



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Carolina Mie Mioshi

**A SUPEREXPRESSÃO DO MIR-137 REGULA NEGATIVAMENTE A EXPRESSÃO
DA FAMÍLIA P160 E INIBE A CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR EM
LINHAGEM METASTÁTICA DE CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS**

Santo André – SP
2023

Carolina Mie Mioshi

**A SUPEREXPRESSÃO DO MIR-137 REGULA NEGATIVAMENTE A EXPRESSÃO
DA FAMÍLIA P160 E INIBE A CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR EM
LINHAGEM METASTÁTICA DE CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do ABC, Centro de
Ciências Naturais e Humanas, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Me. Ruan Pimenta

Coorientador: Prof. Dr. Arnaldo Santos Jr.

Santo André – SP
2023

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Amelia Mitsue e Wilson Naoji,
que amo incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Kátia Ramos e à Profa. Dra. Sabrina Reis, que me deram a oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa maravilhoso que é o LIM 55. Desde o primeiro dia fui bem recebida e sempre me ofereceram todo o suporte.

A todos do LIM 55 da FMUSP que me auxiliaram e me guiaram durante toda a realização deste trabalho: Ruan Pimenta, Vanessa Schreiter, Vitória Ghazarian, Patrícia Candido, Poliana Romão, Gabriel Arantes, Caroline Chiovatto, Karina Silva e Iran Silva. Além de companheiros de pesquisa, agora são meus amigos. Obrigada a todos os momentos felizes que tivemos dentro e fora do laboratório.

Agradeço, em especial, ao Ruan Pimenta, meu orientador neste trabalho e idealizador deste projeto. Não tive muitos orientadores na vida, mas arrisco dizer que ele pode ser o exemplo de um orientador que todo pesquisador deseja. Atencioso e com uma capacidade invejável de fazer ciência, ele sempre me ajudou ao máximo em todas as minhas dificuldades. Obrigada por tudo, Ru.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em que pude desfrutar de seus laboratórios e seus cantinhos verdes, e, sobretudo, me permitiu conhecer pessoas incríveis.

À Universidade Federal do ABC, que me deu amigos para a vida e muito aprendizado. Espero que a UFABC cresça mais e mais e que os novos alunos possam aproveitar a beleza da interdisciplinaridade.

Aos meus pais, Amelia Mitsue e Wilson Naoji, que sempre me apoiaram em todas as escolhas da vida, me deram conselhos quando precisava e cuidaram de mim. Amo muito vocês.

À minha irmã, Beatriz Emi, que também é minha melhor amiga, pelos momentos felizes em casa ou nas festas que vamos juntas.

Ao meu amor, Pacôme Bernier, que mesmo a 9.402 km de distância sempre apoiou todas as minhas decisões. Je t'aime.

Ao Kenji Kuradomi e à Priscila Silva, que me acolheram e me permitiram ter um trabalho temporário na feira enquanto eu não tinha bolsa. Vocês são pessoas maravilhosas que eu tive muita sorte de conhecer.

Ao Coro da UFABC, pelos momentos de relaxamento durante os ensaios e pelos amigos que pude fazer desde que entrei na Universidade.

Ao Pedro Faria, William Makino, Bruno Paganini, Lucas Trevelin e Rafael Medrano por serem amigos tão queridos e companheiros de banda incríveis que sempre alegram todos os ensaios da glaz.

Aos meus amigos da UFABC, Daniel Mazucanti, Matheus Ianello, Thiago Bruini, Kayo Douglas, Ivan Correa, Husky, João Custódio, Erick Orsi, Ítalo Sandoval, Ana Regina, Caio Comparini, Gabriel Bueno, Cadu Salum, Pedro Araújo, Joyce Abrantes, Julia Roquette, Ana Jussara, Amanda Costa, Pedrinho, Willian Takaracy e muitas outras pessoas incríveis que cruzaram meu caminho (obrigada UFABC por nos obrigar a ter uma rotatividade intensa de colegas de sala). Os momentos com vocês foram muito especiais.

Aos professores incríveis da Biologia, mas também da Neurociência e Ciência e Tecnologia que eu tive o prazer de ter aula: Jesús Mena-Chalco, Mariana Rodrigues, Eterovic, Ives Haifig, Ana Paula de Moraes, Cibele Biondo, Ricardo Lombello, Ricardo Sawaya, Tiago Rodrigues, Danilo Centeno, Marcela Sorelli, Marcella Milazzotto, Adriana Pugliese, Tiago Carrijo, Daniel Miranda, Richard Jacobs, André Cravo, Elisabeth Teodorov e Peter Claessens. Vocês me inspiraram e fizeram com que eu aprendesse de verdade.

RESUMO

Introdução: O Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC) é o tipo mais comum de Carcinoma de Células Renais (CCR) e é responsável por 70% a 80% dos casos da doença. Resistente à quimioterapia e radioterapia, o carcinoma possui elevada taxa de mortalidade desde os anos 1990. Abordagens terapêuticas mais efetivas são extremamente necessárias. Os miRNAs têm se mostrado importantes reguladores do desenvolvimento tumoral, possuindo potencial utilização como terapia adjuvante em cânceres. Este trabalho objetivou avaliar a influência do aumento da expressão do miR-137 através de seu indutor sintético, mimic-miR-137, sobre a expressão dos genes que compõem a família p160 (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) e seu impacto sobre a taxa de migração celular em uma linhagem metastática de CRCC em sítio de pele, Caki-1. **Métodos:** As células foram tratadas com 30 pmol de mimic-miR-137 por 24h, através do método de lipofecção. O RNA total foi extraído e as expressões de miR-137 e dos genes SRC-1, SRC-2 e SRC-3 foram avaliadas através da qPCR. A taxa média de migração foi avaliada através do ensaio de migração após 24h de tratamento com 30 pmol de mimic-miR-137. **Resultados:** O aumento da expressão do miR-137 foi efetivo ($p = 0.0265$). A superexpressão do miR-137 resultou na diminuição da expressão dos genes SRC-1 ($p = 0.0253$), SRC-2 ($p = 0.0119$) e SRC-3 ($p = 0.0004$) na linhagem celular Caki-1. A taxa média de migração celular foi reduzida através da ação do mimic-miR-137 ($p = 0.0021$). **Conclusão:** Inferimos que o miR-137 apresenta potencial terapêutico, uma vez que o seu aumento contribuiu para a regulação de oncogenes e exerceu papel modulador no ensaio de migração celular. Todavia, mais estudos acerca do papel do miR-137 no CRCC devem ser conduzidos para melhor compreensão de seu mecanismo de ação na doença metastática.

Palavras-Chave: Carcinoma Renal de Células Claras; miR-137; família p160.

ABSTRACT

Introduction: Clear cell renal carcinoma (CCRC) is the most common type of renal cell carcinoma (RCC) and accounts for 70% to 80% of cases of the disease. Resistant to chemotherapy and radiotherapy, the disease has had a high mortality rate since the 1990s. More effective therapeutic approaches are extremely necessary. MiRNAs have been shown to be important regulators of tumor development, with potential use as adjuvant therapy in cancers. This study aimed to evaluate the influence of increased expression of miR-137 through its synthetic inducer, mimic-miR-137, on the expression of the genes composing the p160 family (SRC-1, SRC-2, and SRC-3) and its impact on the cell migration rate in a metastatic CRCC cell line in a skin site, Caki-1. **Methods:** The cells were treated with 30 pmol of mimic-miR-137 for 24 hours using the lipofection method. Total RNA was extracted, and the expressions of miR-137 and the genes SRC-1, SRC-2, and SRC-3 were evaluated using qPCR. The average migration rate was assessed using the migration assay after 24 hours of treatment with 30 pmol of mimic-miR-137. **Results:** The increase in miR-137 expression was effective ($p = 0.0265$). The overexpression of miR-137 resulted in the decreased expression of the genes SRC-1 ($p = 0.0253$), SRC-2 ($p = 0.0119$), and SRC-3 ($p = 0.0004$) in the Caki-1 cell line. The average cell migration rate was reduced by the action of mimic-miR-137 ($p = 0.0021$). **Conclusion:** We infer that miR-137 presents therapeutic potential, as its increase contributed to the regulation of oncogenes and exerted a modulatory role in the cell migration assay. However, further studies on the role of miR-137 in CRCC should be conducted to better understand its mechanism of action in the metastatic disease.

