

**ANÁLISE DE MICRO-RNAS REGULADORES
DE MEMBROS DA FAMÍLIA DE
TRANSPORTADORES SLC E DE SEUS GENES
ALVO EM CARCINOMAS DE PÊNIS**

JUAN JOSÉ AUGUSTO MOYANO MUÑOZ

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Silvia Regina Rogatto

Co-Orientadora: Dra. Sandra A. Drigo Linde

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Muñoz, Juan José Augusto Moyano

Análise de micro-RNAS reguladores de membros da família de transportadores SLC e de seus genes alvo em carcinomas de pênis / Juan Augusto Moyano Muñoz— São Paulo, 2011.

153p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto.

Descritores: 1. NEOPLASIAS PENIANAS. 2. GENES REGULADORES. 3. MICRORNAS. 4. TROCADOR DE SÓDIO E CÁLCIO. 5. PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE ÁCIDO GRAXO. 6. PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE GLUTAMATO DA MEMBRANA PLASMÁTICA. 7. PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DA MEMBRANA MITOCONDRIAL.

“O homem encontra a Deus por trás de cada porta que a ciência consegue abrir.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Rita, por estar sempre ao meu lado, por todo seu incentivo e amor incondicional.

Ao meu pai, César, pelo exemplo de vida, honestidade e profissionalismo.

Aos meus amados irmãos Carlos, Cecília, Manuel e Martín, pelo carinho, companheirismo, amizade e paciência.

Ao Pedro Chimoy Effio, pela fé e conselhos tão valiosos, por ter me ensinado o que é fazer ciência.

Obrigado por existirem!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu força e me fez saber que tudo posso, por me proporcionar mais esta oportunidade e me abençoar a cada passo da minha caminhada.

*Aos meus pais, pelo grande amor que construímos a cada desafio conquistado.
Sem vocês nada seria possível.*

Aos meus irmãos, pelo novo mundo que descobri ao vosso lado, com vocês divido esta conquista.

Ao meu amigo e mestre Pedro Chimoy, pela ajuda incondicional durante toda esta caminhada, pela força e coragem em todos os momentos difíceis, pela grande amizade e companheirismo.

À minha grande família (avós, tios e primos), pelas alegrias e boas energias que vocês trazem para minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Silvia R. Rogatto, pela oportunidade de me apresentar o mundo da pesquisa e poder realizar o meu Mestrado, pela confiança, auxílio e ensinamentos importantes. Um, exemplo a ser seguido.

À minha co-orientadora e grande amiga Dr^a. Sandra Drigo, não apenas pela co-orientação, mas por todas as palavras de força e incentivo, por toda a dedicação a equipe e principalmente ao meu trabalho, por ter melhorado meu aprendizado e por acreditar em mim para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos peruanos, Anahí, Angélica, Carlos, Celso, César, Elias, Miguel, Frank, Franklín, Hugo, Johana Katherine, Juber, Júlio, Miriam, Raul, Romy, Rosalva e Selene, por ter compartilhado momentos de dificuldades e alegrias.

Aos meus amigos brasileiros, Aldo, Alex, Aline, Anderson, Andrew, Angel, Fábio, Glauber, Indira, Patrícia, Rafaela, Rodrigo e Talita, pela nova amizade que nasceu em meio desta caminhada, que a mesma permaneça por toda vida.

Aos colegas do Laboratório Neogene, Ana, André, Ariane, Carol, Deborah, Fábio, Fernanda, Francine, Georgia, Graziela, Hellen, Julia, Luciana, Marcia, Mateus, Renata, Rogério, Sara e Sandra, pelas novas descobertas profissionais e pessoais, pela colaboração, pelos momentos de descontração e principalmente pelos momentos de alegria e companheirismo que vivemos durante estes anos.

*Agradeço especialmente à meus dois amigos e colaboradores nesta pesquisa, **Ariane** que graças aos resultados do seu trabalho e a sua grande ajuda consegui concluir o meu projeto a tempo e com eficiência, e **Mateus** pelos ensinamentos, amizade e incentivo, muito obrigado a ambos pelo apoio em todas as minhas tarefas científicas, vocês foram fundamentais.*

*Aos ex-colegas do Laboratório Neogene, **Cássia, Eliane, Fabíola, Lúvia, Miriam e Priscila**, que deixaram grandes lembranças na memória.*

*Aos membros da banca de qualificação, **Dr. Fernando Soares e Dr. Robson Carvalho** pelas sugestões e comentários na confecção deste trabalho.*

A toda equipe de funcionários da Pós-Graduação e Biblioteca do Hospital A.C. Camargo.

Aos funcionários do SAME por fornecer os dados relativos aos prontuários dos pacientes necessários para esta pesquisa.

*Aos funcionários do PINGA, especialmente as amigas do Banco de Macromoléculas, **Eloisa, Louise e Vera**, pela ajuda na aquisição das amostras, além do carinho e carisma que exalta as suas qualidades.*

*Às funcionárias da Pós-Graduação, **Ana, Luciana e Vanuza** pelo auxílio oferecido no decorrer do curso de Mestrado.*

*A toda a equipe da biblioteca, principalmente a bibliotecária **Suely Francisco**, pela solicitude durante as pesquisas bibliográficas e pela revisão deste trabalho.*

À CNPq e à FAPESP, pelo suporte financeiro indispensável para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

