8.
13. Dias FC. Synergic effect of microRNAs and metalloproteinases derived from extracellular vesicles in the establishment of the metastatic niche in renal cell carcinoma patients: Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto; 2020.
14. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer.* 2009;9(4):239-52.
15. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in genetics : TIG.* 2009;25(1):30-8.
16. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10):a003236.
17. Lodish H, Berck A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. *Molecular Cell Biology*, 6th ed. 2008.

18. GM C. Tumor Suppressor Genes. The Cell: A Molecular Approach 2000; Sunderland (MA): Sinauer Associates.
19. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. Cell. 2004;116(2):235-46.
20. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
22. GLOBOCAN. IARC. 2018.
23. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(12).
24. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. Eur J Cancer. 2018;103:356-87.
25. ROENO. Registo Oncológico Nacional 2010. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE, Porto. 2016.
26. Pina F, Castro C, Ferro A, Bento MJ, Lunet N. Prostate cancer incidence and mortality in Portugal: trends, projections and regional differences. Eur J Cancer Prev. 2017;26(5):404-10.
27. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bolla M, Bourke L, Cornford P, et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology. 2017.
28. Simoes GF, Sakuramoto P, Santos CBd, Furlan NKC, Augusto TM. An Overview on Prostate Pathophysiology: New Insights into Prostate Cancer Clinical Diagnosis. Pathophysiology - Altered Physiological States 2018.
29. Heidenreich A, Bolla M, Joniau S, Kwast THvd, Matveev V, Mason MD, et al. Orientações sobre o Cancro da Próstata. Associação Portuguesa de Urologia
30. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. JAMA. 2017;317(24):2532-42.
31. Bosland MC, Ozten N, Eskra JN, Mahmoud AM. A Perspective on Prostate Carcinogenesis and Chemoprevention. Curr Pharmacol Rep. 2015;1(4):258-65.
32. Shephard RJ. Physical Activity and Prostate Cancer: An Updated Review. Sports Med. 2017;47(6):1055-73.
33. de Bono JS, Guo C, Gurel B, De Marzo AM, Sfanos KS, Mani RS, et al. Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. Nat Rev Cancer. 2020;20(8):455-69.
34. Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. Genes & Development. 2018.
35. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. Genes Dev. 2010;24(18):1967-2000.
36. Chen N, Zhou Q. The evolving Gleason grading system. Chin J Cancer Res. 2016;28(1):58-64.
37. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol. 2016;40(2):244-52.
38. Short E, Warren AY, Varma M. Gleason grading of prostate cancer: a pragmatic approach. Diagnostic Histopathology. 2019;25(10):371-8.

39. Samaratunga H, Delahunt B, Yaxley J, Srigley JR, Egevad L. From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer. *Scand J Urol*. 2016;50(5):325-9.
40. Srigley JR, Delahunt B, Samaratunga H, Billis A, Cheng L, Clouston D, et al. Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. *Pathology*. 2019;51(5):463-73.
41. Zumsteg ZS, Spratt DE, Pei I, Zhang Z, Yamada Y, Kollmeier M, et al. A new risk classification system for therapeutic decision making with intermediate-risk prostate cancer patients undergoing dose-escalated external-beam radiation therapy. *Eur Urol*. 2013;64(6):895-902.
42. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bolla M, Bourke L, Cornford P, et al. EAU - ESTRO - ESUR -SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology. 2017.
43. Hou X, Flaig TW. Redefining hormone sensitive disease in advanced prostate cancer. *Adv Urol*. 2012;2012:978531.
44. Zhu W, Zhu DS, Madan RA, Gulley JL, Figg WD, Dahut WL. Treatment of castration-resistant prostate cancer: updates on therapeutics targeting the androgen receptor signaling pathway. *Am J Ther*. 2010;17(2):176-81.
45. Sabnis AJ, Bivona TG. Principles of Resistance to Targeted Cancer Therapy: Lessons from Basic and Translational Cancer Biology. *Trends Mol Med*. 2019;25(3):185-97.
46. Sharifi N. Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology*. 2013;154(11):4010-7.
47. Wong YN, Ferraldeschi R, Attard G, de Bono J. Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(6):365-76.
48. Schalken J, Fitzpatrick JM. Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2016;117(2):215-25.
49. Génito-Urinário FCdS-GP. *Farmacologia Clínica: Carcinoma da Próstata Resistente à Castração: astellas*; 2018.
50. Trachtenberg J. Emerging pharmacologic therapies for prostate cancer. *Rev Urol*. 2001;3 Suppl 3:S23-8.
51. Azzouni F, Mohler J. Biology of castration-recurrent prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 2012;39(4):435-52.
52. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*. 2015;4(3):365-80.
53. Huang Y, Jiang X, Liang X, Jiang G. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6063-76.
54. Lamoureux F, Zoubeidi A, Gleave ME. Molecular Mechanisms of Castrate Resistant Prostate Cancer. *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective* 2013. p. 43-64.
55. Nakazawa M, Paller C, Kyprianou N. Mechanisms of Therapeutic Resistance in Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2017;19(2):13.
56. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(22):1687-97.
57. Leung JK, Sadar MD. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8.

58. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(6):813-27.
59. Liao RS, Ma S, Miao L, Li R, Yin Y, Raj GV. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):187-96.
60. Mandel A, Larsson P, Sarwar M, Semenas J, Syed Khaja AS, Persson JL. The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Mol Med.* 2018;24(1):34.
61. Karantanos T, Evans CP, Tombal B, Thompson TC, Montironi R, Isaacs WB. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level. *Eur Urol.* 2015;67(3):470-9.
62. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett.* 2006;580(9):2294-300.
63. Vicentini C, Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL, Muzi P, Eleuterio E, et al. Bicalutamide dose-dependently inhibits proliferation in human prostatic carcinoma cell lines and primary cultures. *Anticancer Res.* 2002;22(5):2917-22.
64. Syed Khaja AS, Helczynski L, Edsjo A, Ehrnstrom R, Lindgren A, Ulmert D, et al. Elevated level of Wnt5a protein in localized prostate cancer tissue is associated with better outcome. *PLoS One.* 2011;6(10):e26539.
65. Bitting RL, Armstrong AJ. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(3):R83-99.
66. Rossini A, Giussani M, Ripamonti F, Aiello P, Regondi V, Balsari A, et al. Combined targeting of EGFR and HER2 against prostate cancer stem cells. *Cancer Biol Ther.* 2020;21(5):463-75.
67. Toren P, Zoubeydi A. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: Challenges and opportunities (Review). *Int J Oncol.* 2014;45(5):1793-801.
68. Schodel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur Urol.* 2016;69(4):646-57.
69. Zhao J, Du F, Luo Y, Shen G, Zheng F, Xu B. The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(7):623-33.
70. D'Abronzio LS, Bose S, Crapuchettes ME, Beggs RE, Vinall RL, Tepper CG, et al. The androgen receptor is a negative regulator of eIF4E phosphorylation at S209: implications for the use of mTOR inhibitors in advanced prostate cancer. *Oncogene.* 2017;36(46):6359-73.
71. Schayowitz A, Sabnis G, Goloubeva O, Njar VC, Brodie AM. Prolonging hormone sensitivity in prostate cancer xenografts through dual inhibition of AR and mTOR. *Br J Cancer.* 2010;103(7):1001-7.
72. Squillace RM, Miller D, Wardwell SD, Wang F, Clackson T, Rivera VM. Synergistic activity of the mTOR inhibitor ridaforolimus and the antiandrogen bicalutamide in prostate cancer models. *Int J Oncol.* 2012;41(2):425-32.
73. Wang Y, Mikhailova M, Bose S, Pan CX, deVere White RW, Ghosh PM. Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2008;27(56):7106-17.

74. Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 2007;96(3):408-16.
75. Cho KS, Lee JS, Cho NH, Park K, Ham WS, Choi YD. Gene amplification and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 2008;68(8):803-8.
76. Teixeira AL, Ribeiro R, Cardoso D, Pinto D, Lobo F, Fraga A, et al. Genetic polymorphism in EGF is associated with prostate cancer aggressiveness and progression-free interval in androgen blockade-treated patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3367-71.
77. Teixeira AL, Ribeiro R, Morais A, Lobo F, Fraga A, Pina F, et al. Combined analysis of EGF+61G>A and TGFB1+869T>C functional polymorphisms in the time to androgen independence and prostate cancer susceptibility. *Pharmacogenomics J*. 2009;9(5):341-6.
78. Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):841-9.
79. de Muga S, Hernandez S, Agell L, Salido M, Juanpere N, Lorenzo M, et al. Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol*. 2010;23(5):703-12.
80. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(1):3-20.
81. Chen H, Zhou L, Wu X, Li R, Wen J, Sha J, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:1084-91.
82. Gomez GG, Wykosky J, Zanca C, Furnari FB, Cavenee WK. Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks. *Cancer Biol Med*. 2013;10(4):192-205.
83. Khailany RA, Aziz SA, Najjar SM, Safdar M, Ozaslan M. Genetic biomarkers: Potential roles in cancer diagnosis. *Cellular and Molecular Biology*. 2020;66(3).
84. Monzo M, Navarro A, Ferrer G, Artells R. Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2008;10(10):628-37.
85. Kamel HFM, Al-Amodi H. Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2017;15(4):220-35.
86. Savas S, Liu G, Xu W. Special considerations in prognostic research in cancer involving genetic polymorphisms. *BMC Med*. 2013;11:149.
87. Teixeira ALP. Vias de Sinalização EGF/EGFR-HER2 e TGF β 1/TGF β RII no Desenvolvimento de Neoplasias Malignas Urológicas: Epidemiologia Molecular e Farmacogenómica: Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto; 2014.
88. Patrao AS, Dias F, Teixeira AL, Mauricio J, Medeiros R. XPO5 genetic polymorphisms in cancer risk and prognosis. *Pharmacogenomics*. 2018;19(9):799-808.
89. Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook EH, Jr., et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res*. 2005;65(1):46-53.
90. Leigh-Ann, MacFarlane, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer *Current Genomics*. 2010.

91. Teixeira AL, Dias F, Gomes M, Fernandes M, Medeiros R. Circulating biomarkers in renal cell carcinoma: the link between microRNAs and extracellular vesicles, where are we now? *Journal of kidney cancer and VHL*. 2014;1(8):84-98.
92. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460-9.
93. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of Cellular Physiology*. 2016;231(1):25-30.
94. Dias F, Teixeira AL, Santos JI, Gomes M, Nogueira A, Assis J, et al. Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway. *Pharmacogenomics*. 2013;14(14):1793-803.
95. Mills J, Capece M, Cocucci E, Tessari A, Palmieri D. Cancer-Derived Extracellular Vesicle-Associated MicroRNAs in Intercellular Communication: One Cell's Trash Is Another Cell's Treasure. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24).
96. Adem BF, Bastos NR, Dias F, Teixeira AL, Medeiros R. miRNAs: mediators of ErbB family targeted therapy resistance. *Pharmacogenomics*. 2016;17(10):1175-87.
97. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):321-33.
98. Massillo C, Dalton GN, Farre PL, De Luca P, De Siervi A. Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. *Reproduction*. 2017;154(4):R81-R97.
99. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Di Franco R, et al. Micrnas in prostate cancer: an overview. *Oncotarget*. 2017;8(30):50240-51.
100. Markou A, Zavridou M, Lianidou ES. miRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*. 2016;7:19-27.
101. Ma HP, Kong WX, Li XY, Li W, Zhang Y, Wu Y. miRNA-223 is an anticancer gene in human non-small cell lung cancer through the PI3K/AKT pathway by targeting EGFR. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1549-59.
102. Wei Y, Peng J, He S, Huang H, Lin L, Zhu Q, et al. miR-223-5p targeting ERG inhibits prostate cancer cell proliferation and migration. *J Cancer*. 2020;11(15):4453-63.
103. Weidle UH, Birzele F, Nopora A. MicroRNAs as Potential Targets for Therapeutic Intervention With Metastasis of Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16(2):99-119.
104. Wu Z, Sun H, Zeng W, He J, Mao X. Upregulation of MircoRNA-370 induces proliferation in human prostate cancer cells by downregulating the transcription factor FOXO1. *PLoS One*. 2012;7(9):e45825.
105. Bai T, Liu Y, Li B. LncRNA LOXL1-AS1/miR-let-7a-5p/EGFR-related pathway regulates the doxorubicin resistance of prostate cancer DU-145 cells. *IUBMB Life*. 2019;71(10):1537-51.
106. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 1986;31(4):229-34.
107. Santos JI, Teixeira AL, Dias F, Mauricio J, Lobo F, Morais A, et al. Influence of peripheral whole-blood microRNA-7 and microRNA-221 high expression levels on the acquisition of castration-resistant prostate cancer: evidences from in vitro and in vivo studies. *Tumour Biol*. 2014;35(7):7105-13.

108. Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ, Pearson HB. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12).
109. Razdan A, de Souza P, Roberts TL. Role of MicroRNAs in Treatment Response in Prostate Cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2018;18(10):929-44.
110. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res.* 2009;69(18):7165-9.