Keywords: Clear Cell Renal Carcinoma; miR-137; p160 family.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipo histológico do CRCC.....	14
Figura 2. Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs (adaptado)	17
Figura 3. A família p160 integra sinais que vão além da biologia dos receptores nucleares (adaptado).....	19
Figura 4. Delineamento experimental do trabalho.	26
Figura 5. Níveis de expressão do miR-137 e dos genes da família p160 nas células Caki-1..	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados para a transfecção do mimic-137 e Scramble.	22
Tabela 2. Sondas e ensaios utilizados no estudo.	25

LISTA DE ABREVIACÕES

- CCR** - Carcinoma de Células Renais
- CRCC** - Carcinoma Renal de Células Claras
- cDNA** - DNA complementar
- ceRNA** - RNA endógeno competitivo
- DGCR8** - Região Crítica 8 da Síndrome de DiGeorge
- dNTP** - Desoxirribonucleosídeo trifosfato
- HIF** - Fator Indutor de Hipóxia
- HIF-1 α** - Fator Indutor de Hipóxia 1 α
- HIF-2 β** - Fator Indutor de Hipóxia 2 β
- IPEN** - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- LBCMC** - Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer
- LIM-55** - Laboratório de Investigação Médica 55
- lncRNA** - RNA longo não codificante
- miRNA / miR** – micro RNA
- pVHL** - proteína Von Hippel-Lindau
- RISC** - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
- RNA** - Ácido ribonucleico
- mRNA** - RNA mensageiro
- rpm** - Rotações por minuto
- SFB** - Soro fetal bovino
- SRC-1** - Coativador de Receptores Esteroides 1
- SRC-2** - Coativador de Receptores Esteroides 2
- SRC-3** - Coativador de Receptores Esteroides 3
- VHL** - Von Hippel-Lindau
- PBRM-1** - Proteína polibromo -1
- PI3K** - Fosfatidil-inositol 3-quinase
- Pre-miRNA** - miRNA precursor
- Pri-miRNA** - miRNA primário
- qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
- 3' UTR** - Região não traduzida do terminal 3'

SUMÁRIO

1	Introdução.....	12
1.1	O Carcinoma de Células Renais (CCR) e sua epidemiologia.....	12
1.2	Fatores de Risco do CCR.....	13
1.3	Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC)	13
1.4	Fatores Prognósticos	14
1.5	MicroRNAs.....	15
1.6	MiRNA-137	18
1.7	Família p160	18
2	Objetivos	20
3	Materiais e Métodos	21
3.1	Local e período de realização	21
3.2	Linhagens e cultura celular	21
3.3	Transfecção celular	21
3.4	Extração e quantificação de RNA total.....	22
3.5	Transcrição Reversa (RT).....	23
3.6	Análise de expressão gênica e do miRNA por PCR em tempo real quantitativo	24
3.7	Ensaio de migração.....	25
3.8	Análise Estatística.....	25
3.9	Delineamento experimental	26
4	Resultados	26
4.1	A superexpressão do miR-137 modula negativamente a expressão dos genes que compõem a família p160.....	26
4.2	A indução da expressão do miR-137 retém a migração celular em linhagem metastática de CRCC	28
5	Discussão.....	30
6	Conclusão	32
7	Referências.....	33

1 Introdução

1.1 O Carcinoma de Células Renais (CCR) e sua epidemiologia

O Carcinoma de Células Renais (CCR) é um grupo heterogêneo de tumores malignos que se origina no revestimento do túbulo convoluto proximal, o qual transporta resíduos do sistema circulatório para a urina (1). O CCR compreende de 80% a 90% dos tumores malignos renais e 70% a 80% de todos os tumores renais sólidos (2). Pacientes com a doença localizada ou localmente avançada têm uma taxa de sobrevivência de 5 anos entre 20% e 95%, dependendo de sua extensão. Já pacientes com a doença em metástase têm, para o mesmo período de sobrevivência, uma taxa de 0% a 10% (3).

O CCR, no mundo, representa o sexto câncer mais diagnosticado em homens e o décimo em mulheres. Anualmente, há mais de 140.000 mortes relacionadas ao CCR, sendo a décima terceira causa mais comum de morte por câncer no mundo (4). No Brasil, o estima-se que a incidência seja de 7 a 10 casos para cada 100 mil habitantes (5). O CCR é mais comum em homens acima de 60 anos (6) e tem preponderância de 1,5/1 dos homens sobre as mulheres (7). Sua maior incidência se dá entre a sexta e a oitava décadas de vida (7).

Nas últimas décadas, a incidência global do CCR vem aumentando, colocando-o como líder da mortalidade de cânceres urológicos anual (8). Em países desenvolvidos, esse aumento pode estar ocorrendo parcialmente devido ao crescimento da detecção acidental de massas renais por imageamento abdominal, decorrente de queixas de áreas musculoesqueléticas ou gastrintestinais. Apesar de serem detectados majoritariamente pequenos tumores, uma grande proporção de pacientes é diagnosticada com a doença localizada e em estado avançado, sendo que mais de 17% dos pacientes possuem metástases distantes no momento do diagnóstico (4).

Apesar da crescente detecção precoce do CCR e o uso mais frequente de cirurgia, a taxa de mortalidade não mudou significativamente desde 1990 e 30% dos pacientes com CCR localizado desenvolvem recorrência de metástase no pós-operatório. Terapias adjuvantes atuais para o CCR metastático continuam muito limitadas, uma vez que o carcinoma é, na maioria dos casos, resistente a quimioterapia e radioterapia. Assim, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese do CCR e abordagens terapêuticas mais efetivas são extremamente necessárias (9).

O CCR pode ser dividido em 4 tipos histológicos: células claras, oncocitoma renal, células papilares e cromóforo (1). Cada um dos tipos possui cursos clínicos diferentes, respostas diferentes à terapia e são causados por genes distintos. Pelo menos 17 genes diferentes podem causar o CCR e a mutação destes pode afetar a habilidade da célula de responder a mudanças dos níveis de oxigênio, ferro, nutrientes e, mais notavelmente, no caso de mutações nos genes das enzimas do ácido tricarboxílico (fumarato hidratase e succinato desidrogenase) (3).

1.2 Fatores de Risco do CCR

Diversos fatores de risco, os quais envolvem aqueles adquiridos ou genéticos, foram descritos para o CCR (6). A maioria dos CCRs são esporádicos e vários estudos vêm correlacionando o risco de desenvolver o CCR com alguns fatores. A idade é um fator de risco independente, com a sétima década de vida possuindo o maior risco de desenvolver o CCR (2). Outros fatores de risco incluem obesidade, fumo, hipertensão, uso crônico de analgésicos e diabetes (6).

Apesar de certas síndromes aumentarem drasticamente o risco de desenvolvimento do CCR, elas estão associadas com apenas 3% dos casos da doença. Tais síndromes incluem a síndrome de Von Hippel-Lindau, CCR hereditário papilar, leiomiomatose hereditária e CCR e a síndrome de Birt-Hogg-Dubé (2). Os dois genes mais comuns envolvidos na patogênese do CCR são os genes de Von Hippel-Lindau (VHL) e o gene da proteína polibromo-1 (PBRM-1) (6).

1.3 Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC)

O Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC) é o tipo mais comum e um dos mais agressivos de CCR, responsável por 70% a 80% dos casos da doença (10, 11). A ocorrência desta variedade está relacionada a mutações de genes supressores de tumor (1). O que define o fenótipo histológico "células claras" são os depósitos de glicogênio e lipídio localizados no citoplasma celular (12), como pode ser observado na Figura 1.

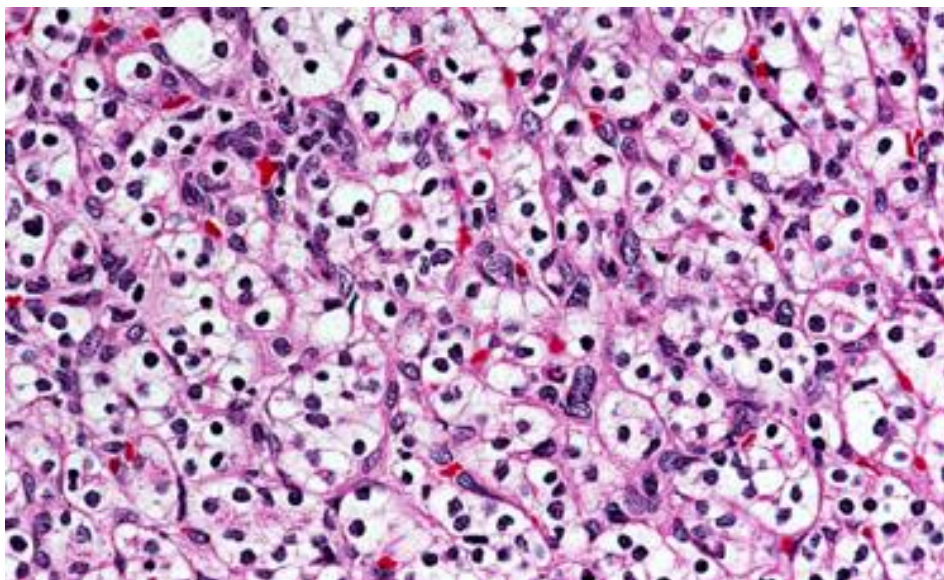


Figura 1. Tipo histológico do CRCC (13).

O carcinoma é geralmente assintomático e mais de um terço dos pacientes têm metástase. O CRCC metastático possui altas taxas de mortalidade devido à baixa resposta à radioterapia e quimioterapia, sendo a cirurgia o principal tratamento (14, 15).