Moyano Muñoz JJA. **Análise de micro-RNAs reguladores de membros da família de transportadores SLC e de seus genes alvo em carcinomas de pênis.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de pênis (CaPe) é uma neoplasia rara que ocorre em homens preferencialmente a partir da sexta década de vida. Estudo prévio do grupo avaliou alterações genéticas por CGH-array (aCGH) e expressão gênica em larga escala em CaPe de acordo com o genótipo do HPV. A integração dos dados genômicos e de expressão revelou o envolvimento de genes da família de carreadores de solutos (SLCs), onde o padrão de perdas e ganhos não concordava com o perfil de expressão gênica (diminuição e aumento de expressão, respectivamente). Estes dados sugeriram o envolvimento de outros mecanismos de regulação afetando estes genes. Análise *in silico* mostrou que estes genes poderiam ser regulados por micro-RNAs (miRNA), cujas regiões genômicas estavam alteradas por aCGH. O objetivo do presente estudo foi confirmar as alterações no padrão de expressão de *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4* e seus potenciais miRNAs reguladores (miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133b e miR223) por RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) em tempo real em 33 CaPe (28 amostras do grupo de validação técnica e 7 de validação biológica) e 4 tecidos penianos normais (N). Os genes *ACTB*, *GUSB* e *HMBS* foram utilizados como genes de referência para as análises de expressão dos genes SLCs; e *RNU48*, *RNU47*, *MIR16* e *RNU44* para os miRNAs. A análise dos níveis de expressão detectados pelas técnicas de *microarray* de expressão e RT-qPCR no grupo de validação mostrou correlação positiva significativa para *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4* e *SLC27A4*. A análise de expressão considerando conjuntamente os grupos de validação técnica e biológica mostrou diminuição de expressão significativa de *SLC8A1* (P=0,017) e *SLC25A25* (P=0,002), e aumento de *SLC27A4* (P=0,007) em mais que 70% dos CaPe em relação aos N, validando os achados prévios de expressão gênica global. Foi verificado um aumento marginalmente significativo para o gene *SLC1A3* (P=0,07), concordando com o resultado anterior. A

comparação entre CaPe e N mostrou que os *miR-23b*, *miR-26b*, *miR-27b* e *miR-133b* apresentavam expressão significativamente diminuída em CaPe, enquanto *miR-223* apresentava expressão aumentada na comparação com as amostras normais. A expressão do *miR-133b* estava diminuída em 95% dos CaPe (20/21), com mediana de expressão 40 vezes menor em relação aos N ($P=0,003$). Os genes *SLC8A1* e *SLC27A4* apresentaram forte correlação nos níveis de expressão detectados pelas técnicas de *array* e RT-qPCR ($P<0,001$). Além disso, *SLC8A1* e *SLC27A4* mostraram-se diferencialmente expressos em relação aos controles pelas duas técnicas. Os dois genes se correlacionaram negativamente com seus os miRNAs reguladores (diminuição de *SLC8A1* e aumento de *miR-223* em CaPe; e aumento de *SLC27A* e diminuição de *miR-133b*). Maior nível de *SLC25A16* foi significativamente detectado nos tumores HPV positivos. Foi verificada associação significativa entre menores níveis de *miR-22*, *miR-23b* e *miR-27b* e invasão perineural ($P=0,039$; $P=0,039$; $P=0,032$; respectivamente) e tendência à associação entre níveis mais baixos de *miR-133b* e graus histológicos II e III ($P=0,052$). Em conclusão, os dados do presente estudo sugerem que membros da família dos genes *SLCs* são regulados por miRNAs, mostrando pela primeira vez o envolvimento destes genes nos CaPe. Investigações futuras em maior número de casos e por outras ferramentas metodológicas poderão confirmar o papel dos miRNAs *miR-22*, *miR-23b* e *miR-27b* como marcadores prognósticos em CaPe.

SUMMARY

Moyano Muñoz JJA. **[Analysis of microRNAs that regulate members of the SLC transporter family and their target genes in penile carcinomas]**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Penile cancer is a rare disease that occurs predominantly in men over 60 years of age. A previous study conducted by our group analysed genetic alterations through the use of CGH-array and also large-scale gene expression of penile cancer patients according to their HPV status. The combination of the genomic data and expression analysis revealed a possible involvement of a family of genes linked to solute carriage (SLCs) with penile cancer, where the genomic gain or loss pattern did not match the gene expression profile (decrease and increase in expression, respectively). This data suggests that there are other regulatory mechanisms affecting these genes. *In silico* analysis showed that these genes could be regulated by microRNAs due to their altered genomic regions revealed by aCGH. The objective of this study is to confirm the gene expression pattern of the *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4* genes and their putative regulatory microRNAs (miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133b e miR223) through RT-qPCR in 33 penile cancer patients (28 training set and 7 validation set samples) and 4 normal penile tissues. The *ACTB*, *GUSB* and *HMBS* genes were used as reference genes for the *SLC* genes expression analysis and the *RNU48*, *RNU47*, *MIR16* and *RNU44* genes were used for the *miRNA*'s expression analysis. A positive correlation between *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4* and *SLC27A4* expression levels detected by microarray and RT-qPCR was observed in the training set samples. Significant decreased expression of *SLC8A1* (P=0.017) and *SLC25A25* (P=0.002) and increased expression of *SLC27A4* (P=0.007) were detected in more than 70% of penile carcinomas from both training and validation set in comparison to the control group, therefore validating the previous findings of global gene expression. Although it was not statistically significant (P=0,07), higher levels of *SLC1A3* was detected in tumors, which is in agreement with previous results. Significant downexpression of *miR-23b*,

