



O aumento da expressão do MIR-10^a reduz o potencial de proliferação celular no câncer de bexiga.

Autores

SCAPIN, João Junior¹; TEIXEIRA, Natália Araújo²; PIMENTA, Ruan; GUIMARÃES³, Vanessa Ribeiro⁴; REIS, Sabrina Thalita³; LEITE, Katia Ramos Moreira³; VIANA, Nayara Izabel^{3,5}; PIANTINO, Camila Belfort^{3,5,6}.

¹ Estudante de graduação em Biomedicina, UEMG, Passos, MG.

² Estudante de graduação em Ciências Biológicas, UEMG, Passos, MG

³ Doutor em Ciências, USP, São Paulo, SP

⁴ Mestra em Ciências, USP, São Paulo, SP

⁵ Professora, UEMG, Passos, MG

⁶ Professora, Atenas, Passos, MG

Palavras-chave: Câncer de bexiga. MicroRNA. miR-10a.

1. INTRODUÇÃO

O CaB (Câncer de Bexiga) é um tipo tumoral de extrema relevância no âmbito de saúde pública, sendo que os tipos mais comumente encontrados nos indivíduos portadores são: o carcinoma urotelial e o carcinoma de células transcricionais. Alguns fatores tornam pessoas saudáveis propensas a desenvolver determinada doença de cunho tumoral, como por exemplo a idade, o hábito de fumar, mutações genéticas e exposição a substâncias químicas. O tratamento para o CaB geralmente é cirúrgico, sendo a cistectomia uma importante medida terapêutica na tentativa de erradicar a neoplasia. Por mais que exista uma possibilidade de eliminar o tumor, a medida aplicada nem sempre apresenta o sucesso esperado, sendo então imprescindível uma alternativa científica e de custo mais baixo para mitigar o empecilho. Os microRNA's, por sua vez, são pequenos fragmentos de RNA (ácido ribonucleico), que são importantes na regulação da expressão gênica, podendo inibir ou aumentar determinada expressão, atuando como oncomirs ou como supressores tumorais em uma série de tipos de tumor. Esses são

produzidos naturalmente por nosso corpo e uma de suas aplicabilidades é o desenvolvimento de possíveis tratamentos alvo-moleculares. O miR-10a é um microRNA localizado no cromossomo 17q21.32, sendo que tal cromossomo é um membro do agrupamento genético de genes HOX (HOXB e HOXD). Os miR-10a/b importantes papéis no desenvolvimento tumoral. Sua desregulação pode originar a malignidade de diversos tipos cancerígenos, com destaque para o câncer gástrico, tireoidiano e cervical. Além da ação supressora tumoral, este microRNA também participa ativamente de inúmeros processos biológicos, como sua associação ao MYC (genes reguladores e proto-oncogenes que promovem a codificação de fatores de transcrição), HAS3 (associado a síntese de ácido hialurônico) e ao VEGF (promove a formação de vasos sanguíneos). Existem poucos trabalhos avaliando o papel deste microRNA em tumores urológicos. Considerando o seu papel protetivo, o objetivo deste trabalho foi a indução do expressão do miR-10a em uma linhagem celular de câncer de bexiga, denominada T24, para averiguar se esse aumento pode interferir na capacidade de proliferação das células.

2.METODOLOGIA

Transfecção celular com o miR-10a

Para estimular a expressão do miR-10a utilizamos a técnica de transfecção celular, com o mimic específico para este microRNA. Os mimics são pequenos RNAs de fita dupla modificados quimicamente que mimetizam miRNAs endógenos e permitem a análise funcional do miRNA pela regulação positiva da sua atividade.

Os experimentos de transfecção celular foram realizados em triplicata, com o mimic do miR-10a (MH10787) e, com o controle negativo precursor de mRNAs (Ambion, Austin, TX, USA), nos seguintes grupos:

- Linhagem T24; Controle (sem transfecção); miR-10a e miR negativo (scramble).

O complexo de transfecção foi preparado através da diluição do mimic e seu controle em meio OPTI-MEM I. Após essa diluição foi misturada ao agente de transfecção Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, Calrsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O complexo de transfecção foi utilizado em uma concentração final de 20nM. A verificação da transfecção foi realizada por PCR.

Ensaio de Proliferação: Formação de Colônias

As células foram plaqueadas em baixa densidade (300 células/poço), em placas de 12 poços. Após 48 horas, foi realizada a transsecção conforme protocolo descrito. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO² durante 10 dias. Para fixação e coloração, primeiramente as células foram lavadas com PBS, e adicionados 1 mL de cristal violeta 0,2% em metanol e incubadas durante 30 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas para retirar o excesso e foi feita a contagem e medição das colônias com o software Image J. As colônias menores que 1mm não foram contadas.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a transfecção do miR10a, as células T24 apresentaram uma significativa redução na proliferação, quando comparado ao *scramble* (p=0.0181). Os resultados demonstraram que o tratamento com miR10a inibiu a formação de colônias (Figura 1).