1.4 Fatores Prognósticos

Dentre os fatores prognósticos, Fuhrman *et al.* definiram quatro graus nucleares para classificar e avaliar os tumores de CRCC. Nesta classificação, considera-se o crescimento do núcleo das células tumorais e a proeminência e irregularidade nucleares, sendo, portanto, uma graduação histológica nuclear consistente para a predição do desenvolvimento de metástase após nefrectomia (16). Além da classificação de Fuhrman, a invasão microvascular foi correlacionada à recorrência tumoral e progressão de doença, em que 46% dos indivíduos com invasão microvascular desenvolvem recorrência de CRCC (17).

Uma das primeiras alterações genômicas encontradas no CRCC é a perda do braço curto do cromossomo 3 em cerca de 90% dos tumores (18). O cromossomo 3p25 contém o gene VHL, um supressor tumoral. Este gene foi identificado através de estudos genéticos em uma linha germinal com pacientes portadores da síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), associado ao desenvolvimento do CRCC (19). Tal síndrome é autossômica dominante e neoplásica hereditária. Pacientes que herdam uma única cópia defeituosa do VHL desenvolvem a doença

apenas depois da inativação espontânea ou perda da segunda cópia (alelo selvagem do VHL) (20).

No CRCC esporádico, a perda do braço curto tem sido observada como um acontecimento genético crítico, sendo um dos primeiros eventos no processo de formação do tumor (21). A maioria dos casos de CRCC esporádico apresenta aberrações somáticas do gene VHL (15). Essas aberrações podem incluir a inativação da cópia selvagem do gene VHL restante por mutação somática, hipermetilação ou deleção (14).

O VHL é um gene supressor tumoral relacionado com o monitoramento de oxigênio e energia nas células, além de estar diretamente relacionado à degradação do Fator Indutor de Hipóxia (HIF). Existem funções da pVHL que não estão relacionadas ao HIF, como por exemplo: a formação e regulação da matriz extracelular, estabilização de microtúbulos e manutenção de cílios primários, regulação da apoptose, controle da senescência celular e regulação transcricional (22).

1.5 MicroRNAs

Estudos recentes têm demonstrado como microRNAs (miRNA ou miR) aberrantemente expressos podem ser marcas registradas de diversas patologias, como o câncer. Traçar o perfil de expressão de miRNAs tem sido associado ao desenvolvimento tumoral e com a progressão e resposta à terapia, sugerindo sua utilização no diagnóstico e prognóstico, bem como biomarcadores preditivos não invasivos (10, 11). Além disso, os miRNAs podem ser utilizados em monoterapia ou terapia adjuvante no câncer (23). O tamanho pequeno desses RNAs permite com que sejam mais estáveis quando comparados aos mRNA, podendo ser detectados em tecidos fixados ou fluídos biológicos (11).

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que contêm cerca de 22 nucleotídeos, podendo ser encontrados em animais, plantas e alguns vírus (19). Tem como função a regulação pós-transcricional da expressão de genes, atuando em diferentes funções biológicas e possuindo implicações patológicas. Os miRNAs agem como moduladores da expressão de genes em diversas doenças e particularmente no câncer, no qual agem através da repressão de genes, os quais, por sua vez, são críticos para a carcinogênese (24). Essas moléculas executam sua função através da alteração da expressão de oncogenes ou genes supressores de tumor, os quais podem promover ou inibir a progressão do tumor, dependendo de seus alvos ou do contexto em que

está inserido (25, 26). Cada miRNA tem como alvo centenas de mRNA e mais de 30% dos genes humanos são alvos de miRNAs, o que significa que essas moléculas têm um impacto global em transcriptomas e proteomas de eucariotos (27). Sabendo isso, o estudo de um miRNA no contexto de um câncer seria mais eficaz e menos nocivo ao paciente, quando comparado à regulação de dezenas de transcritos (28).

A biogênese dos miRNAs tem início no núcleo da célula, onde ocorre a sua transcrição através da RNA polimerase II ou III (29, 30). O resultado é um transcrito primário chamado pri-miRNA, o qual possui pelo menos uma estrutura com a conformação de “grampo de cabelo” (cadeia de dupla fita com uma alça). Ainda no núcleo, os pri-miRNA são clivados por um complexo proteico que consiste na proteína Drosha e DGCR8 (24, 31). Como resultado desse processamento são formados os pre-miRNAs, os quais possuem a mesma estrutura, porém são menores que os pri-miRNAs, contendo cerca de 85 nucleotídeos (32, 33).

O pre-miRNA é então transportado ao citoplasma da célula através da exportina-5 (34). A ribonuclease citoplasmática RNase III Dicer cliva e remove as alças dos pre-miRNAs, transformando-o em um duplex de miRNA, sendo que cada fita possui cerca de 20 a 22 nucleotídeos (24, 35). A última etapa de processamento envolve o complexo de ribonucleoproteína, conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o qual desenrola as duas fitas (35). Apesar de qualquer uma das duas fitas do duplex de miRNA terem potencial para agir como um miRNA maduro, geralmente apenas uma das fitas é incorporada ao complexo RISC para a indução do silenciamento do mRNA (36). Proteínas da família argonauta promovem a junção do RISC com o miRNA, mediando o reconhecimento do mRNA alvo pelo miRNA (35, 37). O silenciamento do mRNA pode ser feito por repressão traducional, degradação direta ou ativação traducional (24, 38) (Figura 2).

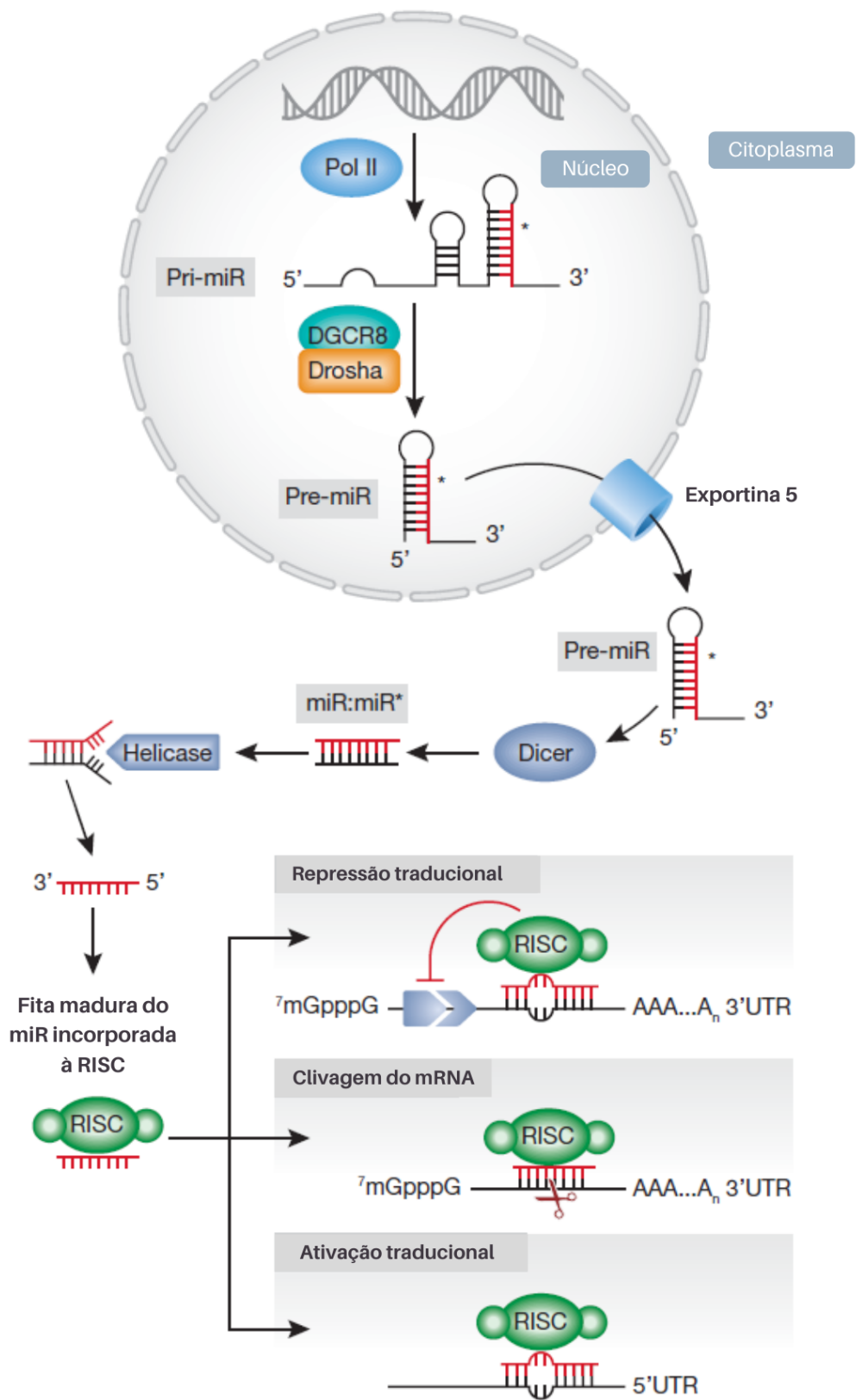


Figura 2. Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs (adaptado) (38).