miR-26b, *miR-27b* and *miR-133b* and overexpression of *miR-223* were detected in tumors compared with normal controls. Interestingly, downexpression of *miR-133b* was observed in 95% (20/21) of the tumor samples with a median of 40 fold reduction in the comparison with controls ($P=0.003$). Differential expression of *SLC8A1* and *SLC27A4* was detected in penile cancer group compared to the controls by both techniques. These two genes were negatively correlated with their corresponding regulatory miRNAs. Thus, decreased expression levels of *SLC8A1* were negatively correlated with increased levels of *miR-223*. Conversely, increased levels of *SLC27A* were negatively correlated with decreased *miR-133b* expression, highly suggesting that these genes are regulated by these miRNAs. Significantly higher expression levels of *SLC25A16* were found in HPV positive tumours. A significant association was found between lower levels of *miR-22*, *miR-23b* and *miR-27b* and perineural invasion ($P=0.039$; $P=0.039$; $P=0.032$; respectively). These data indicate that *miR-22*, *miR-23b* and *miR-27b* could be considered as prognostic markers in penile carcinomas. In addition, lower levels of *miR-133b* was marginally associated with tumors presenting histological grades II and III ($P=0.052$). In conclusion, this study suggested that members of *SLC* gene family are regulated by miRNAs, revealing for the first time the involvement of these genes in penile cancer. Future investigations with a greater number of patients and different techniques might confirm the role of *miR-22*, *miR-23b* and *miR-27b* as prognostic markers in penile cancer patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biogênese do miRNA.....	35
Figura 2	Modelo representativo das reações de síntese de cDNA e de PCR quantitativa em tempo real pelo sistema Taqman.....	59
Figura 3	Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência.....	67
Figura 4	Determinação do número adequado de genes de referência.....	67
Figura 5	Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M=0,92) e impacto no fator de normalização com o uso dos genes de referência <i>GUSB</i> + <i>HMBS</i> em relação aos genes <i>GUSB</i> + <i>HMBS</i> + <i>ACTB</i> (V2/3=0,354).....	70
Figura 6	Expressão relativa de <i>SLC1A3</i> , <i>SLC8A1</i> e <i>SLC25A4</i> avaliados por RT-qPCR em amostras não-tumorais (N) e tumorais de pênis (CaPe).....	72
Figura 7	Expressão relativa de <i>SLC25A16</i> , <i>SLC25A25</i> e <i>SLC27A4</i> detectada por RT- qPCR em amostras não-tumorais (N) e tumorais de pênis (CaPe).....	73
Figura 8	Expressão relativa dos genes <i>SLCA1</i> , <i>SLCA81</i> , <i>SLC25A16</i> , <i>SLC25A4</i> , <i>SLC25A25</i> e <i>SLC27A4</i> avaliados por RT-qPCR em tumores de pênis (N=35) e tecidos normais (N=4).....	75
Figura 9	Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos (MIR-16, LET-7a, RNU6b, RNU44, RNU47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados.....	77

Figura 10	Determinação do número adequado dos transcritos (MIR-16, LET-7a, RNU6b, RNU44, RNU47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados.....	78
Figura 11	Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos quatro transcritos de referência selecionados (MIR-16, RNU44, RNU47 e RNU48).....	80
Figura 12	Determinação do número adequado de transcritos de referência.....	80
Figura 13	Expressão relativa de miR-22, miR-23b, miR-26b, mi-27b, miR-133 e miR-223 avaliados por RT-qPCR em tumores de pênis (N=21) e tecidos normais (N=4).....	83
Figura 14	Correlação entre os níveis de expressão de miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133 e miR-223 avaliados por RT-qPCR em CaPe (N=21).....	84
Figura 15	Gráfico de matriz entre valores obtidos por RT-qPCR para os RNAs mensageiros (vertical) dos genes SLCs e os miRNAs (horizontal).....	86
Figura 16	Níveis dos transcritos de <i>SLC1A3</i>	91
Figura 17	Níveis dos transcritos de <i>SLC8A1</i>	92
Figura 18	Níveis dos transcritos de <i>SLC25A4</i>	93
Figura 19	Níveis dos transcritos de <i>SLC25A16</i>	94
Figura 20	Níveis dos transcritos de <i>SLC25A25</i>	95
Figura 21	Níveis dos transcritos de <i>SLC27A4</i>	96

Figura 22	Níveis dos transcritos de <i>miR-22</i>	98
Figura 23	Níveis dos transcritos de <i>miR-23b</i>	99
Figura 24	Níveis dos transcritos de <i>miR-26b</i>	100
Figura 25	Níveis dos transcritos de <i>miR-27b</i>	101
Figura 26	Níveis dos transcritos de <i>miR-133b</i>	102
Figura 27	Níveis dos transcritos de <i>miR-223</i>	103

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	miRNAs e seus genes alvo pertencentes à família SLC detectados como alterados no estudo de Busso (2011).....	42
Quadro 2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.....	55
Quadro 3	Caracterização das sequências de microRNAs alvos avaliadas em amostras de CaPe e controles.....	58
Tabela 1	Características clínicas e histopatológicas dos pacientes com CaPe dos grupos de validação técnica (N=28) e biológica (N=7).....	50
Tabela 2	Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência testados.....	66
Tabela 3	Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos três genes de referência <i>ACTB</i> , <i>GUSB</i> e <i>HMBS</i> selecionados em amostras de carcinoma de pênis (CaPe) e tecido normal de pênis (N).....	69
Tabela 4	Correlação entre valores de expressão relativa dos genes <i>SLCs</i> avaliados por <i>microarray</i> e RT-qPCR em tempo real em 28 amostras de carcinoma de pênis (CaPe).....	71
Tabela 5	Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de RNU6b, estabilidade de expressão (M) dos seis transcritos (MIR-16, LET-7a, RNU44, RNU47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados.....	76

Tabela 6	Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos quatro transcritos de referência selecionados (MIR-16, RNU44, RNU47 e RNU48).....	79
Tabela 7	Frequência de casos de carcinoma de pênis (CaPe) que se mostraram dos diferencialmente expressos na comparação com tecidos normais e mediana valores de expressão relativa nos miRNAs desregulados nos tumores.....	82
Tabela 8	Compilação dos resultados encontrados, relacionando as análises por <i>microarrays</i> e RT-qPCR de RNA mensageiro e seus respectivos microRNAs reguladores em carcinomas de pênis (CaPe).....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
ASO	Ateroesclerose obliterante
Ago2	proteína argonauta 2
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
CaPe	câncer de pênis
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEC	carcinomas de células escamosas
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
COX-2	<i>cicloxygenase 2</i>
Cq	ciclo de quantificação
ER α	receptor de estrógeno alfa
FHIT	<i>fragile histidine triad gene</i>
GLS	glutaminase mitocondrial
HDAC4	histona deacetilase 4
HIF- 1α	fator induzido por hipóxia 1 α
HPV	papiloma vírus humano
HRAS	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	perda de heterozigose
miRNAs	micro-RNAs
miRISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
MMPs	metaloproteinases de matriz
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGES-1	<i>prostaglandina E sintase 1</i>
PGE2	<i>prostaglandina E2</i>
PIK3CA	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
POX	Prolina Oxidase