Material Suplementar

8. Material Suplementar

Poster apresentado no II Encontro Nacional de Jovens Investigadores da Liga Portuguesa Contra o Cancro- NRN em 24 setembro de 2020.

Influência de mRNA LAT1 derivado de vesículas extracelulares na progressão do cancro colorretal

Cristina Almeida^{1,2}, Ana L Teixeira¹, Francisca Dias¹, Inês Nogueira^{1,2,3}, Vera Machado¹, Bruna Barbosa^{1,2}, Carlos Palmeira^{4,5,6}, Gabriela Martins⁴, Rui Medeiros^{1, 2, 3, 6, 7}

¹ Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto (CI-IPOP), IPO-Porto

² Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS-UP)

³ Departamento de Investigação, Liga Portuguesa contra o Cancro do Norte – Núcleo Regional do Norte (LPCC-NRN)

⁴ Departamento de Imunologia, Instituto Português de Oncologia do Porto (IPOP), IPO-Porto

⁵ Grupo de Patologia e Terapêutica Experimental, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto (CI-IPOP), IPO-Porto

⁶ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa (UFP)

⁷ Faculdade de Medicina, Universidade do Porto (FMUP)

Introdução: O cancro colorretal (CCR) é uma das principais causas de morte por cancro na população ocidental, sendo a nível mundial o terceiro cancro mais frequente. Estudos demonstram que aproximadamente 50% dos casos desenvolvem doença metastática hepática no decurso da doença, o que traduz a necessidade de novos alvos moleculares associados à oncobiologia do CCR, com potencial de serem usados como biomarcadores de prognóstico. Recentemente a literatura evidencia que transportadores de aminoácidos (TAA) são capazes de regular a via de sinalização PI3K/Akt/mTORC1 - central na regulação da proliferação e metabolismo celular de CCR, estando também envolvidos na reprogramação metabólica. Paralelamente, o aumento da expressão dos TAA, LAT1 e ASCT2 tem sido observado em diferentes modelos tumorais, associado ao crescimento, proliferação celular e angiogénese. Atualmente, admite-se que as vesículas extracelulares (VEs) medeiam a comunicação celular e exercem diferente atividade biológica por troca de informação molecular (ácidos nucleicos, proteínas...) a células recetoras, podendo modificar fenótipos celulares e condicionar a progressão tumoral.

Objetivos: Analisar o conteúdo de mRNAs derivados de VEs de uma linha celular de CCR e o seu potencial na modificação do fenótipo celular de uma linha celular de fígado.

Material e Métodos: Como modelo *in vitro* foram usadas as linhas celulares HCT116 (CCR) e SK-HEP1 (hepatocarcinoma). O isolamento de VEs de HCT116 (VEs-HCT116) foi realizado pelo *Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific®)* e validado por TEM. A quantificação dos níveis de mRNA (celulares; Evs-HCT116) de *LAT1*, *ASCT2*, *EGFR*, *HIF1A*, *CXCR4*, *VEGFA* foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. Avaliou-se a expressão dos níveis proteicos de LAT1, ASCT2 e dos níveis de mRNAs do perfil acima mencionado na linha celular SK-HEP1 após *uptake* de VEs-HCT116. O efeito funcional ao nível da proliferação celular (*WST-1 assay kit- ABCAM®*) e *wound healing* foram analisados na linha SK-HEP1.

Resultados: A HCT116 apresenta um aumento de expressão de LAT1 e ASCT2 comparativamente à SK-HEP1, verificando-se níveis aumentados de mRNA *LAT1* ($P=0,001$), *ASCT2* ($P=0,001$), *HIF1A* ($P=0,017$), *CXCR4* ($P<0,001$) e de *VEGFA* ($P<0,001$). Verificamos a presença dos mRNAs *LAT1*, *ASCT2*, *EGFR*, *HIF1A*, *CXCR4*

e *VEGFA* nas VEs-HCT116, sendo que a adição destas originou um aumento da expressão de LAT1 e dos níveis de mRNA de *LAT1* ($P=0,049$) e *VEGFA* ($P<0.001$) na SK-HEP1 após 24 horas de incubação. Este *uptake* resultou também num aumento da proliferação, verificado pelos ensaios de *WST-1* e *wound healing*.

Discussão/Conclusão: Observamos a presença de TAA em VEs-HCT116 e de mRNAs associados a um fenótipo de agressividade, com capacidade de modificar o fenótipo celular da linha recetora. Deste modo, os transportadores LAT1 e ASCT2 analisados poderão ser potenciais novos alvos terapêuticos no CCR.