1.6 MiRNA-137

O miR-137 é subexpresso em diversas doenças malignas humanas, como no câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de estômago, câncer colorretal e no câncer de mama. Quando restaurada a sua expressão, o miR-137 inibe o crescimento do câncer, induz a apoptose e suprime a invasão celular no CRCC (39). O gene do miR-137 está localizado no cromossomo 1p22 em uma região do gene de RNA não codificante. Está inserido em uma ilha CpG e é frequentemente silenciado por metilação em inúmeros tumores (40).

O miR-137 é um potente supressor da família p160, exercendo atividade antiproliferativa significativa no câncer de mama, de próstata e no melanoma uveal. Silenciado epigeneticamente em células cancerígenas, o miR-137 ou outras terapias genéticas podem ser utilizadas para a reativação de sua expressão, sendo um potencial tratamento alvo-molecular (41). No CRCC o miR-137 suprime a progressão tumoral e metástase, sendo ele um miRNA supressor tumoral (25). Apesar da ação antitumoral do miR-137 no CCR ser documentada, o mecanismo que leva a esse efeito permanece em grande parte desconhecido devido à falta de informações referentes aos seus alvos moleculares (42).

1.7 Família p160

A família p160 ou os chamados coativadores de receptores de esteroides compreendem 3 correguladores pleiotrópicos: SRC-1, SRC-2 e o SRC-3, também conhecidos como NCOA1, NCOA2 e NCOA3, respectivamente. Essa família modula uma ampla variedade de respostas fisiológicas e clinicopatológicas, podendo se ligar a domínios de vários receptores nucleares e atuar como coativadores transcrpcionais. A estrutura complexa desse grupo de proteínas permite o controle de sinais de receptores nucleares e não-nucleares (43, 44). Elas podem ser coativadoras primárias, as quais transmitem o sinal de ativação transcrricional dos receptores nucleares para correguladores secundários, que por sua vez ativam a maquinaria transcrricional para a transcrição do gene alvo (43).

Os membros da família p160 possuem características em comum, contendo 60% de similaridade uns com os outros, mas também propriedades moleculares e papéis fisiológicos únicos. São amplamente expressos em diferentes tipos celulares e funcionam como os

principais reguladores do crescimento e proliferação celular durante o crescimento normal e anormal (44, 45).

Os três membros da família p160 possuem o domínio básico helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS), que consiste em uma sequência bHLH seguida continuamente por domínios PAS (43, 46). As proteínas deste domínio possuem fatores pleiotrópicos como com o HIF-1 α e o HIF-1 β . Localizado nos primeiros 380 aminoácidos de cada SRC, o domínio bHLH-PAS é a região mais conservada partilhada entre os três correguladores. Cada membro da família p160 possui domínios funcionais complexos, compreendendo diversas superfícies para interações proteína-proteína. Esta característica permite que a família p160 possua potencial para agir como integradora multifuncional de diversos sinais, indo muito além da biologia dos receptores nucleares (Figura 3) (43).

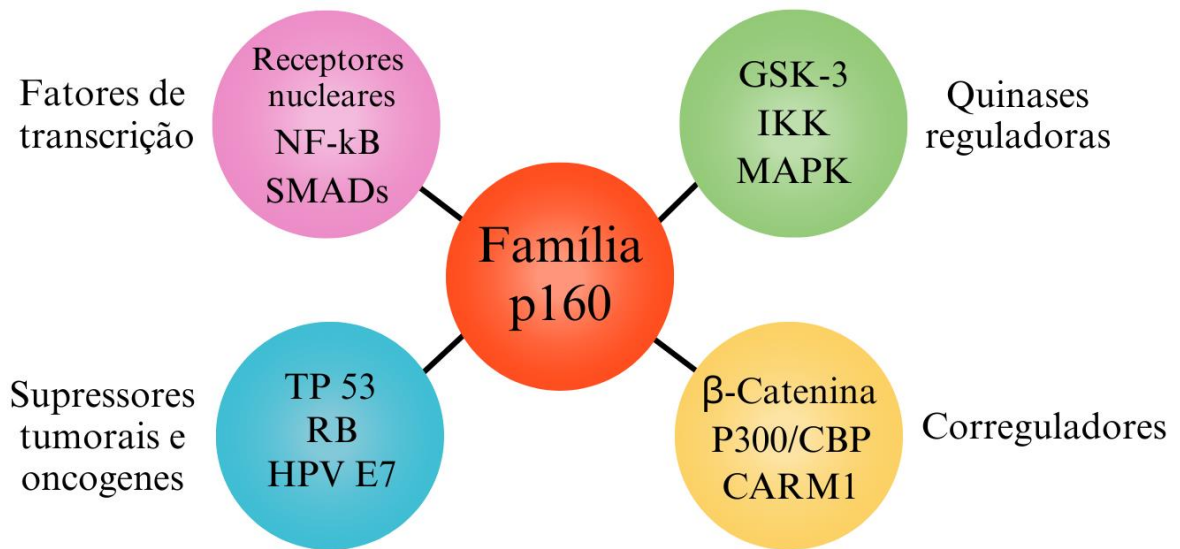


Figura 3. A família p160 integra sinais que vão além da biologia dos receptores nucleares (adaptado) (43).

Apesar de ter sido originalmente descoberta e nomeada de acordo com a sua capacidade de mediar a atividade transcricional de receptores esteroides em tecidos endócrinos, a família p160 tem se mostrado superexpressa também em neoplasias malignas não endócrinas. Além disso, participam de transcrições desencadeadas por diversos outros fatores de transcrição de receptores não-esteroides (41).

Os coativadores p160 estão conectados a mais de 75% da expressão de todos os genes. Seus papéis genéticos regulatórios variam para cada membro da família, sendo o SRC-1 dedicado aos genes do metabolismo de carboidratos, o SRC-2 aos genes do metabolismo lipídico e o SRC-3 aos genes de resposta anabólica e de crescimento (47). Os três membros da família p160 estão frequentemente superexpressos em diferentes cânceres e agem como reguladores transcricionais primários da atividade de fatores de transcrição necessários para a proliferação, sobrevivência, motilidade, invasão, metástase e para o metabolismo celular (45).

Apesar de seus papéis críticos no câncer, a família p160 não recebeu muita atenção como alvo de drogas, uma vez que há falta de sítios naturais de ligação para ligantes que conseguem ser inibidos por moléculas pequenas. Já foi mostrado que alguns compostos naturais podem exercer efeitos inibitórios no SRC-1 e SRC-3, sugerindo que a inibição de alguns membros da família pode ser possível. Entretanto, devido aos seus papéis sobrepostos e suas funções complementares, seria desejável que os 3 membros da família p160 fossem alvos de forma simultânea (41).

Este trabalho visa a investigação da influência do aumento do miR-137 sobre as expressões dos genes SRC-1, SRC-2 e SRC-3, utilizando a linhagem celular Caki-1. Hipotetizamos que o aumento do miR-137 possa regular negativamente a expressão dos oncogenes pertencentes à família p160, reduzindo a progressão do CRCC. Um miRNA com múltiplos alvos pode oferecer potencial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes contra neoplasias.

2 Objetivos

Avaliar a influência do aumento da expressão do miR-137 sobre a expressão da família p160 na linhagem celular Caki-1.

Analisar a influência da expressão induzida de miR-137 sobre o ensaio de migração celular na linhagem Caki-1.

3 Materiais e Métodos

3.1 Local e período de realização

Este trabalho foi integralmente realizado no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM 55) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre os meses de janeiro a agosto de 2022.

3.2 Linhagem e cultura celular

Para este projeto foi utilizada a linhagem celular Caki-1, a qual é uma linhagem metastática de CRCC em sítio de pele. As células foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Maria Helena Bellini do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer (LBCMC). As células foram acondicionadas em placas de cultura de 25 cm² contendo o meio de cultura McCoy's. O meio foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica e antimicótica a 1%. As placas foram mantidas em estufa para cultura contendo atmosfera úmida composta por 95% de ar, 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. A manutenção das placas foi realizada semanalmente, realizando o repique caso a placa possuísse confluência de 80%. A estocagem das células foi feita a -80°C.

3.3 Transfecção celular

Para a realização deste ensaio, foram criados 3 grupos: Célula, Scramble e miR-137, com um n = 6 para cada grupo. Nas células com tratamento, foram transfectados 30 pmol de mimic-miR-137, e nas células do grupo Scramble, o Pré-miR-Precursor Negative Control (Ambion, Austin, TX, USA). Os mimics de miRNA são moléculas sintetizadas artificialmente que mimetizam miRNAs endógenos maduros. O mimi-miR-137 e o Pré-miR-Precursor Negative Control foram diluídos em 50µL de meio OPTI-MEM I em tubos distintos em uma concentração final de 0.6 µM (3 µL da solução de 10 µM). A seguir, 3 µL dos agentes de transfecção Lipofectamina RNAiMax (INVITROGEN, Calrsbad, CA, USA) foram diluídos em 50µL de meio OPTI-MEM I. Os reagentes utilizados para atransfecção estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes utilizados para a transfecção dos grupos mimic-137 e Scramble.