<i>RASSF1</i>	<i>Ras association domain family member 1</i>
<i>RNUs</i>	genes codificantes de pequenos RNAs nucleolares
RT- qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa via Transcriptase Reversa
<i>RUNX3</i>	<i>runt-related transcription factor 3</i>
SERCA-2	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SLCs	carreadores de solutos
<i>THBS-1</i>	<i>thrombospondin 1</i>
UTR	regiões não traduzidas

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Etiologia	2
1.3	Aspectos clínicos e histopatológicos.....	6
1.4	Fatores prognósticos	9
1.5	Tratamento	12
1.6	Estudos genético-moleculares do CaPe	14
1.7	Análise genômica e de expressão gênica em larga escala em CaPe de pacientes brasileiros	20
1.8	Superfamília SLC.....	23
1.9	Os genes candidatos SLC1A3, SLC8A1, SLC25A4, SLC25A16, SLC25A25, SLC27A4 em CaPe	25
1.9.1	SLC1A3 - Família carreadora de soluto 1 (transportador alta afinidade por glutamato da glia), membro 3	25
1.9.2	SLC8A1-Família carreadora de soluto 8 (trocaador de sódio/cálcio) membro1 ..	26
1.9.3	SLC25A4, SLC25A16, SLC25A25 Família carreadora de soluto 25 (carreadores mitocondriais), membros 4, 16 e 25	27
1.9.4	SLC27A4 - Família carreadora de soluto 27 (transportador de ácido graxo), membro 4	29
1.10	A possível regulação de componentes da família SLC por miRNAs	30
1.10.1	Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs	30
1.10.2	miRNAs e Câncer	36
1.11	Os miRNAs candidatos em CaPe.....	40
1.11.1	miR-22	42
1.11.2	miR-23b	43
1.11.3	miR-26b	44
1.11.4	miR-27b	45
1.11.5	miR-133b	46
1.11.6	miR- 223	46

2	OBJETIVOS.....	48
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1	Casuística	49
3.2	Métodos.....	52
3.2.1	Extração de RNA	52
3.2.2	Análise de expressão dos genes da família SLCs	53
3.2.3	Análise de expressão de microRNAs (miRNA)	57
3.3	Seleção dos genes e miRNAs de referência para a normalização de RT-qPCR	60
3.4	Análise dos dados.....	61
3.4.1	Normalização dos dados de RT-qPCR e obtenção da expressão relativa dos genes SLC e miRNA em CaPe	61
3.4.2	Análise estatística.....	63
4	RESULTADOS.....	64
4.1	Expressão dos genes SLCS	64
4.1.1	Escolha de transcritos referência para normalização de RT-qPCR	64
4.1.2	Confirmação da estabilidade dos genes de referência para normalização da RT-qPCR	68
4.1.3	Correlação entre valores de expressão relativa dos genes SLCs avaliados por microarray e RT-qPCR	70
4.1.4	Expressão gênica diferencial dos genes da família SLC entre amostras de CaPe e controles.....	72
4.2	Expressão dos miRNAs potencialmente reguladores dos genes SLCs.....	76
4.2.1	Escolha das referências para normalização de RT-qPCR dos miRNAs	76
4.2.2	Confirmação da estabilidade dos transcritos de referência para normalização da RT-qPCR para análise de miRNAs	78
4.2.3	Expressão diferencial dos miRNAs entre amostras de CaPe e controles	81
4.2.4	Correlação entre os níveis de expressão dos miRNAs em amostras de CaPe	84
4.2.5	Correlação entre valores de expressão relativa dos miRNAs e os genes SLCs por ele regulados	85

4.3	Integração dos resultados de RT-qPCR com os dados prévios de microarray e CGHarray (aCGH)	87
4.4	Expressão relativa dos genes SLCs e as variáveis clínicas e histopatológicas ...	89
4.5	Expressão relativa dos miRNAs e as variáveis clínicas e histopatológicas	97
5	DISCUSSÃO	104
6	CONCLUSÕES	125
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

ANEXO

Anexo 1 Valores da relação de absorbância 260/280, 260/230, Integridade do RNA e RIN detectadas no Bioanalyzer das amostras estudadas.

Anexo 2 Valores de expressão relativa normalizada dos RNAm e microRNA estudados.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença rara em países desenvolvidos, correspondendo a 0,4 - 0,6% de todas as neoplasias malignas masculinas (GOODMAN et al. 2007; MINHAS et al. 2010). O CaPe atinge aproximadamente 1:100.000 homens na América do Norte e Europa (MICALI et al. 2006) e compreende um problema importante de saúde pública nos países em desenvolvimento, onde esse tumor constitui até 20% dos tumores malignos do homem (MISRA et al. 2004). Nos Estados Unidos, o CaPe corresponde a 2,1% dos cânceres em homens, sendo que em 2010 foram diagnosticados 1.250 casos novos e registrados 310 óbitos devido à doença (Surveillance Research Program of the National Cancer Institute SEER 2011). A maior incidência do CaPe é relatada na África, onde o número de afetados pode chegar a 20:100.000 homens (MICALI et al. 2006) enquanto os menores índices estão entre os judeus nascidos em Israel e nos EUA (0,1:100.000 e 0,07:100.000, respectivamente) (POW-SANG et al. 2010; MISRA et al. 2004). No Brasil, o CaPe corresponde a aproximadamente 2,1% de todos os tumores masculinos, acometendo 2,9 - 6,8:100.000 homens. Cerca de 50% de todos os casos de CaPe no país são oriundos das regiões Norte e Nordeste. Essas regiões apresentam as piores condições socioeconômicas do país e concentram mais da metade das neoplasias malignas do pênis, representando até 5,7% de todos os tumores no sexo masculino (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009). No estado do

Maranhão, os casos de CaPe correspondem a 22,7% dos casos. Todavia, o CaPe representa menos de 1% das neoplasias malignas no sul brasileiro (FAVORITO et al. 2008).