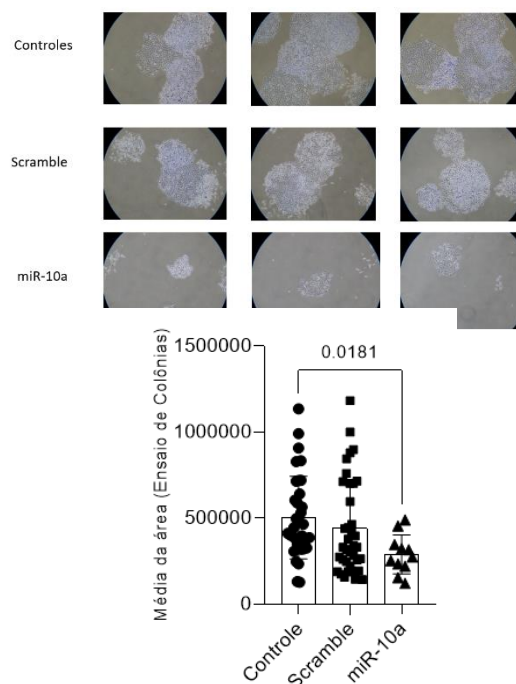


Figura 2. Ensaio de formação de colônias da linhagem T24 avaliando o potencial de proliferação das células tratadas com miR-10a e com o respectivo controle. Aumento 20x

Nos últimos anos, os miRNAs foram estabelecidos como importantes reguladores do desenvolvimento, progressão e metástase do tumor e demonstraram ser úteis para o diagnóstico e classificação de tumores. Além disso, a regulação do miRNA pode representar um novo caminho para o tratamento do câncer em um futuro próximo (Mesenguer, et. al. 2011). A transfecção de miR-10a em células T24 contribui para a diminuição da proliferação das células tumorais. A expressão do miR-10a possibilitou uma regulação negativa, neste caso, ao inibir a

formação de colônias em células de alto grau (T24), atuando como um possível supressor tumoral. Em outros estudos esta relação de supressor de tumor também foi evidenciada. No câncer de próstata (CaP), o aumento da expressão do MiR-10a também foi capaz de inibir a proliferação celular e a capacidade de formação de colônias, como demonstrado no estudo de Mu et. al (2018).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra que a expressão do miR10a pode afetar o metabolismo da célula T24 de CaB, alterando as atividades proliferativas e de migração de forma a reduzir sua capacidade carcinogênica.

5. REFERÊNCIAS

AMORIM, Gelbert Luiz Chamon do Carmo et al. **Aspectos moleculares do câncer de bexiga**. Einstein (São Paulo), v. 9, n. 1, p. 95-99, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008: A incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2008.

Câncer de bexiga: diagnóstico. Revista da Associação Médica Brasileira. 2008;54:100-1.

DALL' OGLIO. Marcos, CRIPPA. Alexandre, SROUGI. Miguel. **Câncer de Bexiga**. 2013. São Paulo -ed. Livraria Santos Editora.

DIP. N, Reis ST, Timoszczuk LS, Viana NI, Piantino CB, Morais DR, et al. **Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile**. J Urol. 2012;188(5):1951-6.

HERR. H, Lee C, Chang S, Lerner S, Group BCC. **Standardization of radical cystectomy and pelvic lymph node**

dissection for bladder cancer: a collaborative group report. J Urol. 2004;171(5):1823-8; discussion 7-8

INSTITUTO ONCOGUIA. Sobre o câncer de bexiga. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/656/120/>>. Acesso em: 25.fev.2021

KHAN, S., Wall, D., Curran, C. et al. **MicroRNA-10a é reduzido no câncer de mama e regulado em parte pelo ácido retinóico**. BMC Cancer 15, 345 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1374-y>

KIRKALI. Z, CHAN T, MANOHARAN. M, ALGABA F, BUSCH C, CHENG L, et al. **Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis**. Urology. 2005;66(6 Suppl 1):4-34.

KNOWLES, Margaret A.; HURST, Carolyn D. **Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity**. Nature Reviews Cancer, v. 15, n. 1, p. 25, 2015.

MARGULIS. VNTORSI , LOTAN Y, MO **Predicting survival after radical cystectomy for**

MONTIE JE, Clark PE, Eisenberger MA, El-Galley R, Greenberg RE, Herr HW, et al. **Bladder cancer**. J Natl Compr Canc Netw. 2009;7(1):8-39.

PILLAI RS. **MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? RNA**. 2005;11(12):1753-61.

XIAOLI Z, Yawei W, Lianna L, Haifeng L, Hui Z. **Screening of Target Genes and Regulatory Function of miRNAs as Prognostic Indicators for Prostate**

Cancer. Med Sci Monit. 2015;21:3748-59

ØROM. UA, Nielsen FC, Lund AH.

MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomalprotein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell
2008;30:460e71