Reagentes	Identificação dos Ensaios
Mimic-miR-137	MC10513
Pré-miR-Precursor Negative Control	AM-17110 (AMBION)
OPTI-MEN I Reduced Serum Medium	31985-062 (Invitrogen)
Lipofectmina-RNAiMAX	13778-150 (Invitrogen)

As diluições do mimic-137 e do agente de transfecção foram combinadas, homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para a formação do complexo de transfecção. Em uma placa de 24 poços com cerca de 5×10^4 células aderidas/poço e 450 μL de meio Mccoy's sem suplementação, foram adicionados 50 μL dos complexos de transfecção ou 50 μL de meio OPTI-MEM no caso do grupo célula. A confirmação da eficiência da transfecção foi realizada por qPCR.

3.4 Extração e quantificação de RNA total

A extração de RNA total foi realizada com o kit de isolamento miRVana®miRNA (Ambion, Austin, Tx), seguindo as recomendações e protocolo do fabricante. Primeiramente, a solução de eluição (água livre de RNase) foi pré-aquecida a 95 °C. Foram adicionados às amostras 300 μL de solução de lise e 30 μL do aditivo homogeneizador, realizando em seguida a homogeneização em vórtex.

As amostras foram então incubadas no freezer a -20°C por 4 min. Passado o tempo de incubação, 500 μL de fenol clorofórmio foram adicionados, homogeneizados no vórtex de 30 s a 1 min e então centrifugados por 5 min a 13.000 rpm. Depois deste processo, houve a separação da fase aquosa e da fase orgânica. A fase aquosa (fase superior) foi transferida cuidadosamente para um novo tubo eppendorf, sem que houvesse contato com a fase inferior. O volume retirado

foi anotado. Um terço de etanol 64% deste volume foi adicionado ao novo tubo. 700 µL da mistura lisado mais etanol foi pipetado na coluna (filtro + tubo de coleta).

Em seguida, a coluna foi centrifugada por 30 s a 13.000 rpm. O filtrado foi descartado. Caso houvesse mais de 700 µL da mistura lisado + etanol, repetir o processo anterior: pipetar a mistura na mesma coluna e depois centrifugar por 30 s a 13.000 rpm. Para começar o processo de lavagem, 700 µL da solução de lavagem 1 foi pipetada na coluna e então centrifugada por 30 s a 13.000 rpm. O filtrado foi descartado. 500 µL da solução de lavagem 2/3 foi pipetada na coluna e centrifugada por 30 s a 13.000 rpm. O filtrado foi descartado. A lavagem foi repetida com a solução de lavagem 2/3. O filtrado foi descartado novamente. Em seguida, a coluna sem solução de lavagem foi centrifugada durante 1 min a 13.000 rpm para remoção de possíveis resíduos. O filtro foi então passado para um novo tubo de coleta. Nesta nova coluna, 50 µL da solução de eluição pré-aquecida a 95°C foi pipetada. Esta coluna foi centrifugada por 30 s a 13.000 rpm. A quantificação e avaliação da pureza do RNA extraído foram realizadas através do espectrofotômetro Nanodrop® (ND1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

3.5 Transcrição Reversa (RT)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir da amostra contendo o miRNA ou mRNA alvo, através da enzima transcriptase reversa. Para o cDNA do miRNA, foi utilizado o *TaqMan® miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)*. Primeiramente, as concentrações das soluções com as amostras foram padronizadas. Assim, 200 ng/µL de miRNA foi diluído em 20 µL de água. Deste volume, 3 µL foram submetidos à transcrição reversa, no qual foram adicionados 7 µL de mix contendo os reagentes do kit: 0,15 µL de dNTP mix, 0,5 µL da enzima transcriptase reversa, 1,5 µL do tampão da enzima, 0,19 µL de inibidor de RNase, 3,66 µL de água livre de nuclease e 1 µL de primer stem-loop contendo uma sequência específica para os miRNA, totalizando 10 µL de cDNA. A reação foi realizada no equipamento PCR Veriti® (Applied Biosystem, Foster City, CA), passando pelas seguintes etapas: 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C e 5 min a 85 °C.

A síntese do cDNA de mRNA foi realizada utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems)* que utiliza a Transcriptase Reversa Multiscribe™ e primers randômicos. O RNA total foi diluído em água livre de nucleases em um volume final de 20 µL e concentração de 500 µL/ng. A este volume foram acrescentados 4

μL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 μL do mix de dNTPs (25X), 4 μL do tampão da enzima (10X), 2 μL da enzima transcriptase reversa e 8,4 μL de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min) no termociclador *Veriti® (Applied Biosystems)*. Ao final das reações, ambos os cDNAs foram armazenados a -20 °C até seu uso.

3.6 Análise de expressão gênica e do miRNA por PCR em tempo real quantitativo

As expressões dos RNAs alvo foram avaliadas a partir do cDNA sintetizado pela transcrição reversa, através da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Foi utilizado o sistema ABI 7500 Fast RT-PCR no modo *standard* e o *Master Mix PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA)*.

Para a amplificação dos fragmentos desejados, as reações foram realizadas com 0,5 μL de uma solução contendo um par de primer e a sonda (com a marcação), 5 μL do TaqMan Master Mix, 3,5 μL de água nuclease free e 1 μL de cDNA, somando um total de 10 μL para cada reação. As condições das reações foram: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 45 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C.

O protocolo TaqMan® utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação, a qual se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta dupla marcação é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. No decorrer dos ciclos da PCR, em específico na etapa de alongação do DNA, a sonda é quebrada pela Taq polimerase. A quebra da sonda faz com que o *quencher* se afaste do fluoróforo, não mais absorvendo sua luz. A luz emitida pelo fluoróforo pode ser quantificada através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. As condições das reações foram: 2min a 50°C, 10min a 95°C e 45 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as reações foram realizadas em duplicata, em que o RNU48 foi usado como controle endógeno para miRNA e a B2M para os mRNA.

A quantificação de luz emitida pelo fluoróforo permite a quantificação indireta do RNA alvo após cada ciclo da PCR. Os níveis de expressão dos genes-alvos foram obtidos pela quantificação relativa e pelos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

As expressões dos RNAs foram analisadas com o auxílio de sondas de sequências específicas, as quais estão contidas na Tabela 2.

Tabela 2. Sondas e ensaios utilizados no estudo.

Genes e miRNAs	Ensaio	Marca
SRC-1	Hs00186661_m1	Applied Biosystems
SRC-2	Hs00896109_m1	Applied Biosystems
SRC-3	Hs00180722_m1	Applied Biosystems
miR-137	001129	Applied Biosystems
RNU48	HS00984230	Applied Biosystems
B2M	1006	Applied Biosystems

3.7 Ensaio de migração

Em um poço de uma placa de 24 poços contendo confluência celular de 80%, um risco foi feito com a ajuda de uma ponteira de 200 µL. Os poços foram então fotografados em 0h e 24h. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do software (Image J – opção *Freehand selections*), a partir da medida de distância do risco, utilizando a fórmula: $(D_{final} - D_{inicial}) / (D_{inicial}) \times 100 = \%$, sendo "D" a medida da distância entre as bordas do risco.

3.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9.0. O teste Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade dos dados. O teste One-way ANOVA foi utilizado para a comparação entre mais de dois grupos. O teste t de Student e o teste Mann-Whitney foram utilizados para comparar o perfil de expressão dos miRNAs e dos genes, entre duas variáveis. Para todas as análises estatísticas, consideramos o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.9 Delineamento experimental

A figura 4 esquematiza o delineamento experimental deste trabalho.