O CaPe acomete principalmente pacientes entre 60 e 70 anos, apresenta baixa frequência entre os adultos na faixa dos 30 anos e é raro na infância (SALVIONI et al. 2009). No Brasil, o CaPe ocorre mais em idades mais jovens quando comparado à população mundial, a partir da quarta década de vida; 79% dos pacientes com CaPe possuem idade superior a 46 anos e 7,4% dos pacientes apresentam idade inferior a 35 anos (FAVORITO et al. 2008).

1.2 ETIOLOGIA

Os fatores de risco para o CaPe são múltiplos e, apesar de várias características terem sido associadas à presença do tumor, sua etiologia ainda permanece incerta (DILLNER et al. 2000). Alguns fatores foram associados a um risco aumentado para desenvolvimento do CaPe, tais como fimose, ausência de circuncisão, más condições de higiene, retenção de produtos urinários e células epidérmicas que descamam normalmente (esmegma), vários parceiros sexuais, infecção pelo HPV, verrugas genitais ou outros antecedentes venéreos, lesões e inflamações crônicas e o tabagismo (DALING et al. 2005; SALVIONI et al. 2009; MINHAS et al. 2010).

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do tumor é a ausência de circuncisão em meninos na infância. Em homens não circuncidados (prepúcio intacto), o desenvolvimento do tumor é atribuído aos efeitos irritativos do

esmegma, um bioproduto da ação bacteriana nas células epiteliais esfoliadas da face interna do prepúcio (SOBEL e PLAUT 1949). O esmegma tem sido descrito como um agente carcinogênico no CaPe, convertendo esteróis esmegmáticos em esteróis carcinogênicos pela *Micobacterium smegmatic* (SHABAD 1964; RAJU et al. 1985). Nos Estados Unidos, o risco de desenvolvimento de CaPe em homens não circuncidados é três vezes maior que para homens circuncidados (MADEN et al. 1993). Além disso, parece que o período em que a circuncisão é realizada afeta a incidência destes tumores. Na população de judeus, a circuncisão ocorre no período neonatal e, nestes indivíduos, o CaPe é praticamente inexistente (LICKLIDER 1961). Entre os muçulmanos, onde a circuncisão é realizada após a puberdade, o CaPe é raro (GOEL e SINGH 1977). No entanto, se a circuncisão é realizada em adultos, este procedimento parece não oferecer proteção contra o aparecimento da doença (TSENG et al. 2001).

Além destes fatores de risco, a doença freqüentemente está associada a homens que possuem um baixo nível socioeconômico, provavelmente devido à falta de informações e consequente má higiene pessoal (PANDA e NAYAK 1980).

Outros fatores de risco associados ao CaPe incluem história de tratamento prévio com psoralen ou ultravioleta A e contágio com o papiloma vírus humano (HPV) (DILLNER et al. 2000). Os HPVs correspondem a vírus pequenos de DNA em dupla fita de 8000pb que pertencem à família *Papillomaviridae* (DE VILLIERS et al. 2004). Apesar da relação causal bem estabelecida entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de câncer cervical demonstrada em estudos epidemiológicos (BRINTON et al. 1991), apenas uma fraca relação é observada entre o vírus e outros tipos de câncer, tais como câncer de vulva, ânus e pênis (ZUR HAUSEN et al. 2009).

A infecção pelo HPV é considerada epidêmica, em muitas regiões pobres, inclusive no Brasil.

Técnicas em biologia molecular deram evidências do papel etiológico da infecção pelo HPV no CaPe. Foram identificadas seqüências específicas de DNA de diferentes tipos de HPV em lesões penianas primárias (malignas ou benignas), mas não em tecidos normais (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993).

Até o momento, foram descritos mais de 100 subtipos de HPV associados principalmente a infecções no trato genital. Alguns genótipos virais estão envolvidos em mecanismos carcinogênicos, os chamados HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82), enquanto outros praticamente não possuem envolvimento com câncer e são chamados HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108) (SHUKLA et al. 2009).

Estudos sorológicos mostraram a presença de HPV, principalmente os subtipos 16 e 18, em 40 a 50% dos casos de câncer de pênis (MIRALLES-GURI et al. 2009). Os carcinomas epidermóides (CECs) de pênis dos subtipos basaloide ou condilomatoso estão mais frequentemente associados à presença de HPV de alto risco, que são observados em 70 a 100% dos casos e torna a relação etiológica entre HPV e CaPe mais plausível (CUBILLA et al. 1998; RUBIN et al. 2001). BEZERRA et al. (2001) demonstraram que o status do HPV não influencia o prognóstico em casos de CaPe invasivo. Contraditoriamente, a positividade de HPV associada ao aumento da expressão da proteína P53 estava associada a pior prognóstico nos pacientes com CaPe (LOPES et al. 2002). Apesar desses resultados, não se pode considerar o HPV como causa do carcinoma peniano, mas sim um fator associado importante e prevalente (MONK e TEWARI 2007).

A integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro é amplamente relatada em carcinomas, principalmente em tumores da região cervical, sendo um evento crucial na oncogênese (KALANTARI et al. 2001; DALL et al. 2008). Esta integração pode levar tanto à ativação como à inativação de genes celulares envolvidos no processo tumoral. A ruptura e a integração do genoma do HPV à célula hospedeira levam à expressão aumentada da proteína viral E7 e à vantagem seletiva no crescimento destas células quando comparadas às células que possuem DNA de HPV não integrados ao genoma (DALL et al. 2008).

Estudos epidemiológicos têm associado os metabólitos do tabaco como fatores etiológicos de CaPe (HARISH e RAVI 1995). Esses dados corroboram a hipótese de que o fumo é capaz de levar ao desenvolvimento do câncer em todo o epitélio escamo-celular, independente do contato direto da droga com o tecido havendo indícios que esse fator é dose-dependente (TSEN et al. 2001). MADEN et al. (1993) demonstraram um risco elevado de desenvolvimento do CaPe em fumantes segundo a quantidade de cigarros consumidos por ano. Posteriormente, foi relatado um risco 4,5 vezes maior de desenvolvimento de CaPe invasivo em fumantes quando comparado a homens que nunca fumaram (DALING et al. 2005). Entretanto, o papel exato do cigarro na carcinogênese ainda é desconhecido e, até o momento, existe apenas uma relação inconsistente descrita em poucos estudos.