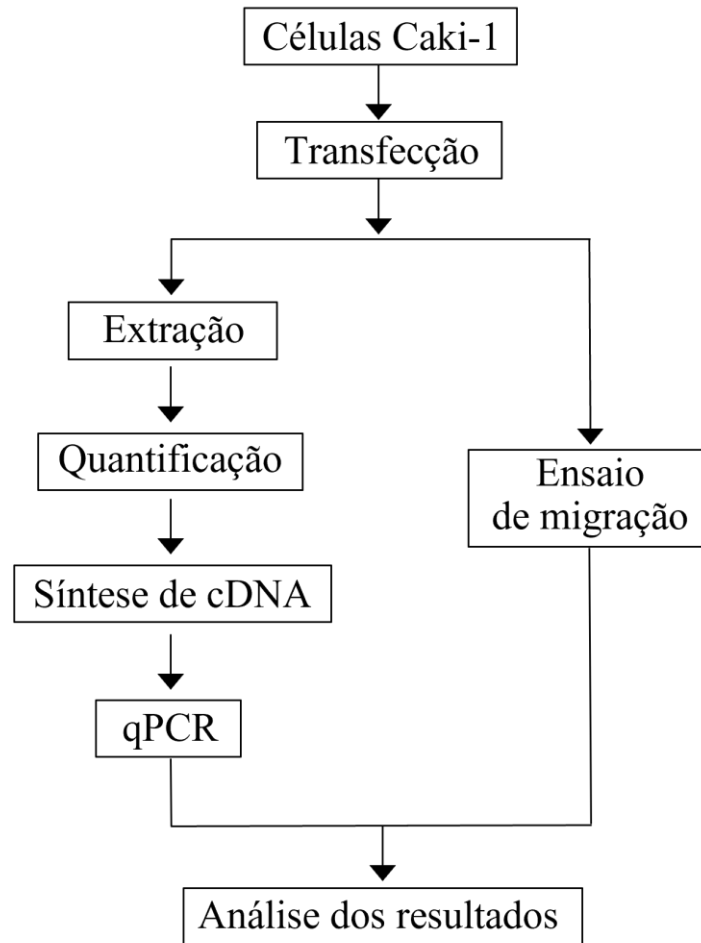


Figura 4. Delineamento experimental do trabalho.

4 Resultados

4.1 A superexpressão do miR-137 modula negativamente a expressão dos genes que compõem a família p160

O aumento da expressão do miR-137 modulou negativamente a expressão dos genes SRC-1, SRC-2 e SRC-3. Após a transfecção com miR-137 nas células Caki-1, a expressão deste miRNA estava aproximadamente 4 mil vezes maior quando comparado ao Scramble ($p = 0.0265$, Fig. 5a). Os níveis de expressão dos genes da família p160 (SRC-1, SRC-2 e SRC-3)

foram analisados após a transfecção com o miR-137. Todos os membros da família p160 apresentaram sua expressão reduzida significativamente nas células Caki-1. SRC-1 ($p = 0,0253$; Fig. 5b), SRC-2 ($p = 0,0119$; Fig. 5c), SRC-3 ($p = 0,0004$; Fig. 5d).

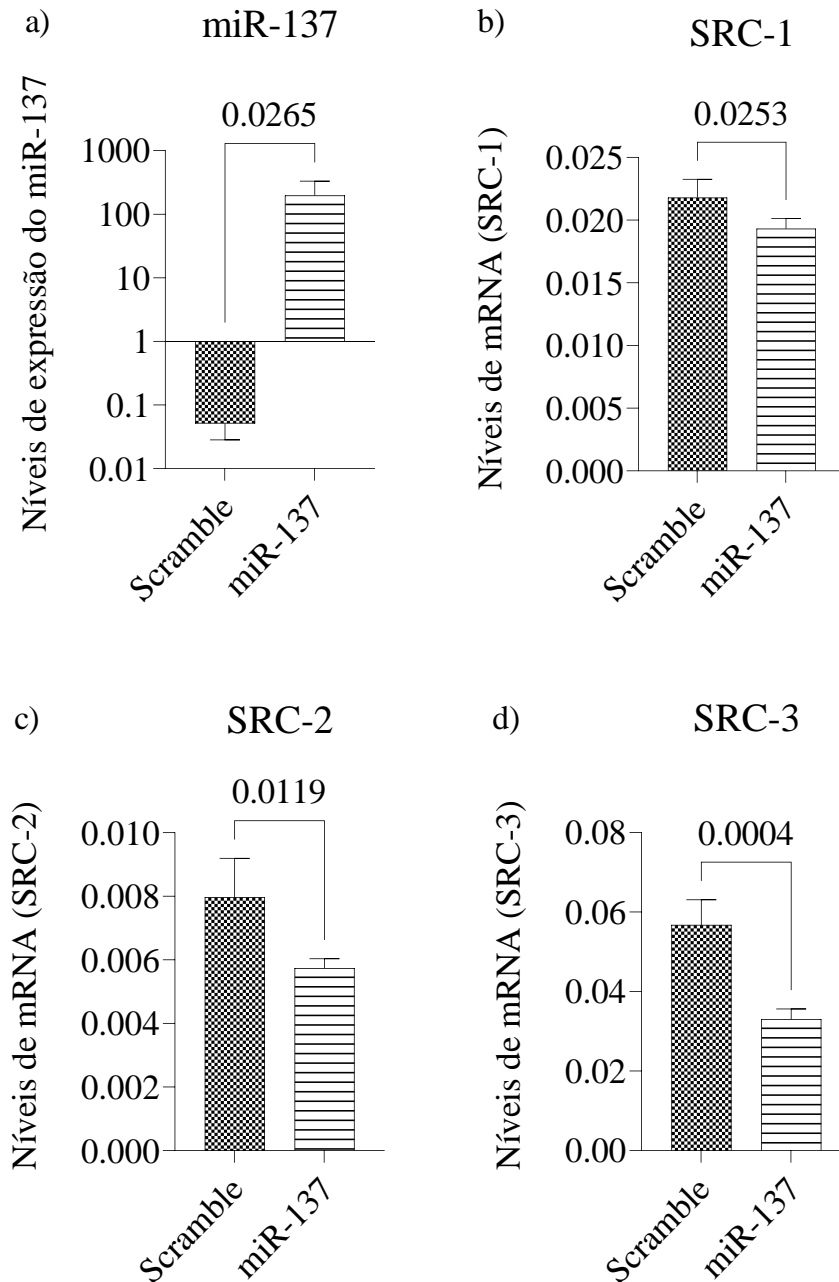


Figura 5. Níveis de expressão do miR-137 e dos genes da família p160 nas células Caki-1. **a)** Nível de expressão de miR-137 nas células transfectadas com mimic-137. **b)** Nível de expressão do gene SRC-1 pós transfecção com miR-137. **c)** Nível de expressão do gene SRC-2 pós transfecção com miR-137. **d)** Nível de expressão do gene SRC-3 pós transfecção com miR-137. Os genes da família p160 tiveram sua expressão reduzida significativamente com a indução da expressão do miR-137.

4.2 A indução da expressão do miR-137 retém a migração celular em linhagem metastática de CRCC

Após o aumento da expressão do miR-137 e da consequente redução dos genes que compõe a família p160, observamos, no ensaio de migração, que as células transfectadas com miR-137 obtiveram uma taxa de migração significativamente menor quando comparadas com o Scramble ($p = 0,0021$; Fig. 6).

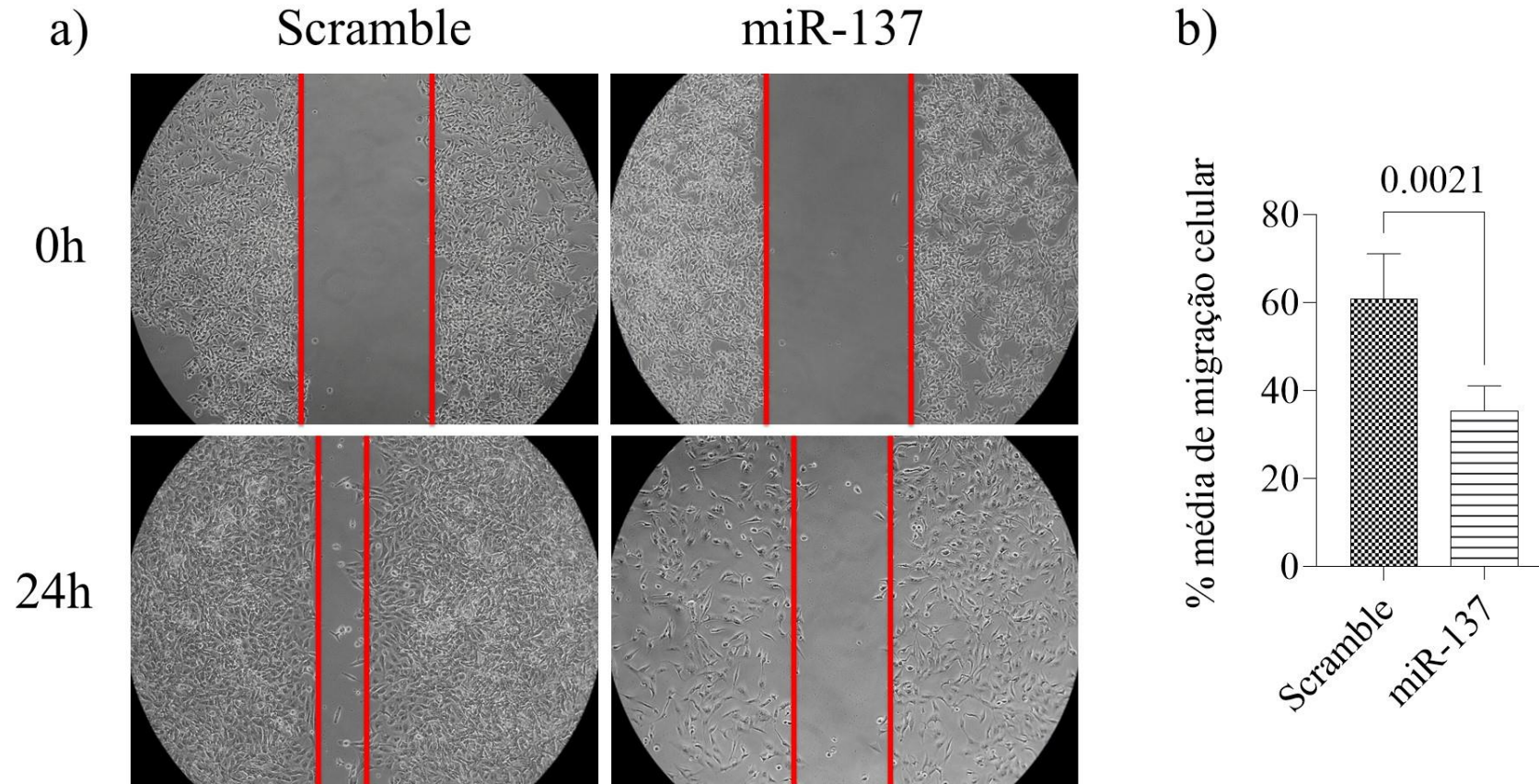


Figura 6. Resultados do ensaio de migração realizado com a linhagem Caki-1 após o tratamento com miR-137. **a)** Riscos realizados no grupo Scramble e nas células transfectadas com mimic-137 após 0h e 24h. **b)** Gráfico da taxa média de migração das células no grupo Scramble e nas células transfectadas com o mimic-137. A taxa de migração foi reduzida significativamente após o tratamento com miR-137 ($p = 0,0021$).

5 Discussão

O CRCC é o tipo mais comum e agressivo de CCR, podendo ter origem hereditária (3%) ou esporádica (97%) (2). Resistente à quimioterapia e radioterapia, o carcinoma necessita de terapias adjuvantes mais efetivas, uma vez que 30% dos pacientes apresentam recidiva no pós-operatório (9). Na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos na patogênese de diversos cânceres, os miRNAs ganharam amplo interesse por apresentarem papéis importantes no desenvolvimento tumoral, possuindo potencial para sua utilização como biomarcadores moleculares e por seus possíveis papéis terapêuticos (10, 11). Neste trabalho, demonstramos que a indução da expressão do miR-137 foi capaz de modular negativamente a expressão da família p160 e conter a migração celular.

Alguns estudos já investigaram os mecanismos de ação do miR-137 no contexto do CRCC. Segundo Zhang e Li, o miR-137 está subexpresso em tecidos com CCR e em linhagens de CCR e atua como supressor tumoral inibindo a ativação de fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) (9). Zhao *et al.* mostraram que o lncRNA SNHG1 regula a ativação do miR-137 através do mecanismo de ceRNA (RNA endógeno competitivo), sequestrando-o. A indução do miR-137, nesse estudo, mostrou ser eficiente na reversão do efeito tumoral do SNHG1 (48). Zhou *et al.* demonstram que, de forma similar, o lncRNA NNT-AS1 atua como um ceRNA, agindo como uma esponja para o miR-137 e modulando sua expressão. O miR-137 tem como alvo direto o oncogene YBX-1. Quando o miR-137 é induzido, a expressão deste oncogene é reduzida significativamente (25). Corroborando com os dados apresentados na literatura (9, 25, 48), após a indução da expressão do miR-137 e a consequente subexpressão da família p160, observamos outro possível mecanismo de ação alinhado com tais dados, no qual também há supressão da progressão tumoral.

Inoue e Inazawa, Zhang e Li e Zhao *et al.* mostraram que o miR-137 tem sua expressão reduzida no CRCC (9, 48, 49). Quando um miRNA está subexpresso no câncer, o método de indução ou restauração do miRNA em questão é bem documentado, como podemos observar nos trabalhos de Inoue e Inazawa, Abd-Aziz *et al.*, Zhang e Li e Jansson e Lund (9, 49-51). Em nosso trabalho, o miR-137 foi induzido com eficiência na linhagem Caki-1 através da transfecção pelo método da lipofecção. Nossos resultados mostraram que o gene SRC-3 foi aquele que apresentou maior significância estatística com o tratamento do miR-137, comparado aos genes SRC-1 e SRC-2. Este dado corrobora com resultados obtidos por Eedunuri *et al.*, os

quais demonstraram o potente poder de redução da expressão de SRC-3 pelo miR-137 comparado aos outros genes da família p160, contudo, em um contexto do câncer de próstata (41). Os pesquisadores explicam este dado através da presença de 3 regiões de reconhecimento do miR-137 na região 3'UTR do gene SRC-3. Assim, é possível que este mecanismo também ocorra no contexto do CRCC. Também no câncer de próstata, nosso grupo de pesquisa obteve uma redução significativa dos genes da família p160 após a indução do miR-137, *in vitro* e *in vivo* (52).

Nossos resultados mostraram uma taxa média de migração reduzida após o tratamento com o miR-137. Esses dados são consistentes com os estudos de Zhang e Li e Sang *et al.*, os quais também mostraram redução da taxa média de migração após o tratamento com miR-137 em células de CRCC (9, 42). O ensaio de migração torna possível, de forma simples, o estudo do potencial metastático da linhagem celular em questão, avaliando, assim, uma das importantes marcas registradas dos cânceres, segundo Hanahan (53, 54).

Em nosso trabalho, os experimentos de expressão gênica e o ensaio de migração celular foram realizados na linhagem Caki-1, pertencente a um sítio metastático de pele. Leite *et al.*, do nosso grupo de pesquisa, já demonstrou que miRNAs, como o miR-100, podem ter sua função dependente de seu contexto, isto é, o miRNA pode atuar como um supressor tumoral ou oncomir, dependendo do estágio de progressão do tumor (55). É importante, portanto, a realização de estudos experimentais que envolvam linhagens celulares com diferentes perfis.

Diante de diversos mecanismos do miR-137, este trabalho demonstra outra possível via de ação do miR através da inibição da família p160, a qual corrobora com o papel supressor tumoral no CRCC. Com a superexpressão do miR-137, os genes SRC-1, SRC-2 e SRC-3 obtiveram a sua expressão reduzida significativamente. Além disso, a migração celular da linhagem Caki-1 foi retida com o tratamento do miRNA, igualmente demonstrado por outros pesquisadores (9, 42). Este trabalho traz uma investigação inicial sobre o papel do miR-137 nos genes da família p160. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para analisar se a atuação do miR-137 é contexto dependente. Nossos resultados podem indicar um potencial terapêutico para o miR-137, o qual poderia ser combinado com outras terapias que inibem a proliferação e o crescimento de células malignas.

6 Conclusão

O aumento da expressão do miR-137 resultou na redução da expressão dos genes SRC-1, SRC-2 e SRC-3, além de reduzir a taxa média de migração celular das células Caki-1. Este trabalho traz uma investigação inicial sobre a ação do miR-137 no contexto do carcinoma, oferecendo perspectivas de novas terapias alvo-moleculares para o CRCC. Todavia, mais estudos acerca do papel do miR-137 no CRCC devem ser conduzidos para melhor compreensão de seu mecanismo de ação na doença metastática.

7 Referências

1. GAO, H.; LI, Y.; LIN, T.; CHENG, Y. *et al.* Downregulation of CIP2A inhibits cancer cell proliferation and vascularization in renal clear cell carcinoma. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, 164, n. 2, 2020 Jun 2020.
2. HANCOCK, S. B.; GEORGIADES, C. S. Kidney Cancer. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, 22, n. 6, 2016 Nov/Dec 2016.
3. LINEHAN, W. M.; SCHMIDT, L. S.; CROOKS, D. R.; WEI, D. *et al.* The Metabolic Basis of Kidney Cancer. **Cancer discovery**, 9, n. 8, 2019 Aug 2019.
4. CAPITANIO, U.; BENSALAH, K.; BEX, A.; BOORJIAN, S. A. *et al.* Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. **European urology**, 75, n. 1, 2019 Jan 2019.
5. **Ministério da Saúde amplia tratamento para câncer renal**. 2019-01-21 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/ministerio-da-saude-amplia-tratamento-para-cancer-renal>.
6. NABI, S.; KESSLER, E. R.; BERNARD, B.; FLAIG, T. W. *et al.* Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. **F1000Research**, 7, 03/12/2018 2018.
7. SROUGI, M.; DALL'OGGIO, M.; CRIPPA, A. **Câncer De Rim**. Santos Editora, 2013. 254 p.
8. MOU, Y.; WU, J.; ZHANG, Y.; ABDIHAMID, O. *et al.* Low expression of ferritinophagy-related NCOA4 gene in relation to unfavorable outcome and defective immune cells infiltration in clear cell renal carcinoma. **BMC cancer**, 21, n. 1, 01/05/2021 2021.
9. ZHANG, H.; LI, H. miR-137 inhibits renal cell carcinoma growth in vitro and in vivo. **Oncology letters**, 12, n. 1, 2016 Jul 2016.
10. BATAVIA, A. A.; SCHRAML, P.; MOCH, H. Clear cell renal cell carcinoma with wild-type von Hippel-Lindau gene: a non-existent or new tumour entity? **Histopathology**, 74, n. 1, 2019 Jan 2019.
11. VUONG, L.; KOTECHA, R. R.; VOSS, M. H.; HAKIMI, A. A. Tumor Microenvironment Dynamics in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. **Cancer discovery**, 9, n. 10, 2019 Oct 2019.
12. ZHU, S.; DING, W.; CHEN, Y.; WANG, W. *et al.* High VHL Expression Reverses Warburg Phenotype and Enhances Immunogenicity in Kidney Tumor Cells. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, 02/26/2021 2021.
13. LINEHAN, W. M. Genetic basis of kidney cancer: role of genomics for the development of disease-based therapeutics. **Genome research**, 22, n. 11, 2012 Nov 2012.