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

O carcinoma peniano pode se apresentar como um tumor exofítico; no entanto, na grande maioria dos casos, apresenta um padrão de crescimento infiltrativo (POMPEO et al. 2006). Esse tumor é geralmente relatado pelos pacientes como “ferida no pênis”, podendo vir como sinal isolado ou em associação com outros sintomas como dor, inflamação, disúria, prurido e hemorragia. O CaPe é evidenciado na glândula em 48% dos casos, 21% no prepúcio, 9% em ambas as áreas e 6% no sulco coronal. (CUBILLA 2009). Geralmente, inicia-se como uma lesão na glândula, que quando não tratada em estágios iniciais, estende-se para o prepúcio, infiltrando tecidos adjacentes como o subepitelial, conjuntivo, corpo esponjoso, corpo cavernoso e uretra. Este tumor pode também invadir órgãos como próstata e bexiga sendo raras as metástases à distância (POMPEO et al. 2006; CUBILLA 2009).

O CaPe ocorre, na maioria das vezes, como carcinoma *in situ* ou invasivo. O carcinoma *in situ* pode estar presente sob duas formas, ambas apresentando padrão histológico de células epiteliais malignas não invasivas (MICALI et al. 2006). Quando a glândula, prepúcio ou haste do pênis são afetados, o carcinoma *in situ* recebe o nome de Eritroplasia de Queyrat, enquanto o envolvimento da pele da haste do pênis, escroto ou períneo é conhecido como Doença de Bowen. A Doença de Bowen pode se transformar em carcinoma invasivo em 5-10% dos casos (SCHELLHAMMER et al. 1992), enquanto essa evolução ocorre mais frequentemente para Eritroplasia de Queyrat, em aproximadamente 10-33% dos casos (GROSSMAN, 1992; WIELAND et al. 2000).

Os carcinomas de células escamosas (CEC) compreendem 95% dos casos de CaPe, sendo o tipo histológico mais frequente, e caracteriza-se histologicamente por queratinização, formação de pérola córnea e apresentação de vários graus de atividade mitótica (SCHELLHAMMER et al. 1992). O principal subtipo histológico do CEC é o usual (48-65% dos casos), seguido em frequência pelo condilomatoso (17%), verrucoso (8%), papilar (7-10%) e basaloide (5-15%) (CUBILLA et al. 2004; CHAUX et al. 2010c). Os demais subtipos possuem padrões infiltrativos e de crescimento variados como melanoma e sarcoma.

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde reviu a classificação dos carcinomas de pênis, incluindo novos tipos histológicos de importância clínica como o pseudoglandular ou carcinoma acantolítico, carcinoma epidermoide papilífero e carcinoma warty-basaloide (CUNHA et al. 2009; CHAUX et al. 2010a; CHAUX et al. 2010b). Estes tipos histológicos, como o pseudoglandular ou carcinoma acantolítico, são mais raros e maiores em tamanho, mais infiltrativos e de alto grau histológico, com maior incidência de metástases linfonodais e estão associados ao aumento de morte pela doença (CUNHA et al. 2009).

Os dois principais sistemas de estadiamento utilizados para CaPe são a Classificação de Jackson e *Union Internationale Contre Le Cancer (UICC)* TNM (JACKSON 1966; SOBIN e WITTEKIND 2004). A Classificação de Jackson é um sistema de estadiamento clínico estabelecido para casos em que não estão disponíveis as características da lesão primária inicial, a profundidade de invasão, a natureza e extensão de metástases em linfonodos. Já o sistema TNM descreve a profundidade de invasão e extensão de envoltórios dos linfonodos, sendo por esse motivo utilizado com maior frequência na prática clínica (SOBIN e WITTEKIND 2004).

O diagnóstico do CaPe ocorre, na maioria das vezes, mais tardiamente quando comparado a outros tipos de câncer. Essa etapa é retardada por mais de um ano em 15-50% dos pacientes como resultado de medo, vergonha, ignorância ou negação pessoal. A ausência de tratamento adequado leva muitas vezes à morte precoce desses pacientes (MISRA et al. 2004).

O diagnóstico de CaPe é realizado por exames clínicos e histopatológicos. O diagnóstico é realizado a partir da biópsia da lesão peniana suspeita (LOPES et al. 1994). Outros procedimentos, tais como tomografia computadorizada e/ou ultrassonografia podem também ser utilizados para avaliação e estadiamento do tumor. O exame inguinal é imprescindível, uma vez que a sobrevida está diretamente relacionada à presença ou ausência de metástases em nódulos linfáticos locais (MOSCONI et al. 2005).

Métodos de diagnóstico por imagem como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética não parecem auxiliar no diagnóstico do tumor primário (exceto em casos de obesidade mórbida), e apresentam baixa sensibilidade e especificidade para detectar metástases linfonodais sendo utilizado apenas na detecção de metástases à distância (SOLSONA et al. 2004; FICARRA et al. 2009).

1.4 FATORES PROGNÓSTICOS

O acometimento dos nódulos linfáticos, juntamente à extensão do tumor primário constituem os principais fatores prognósticos para o CaPe (LOPES et al.1996b).

Já foi demonstrada a associação entre o padrão de invasão e a embolização linfática, sendo a invasão considerada como fator independente na predição de metástases linfonodais (GUIMARÃES et al. 2006). Metástases linfonodais para região inguinal e ilíaca são a via de disseminação precoce no carcinoma peniano e constituem o principal fator prognóstico da doença (LOPES et al.1996a).