14. LI, H.; MO, Z. Prognostic Value of Metabolism-Related Genes and Immune Infiltration in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **International journal of general medicine**, 14, 10/18/2021 2021.
15. ZHAN, Y.; ZHANG, R.; LI, C.; XU, X. *et al.* A microRNA-clinical prognosis model to predict the overall survival for kidney renal clear cell carcinoma. **Cancer medicine**, 10, n. 17, 2021 Sep 2021.
16. FUHRMAN, S. A.; LASKY, L. C.; LIMAS, C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, 6, n. 7, 1982 Oct 1982.
17. DALL'OGGIO, M. F.; ANTUNES, A. A.; ALVARO S SARKIS ; CRIPPA, A. *et al.* Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. **BJU international**, 100, n. 3, 2007 Sep 2007.
18. ZBAR, B.; BRAUCH, H.; TALMADGE, C.; LINEHAN, M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. **Nature**, 327, n. 6124, 1987 Jun 25-Jul 1 1987.
19. LINEHAN, W. M.; RICKETTS, C. J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. **Nature reviews. Urology**, 16, n. 9, 2019 Sep 2019.
20. GOSSAGE, L.; EISEN, T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. **Nature reviews. Clinical oncology**, 7, n. 5, 2010 May 2010.
21. MITCHELL, T. J.; TURAJLIC, S.; ROWAN, A.; NICOL, D. *et al.* Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. **Cell**, 173, n. 3, 04/19/2018 2018.
22. GOSSAGE, L.; EISEN, T.; MAHER, E. R. VHL, the story of a tumour suppressor gene. **Nature reviews. Cancer**, 15, n. 1, 2015 Jan 2015.
23. LAI, X.; EBERHARDT, M.; SCHMITZ, U.; VERA, J. Systems biology-based investigation of cooperating microRNAs as monotherapy or adjuvant therapy in cancer. **Nucleic Acids Research**, 47, n. 15, p. 7753-7766, 2023.
24. ROMERO-CORDOBA, S. L.; SALIDO-GUADARRAMA, I.; RODRIGUEZ-DORANTES, M.; HIDALGO-MIRANDA, A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. **Cancer biology & therapy**, 15, n. 11, 2014 2014.
25. ZHOU, Y.; ZHANG, Z.; WO, M.; XU, W. The long non-coding RNA NNT-AS1 promotes clear cell renal cell carcinoma progression via regulation of the miR-137/ Y-box binding protein 1 axis. **Bioengineered**, 12, n. 1, 2021 Dec 2021.
26. WANG, L.; LI, Q.; YE, Z.; QIAO, B. ZBTB7/miR-137 Autoregulatory Circuit Promotes the Progression of Renal Carcinoma. **Oncology research**, 27, n. 9, 09/23/2019 2019.
27. YAO, Q.; CHEN, Y.; ZHOU, X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. **Current opinion in chemical biology**, 51, 2019 Aug 2019.

28. XUE, J.; XIE, F.; XU, J.; LIU, Y. *et al.* A New Network-Based Strategy for Predicting the Potential miRNA-mRNA Interactions in Tumorigenesis. **International journal of genomics**, 2017, 2017 2017.
29. LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K.-H. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, 23, n. 20, 10/13/2004 2004.
30. BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nature structural & molecular biology**, 13, n. 12, 2006 Dec 2006.
31. SALIMINEJAD, K.; KHORSHID, H. R. K.; FARD, S. S.; GHAFFARI, S. H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. **Journal of cellular physiology**, 234, n. 5, 2019 May 2019.
32. GARCÍA-LÓPEZ, J.; BRIEÑO-ENRÍQUEZ, M. A.; MAZO, J. D. MicroRNA biogenesis and variability. **Biomolecular concepts**, 4, n. 4, 2013 Aug 2013.
33. PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, 1, 01/28/2016 2016.
34. ZENG, Y.; CULLEN, B. R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. **Nucleic acids research**, 32, n. 16, 09/08/2004 2004.
35. BARTEL, D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, 116, n. 2, 01/23/2004 2004.
36. OKAMURA, K.; LIU, N.; LAI, E. C. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. **Molecular cell**, 36, n. 3, 11/13/2009 2009.
37. JR, W. G. K. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. **Nature reviews. Cancer**, 2, n. 9, 2002 Sep 2002.
38. IORIO, M.V.; CROCE, C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO molecular medicine**, 4, n. 3, 2012 Mar 2012.
39. WANG, M.; GAO, H.; QU, H.; LI, J. *et al.* MiR-137 suppresses tumor growth and metastasis in clear cell renal cell carcinoma. **Pharmacological reports : PR**, 70, n. 5, 2018 Oct 2018.
40. BALAGUER, F.; LINK, A.; LOZANO, J. J.; CUATRECASAS, M. *et al.* Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. **Cancer research**, 70, n. 16, 08/15/2010 2010.
41. EEDUNURI, V. K.; RAJAPAKSHE, K.; FISKUS, W.; GENG, C. *et al.* miR-137 Targets p160 Steroid Receptor Coactivators SRC1, SRC2, and SRC3 and Inhibits Cell Proliferation. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, 29, n. 8, 2015 Aug 2015.

42. SANG, L.; LIU, T.; LIU, H.; LI, H. *et al.* MicroRNA-137 suppresses cell migration and invasion in renal cell carcinoma by targeting PIK3R3. **Int J Clin Exp Med**, 9, n. 4, p. 7160-7167, 2016.
43. SZWARC, M. M.; KOMMAGANI, R.; LESSEY, B. A.; LYDON, J. P. The p160/steroid receptor coactivator family: potent arbiters of uterine physiology and dysfunction. **Biology of reproduction**, 91, n. 5, 2014 Nov 2014.
44. ROLLINS, D. A.; COPPO, M.; ROGATSKY, I. Minireview: nuclear receptor coregulators of the p160 family: insights into inflammation and metabolism. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, 29, n. 4, 2015 Apr 2015.
45. MULLANY, L. K.; LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W. Wound Healing-related Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family. **Endocrinology**, 162, n. 3, 03/01/2021 2021.
46. BERSTEN, D. C.; SULLIVAN, A. E.; PEET, D. J.; WHITELAW, M. L. bHLH-PAS proteins in cancer. **Nature reviews. Cancer**, 13, n. 12, 2013 Dec 2013.
47. O'MALLEY, B. W. SRC-2 Coactivator: a role in human metabolic evolution and disease. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, 26, n. 1, 05/14/2020 2020.
48. ZHAO, S.; WANG, Y.; LUO, M.; CUI, W. *et al.* Long Noncoding RNA Small Nucleolar RNA Host Gene 1 (SNHG1) Promotes Renal Cell Carcinoma Progression and Metastasis by Negatively Regulating miR-137. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, 24, 06/06/2018 2018.
49. INOUE, J.; INAZAWA, J. Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential. **Journal of human genetics**, 66, n. 9, 2021 Sep 2021.
50. ABD-AZIZ, N.; KAMARUZMAN, N. I.; POH, C. L. Development of MicroRNAs as Potential Therapeutics against Cancer. **Journal of oncology**, 2020, 07/15/2020 2020.
51. JANSSON, M. D.; LUND, A. H. MicroRNA and cancer. **Molecular oncology**, 6, n. 6, 2012 Dec 2012.
52. PIMENTA, R.; MIOSHI, C. M.; GONÇALVES, G. L.; CANDIDO, P. *et al.* Intratumoral Restoration of miR-137 Plus Cholesterol Favors Homeostasis of the miR-137/Coactivator p160/AR Axis and Negatively Modulates Tumor Progression in Advanced Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 24, n. 11, p. 9633, 2023-06-01 2023.
53. BOUCHALOVA, P.; BOUCHAL, P. Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. **Cancer cell international**, 22, n. 1, 12/09/2022 2022.
54. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, 03/04/2011 2011.
55. LEITE, K. R. M.; MORAIS, D. R.; REIS, S. T.; VIANA, N. *et al.* MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, 68, n. 6, 2013 Jun 2013.