As metástases por via hematogênica são mais raras ocorrendo entre 1 a 10% dos casos (BEGGS e SPRATT, 1964; PURAS et al. 1978). Nos casos avançados, as complicações loco-regionais com tumor infiltrando o feixe vâsculo-nervoso levam à hemorragia e sepse, sendo estas as principais causas de morte nestes pacientes (PURAS et al. 1978). Não há relatos de remissão espontânea da doença.

A presença de linfonodos palpáveis no momento do diagnóstico do tumor primário ocorre entre 28% a 64% dos pacientes. No entanto, 47% a 85% dos casos são diagnosticadas metástases linfonodais ao exame patológico, provavelmente, no restante dos pacientes a linfonodomegalia é consequência de processos inflamatórios decorrentes das infecções associadas ao tumor. Pacientes sem linfonodos palpáveis ao diagnóstico podem apresentar micrometástases que só são detectadas após linfadenectomia e exame patológico. A taxa de ocorrência de micrometástases é de 12% a 24%. A extensão do comprometimento linfonodal para a região pélvica ocorre em 22% a 56% dos pacientes (FICARRA et al. 2005).

O prognóstico de pacientes portadores de metástases linfonodais varia de acordo com diversas características, tais como número de linfonodos afetados, presença de extensão inguinal uni ou bilateral, envolvimento de linfonodos pélvicos e extensão extranodal (PANDEY e PICARD 2006). A presença e extensão de metástases nodais está associada ao pior prognóstico para os pacientes com CaPe, levando a considerável redução da sobrevida em 5 anos.

A sobrevida livre da doença em 5 anos é de 90-100% para os tumores N0; 80-90% para N1 (nódulos linfáticos inguinais solitários e superficiais), 50% para N2 (nódulos linfáticos inguinais superficiais múltiplos ou bilaterais) e 0-30% para N3 (nódulos linfáticos pélvicos ou inguinais profundos, unilaterais ou bilaterais) (HORENBLAS et al. 1993; RAVI 1993). Assim, pacientes com linfonodos palpáveis ao diagnóstico apresentam taxas de sobrevida entre 38% a 52%, enquanto pacientes negativos ao exame clínico apresentam taxas mais elevadas de 70% a 93% (VILLAVICENCIO et al. 1997; BEZERRA et al. 2001).

Os dados morfológicos, além de classificar corretamente o subtipo tumoral, também podem dar informações relevantes em relação ao comportamento biológico do tumor. Dentre eles destacam-se como fatores importantes na predição das metástases linfonodais e da sobrevida, o grau histológico (VELAZQUEZ et al. 2008), a invasão vascular (LOPES et al. 1996a), a invasão perineural (CUBILLA 2009) e o padrão de invasão do tumor (GUIMARÃES et al. 2006).

Diversos estudos já foram realizados na tentativa de identificar quais fatores clínicos e anatomopatológicos podem ser empregados para prever o risco de acometimento linfonodal nos pacientes com CEC de pênis, na tentativa de determinar quais pacientes se beneficiariam da linfadenectomia profilática.

BHAGAT et al. (2010) avaliaram dois grupos de pacientes com CEC de pênis, aqueles que foram submetidos à linfadenectomia e os que não foram submetidos. Observaram que pacientes com invasão linfática apresentam maior risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais, corroborando os dados de LOPES et al. (1996b). Estes autores também descreveram que a espessura do tumor maior que 5 milímetros é um fator de risco para metástase linfonodal. Além da invasão linfática também conferem maior risco para comprometimento linfonodal o estadio do tumor e a presença de mais do que 50% de células tumorais pouco diferenciadas (SLATON et al.2001; FICARRA et al.2005).

A invasão perineural também foi descrita por VELAZQUEZ et al. (2008) como um importante fator preditivo de comprometimento linfonodal para as neoplasias malignas de pênis. Em 2006, GUIMARÃES et al. relataram que o padrão de invasão do tumor primário está associado ao risco de metástases linfonodais, sendo que pacientes com padrão infiltrante apresentam risco 4,18 vezes maior de desenvolverem metástases do que pacientes com tumores exofíticos.

Não menos importante para o prognóstico do paciente é o subtipo histológico, que tem sido associado ao risco de metástases linfonodais e de morte pela doença. Os subtipos como papilar e *warty* são de baixo risco tanto para metástases quanto para morte, já os sarcomatoides têm alto risco tanto para metástases quanto para óbito (GUIMARÃES et al. 2009). Outra informação relevante na predição de comprometimento linfonodal é o grau de diferenciação do tumor. Em geral, tumores pouco diferenciados apresentam risco maior de desenvolvimento de metástases (SLATON et al. 2001; FICARRA et al. 2002; CUNHA et al. 2009).

Os fatores clínicos e anatomopatológicos contribuem para a avaliação prognóstica dos pacientes com CEC de pênis, entretanto ainda são imprecisos e por esta razão, vários estudos têm sido realizados com o intuito de identificar marcadores moleculares prognósticos para esse tumor.

1.5 TRATAMENTO

A rara incidência dos CaPe contribui para a ausência de métodos padronizados para o tratamento dos pacientes. Quando o tumor é diagnosticado em fases iniciais (estádios I-II), é observada uma evolução favorável, com a maioria dos pacientes sendo considerada como curada da doença.

Apesar do impacto mutilante, a amputação parcial ou total do pênis é utilizada comumente na prática clínica, uma vez que, na maioria dos casos o diagnóstico é feito tardiamente, já em estadio avançado. A ressecção cirúrgica é direcionada tanto para o tumor primário quanto para os nódulos linfáticos regionais (linfadenectomia inguinal ou inguino-ilíaca bilateral) (LOPES et al. 1996b).

Um dilema no tratamento do CaPe é qual conduta adotar nos casos sem linfonodos palpáveis. Até o momento, o único método capaz de determinar com precisão a presença ou ausência de células tumorais nos linfonodos é a linfadenectomia inguinal (BHAGAT et al. 2010). A linfadenectomia profilática confere maiores taxas de cura, como demonstrado por ORNELLAS et al. (2008). Os autores avaliaram a sobrevida específica por câncer em 10 anos em pacientes submetidos ao esvaziamento inguinal profilático e tardio (realizado somente no momento do diagnóstico de linfonodos palpáveis). A medida profilática aumentou a

sobrevida de 30% para 70%; ou seja, a linfadenectomia é indicada na vigência de comprometimento linfonodal, por aumentar a sobrevida dos pacientes positivos para metástase linfonodal. No entanto, é uma abordagem de tratamento invasiva e associada às diversas e frequentes morbidades. Metade dos pacientes submetidos ao esvaziamento inguinal desenvolve complicações, que podem ser infecção da ferida (3% a 70%), necrose (2,5% a 64%), deiscência (38% a 61%), linfocele (2,7% a 87%), linfedema (5% a 100%) e trombose (6% a 9%) (FICARRA et al. 2002). Também não pode ser descartada a pequena taxa de mortalidade (aproximadamente 3%) associada às complicações do procedimento cirúrgico. Devido a todas as morbidades associadas à linfadenectomia, essa não é a abordagem de tratamento empregada para todos os pacientes sem comprometimento linfonodal (HORENBLAS et al. 2001; HEYNS et al. 2010).

O impacto psicológico da doença e do tratamento na vida do paciente é um fator importante. Em revisão sistemática entre os anos de 1985 e 2008 observou-se que, dentre os efeitos negativos mais comuns, estão a baixa qualidade de vida ou bem-estar e função sexual comprometida. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentaram distúrbios psiquiátricos (MADDINENI et al. 2009).

As lesões pequenas, em estádios iniciais, podem ser tratadas de forma conservadora (LONT et al. 2006), seja por radioterapia, ressecção cirúrgica, terapia a laser (MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007), ou cirurgia controlada microscopicamente (ressecções regradas respeitando com rigor as margens de segurança conhecida como técnica micrográfica de Mohs) (MOHS et al. 1992) e braquiterapia, entre outros (MOSCONI et al. 2005). Estas medidas foram incorporadas graças ao desenvolvimento tecnológico e ao aperfeiçoamento de novas

técnicas, cada vez menos invasivas, em prol do efeito cosmético, melhor qualidade de vida e reintegração biopsicossocial do paciente.

1.6 ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES DO CaPe

O conhecimento sobre marcadores genéticos relacionados ao CaPe é extremamente limitado, principalmente quando comparado a outros tipos de carcinomas. Os estudos envolvem principalmente análises de proteínas e têm revelado alguns resultados interessantes, assim como alguns genes candidatos a marcadores moleculares.

O marcador prognóstico mais importante até o momento é a invasão angiolinfática, que deve ser incluída na nova revisão da classificação TNM para neoplasia de pênis (LOPES et al. 1996b; SOBIN et al. 2009). No entanto, novos biomarcadores com valor prognóstico e preditivo devem auxiliar na melhor conduta clínica para estes pacientes.

O silenciamento epigenético por metilação foi identificado para alguns genes em CaPe. A inativação do gene *FHIT* e *RUNX3*, ambos supressores tumorais, foi verificada em 23 de 25 CaPe de células escamosas (92%) (YANAGAWA et al. 2008). A hipermetilação do gene *THBS-1* foi associada a pior prognóstico em pacientes com CaPe. A inativação do gene *RASSF1* foi relatada principalmente em tumores T1, indicando que a hipermetilação desse gene pode estar relacionada aos eventos iniciais da progressão do CaPe (GUERRERO et al. 2008).

O gene *CDKN2A*, um importante supressor tumoral que codifica as proteínas p14^{ARF} e p16^{INK4a}, foi encontrado silenciado por metilação especificamente na região promotora de p16 em 9/53 pacientes com CaPe (FERREUX et al. 2003).

Mutações nos genes *PIK3CA*, *HRAS* e *KRAS* foram descritas por ANDERSSON et al. (2008) em CaPe. O *PIK3CA* atua na via metabólica PI3K, e os demais na via RAS. As mutações da via RAS foram relatadas em tumores mais avançados e os autores concluíram que os genes *HRAS* e *KRAS* podem ser importantes para o diagnóstico e caracterização do grau do tumor.

POETSCH et al. (2007) avaliaram 62 marcadores polimórficos de microssatélites distribuídos em 11 cromossomos quanto à perda de heterozigose (LOH) em 28 amostras de tumores de pênis e 10 metástases correspondentes. Os autores classificaram como baixa frequência de LOH (0-25% marcadores tumorais com LOH), média (26-50%) ou alta (>50%). Para os tumores primários, 23 marcadores apresentaram baixa frequência de LOH, 10 apresentaram LOH média e somente um estava relacionado à alta frequência de LOH. Os marcadores com LOH média ou alta estavam localizadas em 2q, 6p, 8q, 9p, 12q e 17p13. Nestas regiões alteradas podem estar mapeados genes supressores tumorais ou reguladores genéticos envolvidos no CaPe. Já nos tecidos metastáticos foi observada maior quantidade de alterações genômicas e alta frequência de LOH em 3p, 6p, 6q, 8q, 9p, 11q, 12q, 15q, 17p e 18q. Todas as alterações detectadas na lesão primária estavam também presentes na metástase correspondente. O marcador D6S260 foi correlacionado à menor sobrevida e quatro diferentes marcadores polimórficos de microssatélites mapeados nos cromossomos 4, 6, 9, 12 e 13 apresentaram correlação com o estadiamento tumoral (T). Oito marcadores de microssatélites mapeados nos cromossomos 6, 9, 11

e 12 e a presença de múltiplas regiões envolvidas em LOH mostraram correlação significativa com a ocorrência de metástases (POETSCH et al. 2007).

Vários estudos moleculares avaliaram a importância do gene supressor tumoral *TP53* e seu produto protéico funcional em CaPe. Polimorfismos no gene *TP53* têm sido amplamente avaliados como fatores de risco para doenças malignas. O principal polimorfismo, localizado no éxon 4 do gene, resulta nos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro ou Pro/Pro no códon 72 da proteína TP53 (PIETSCH et al. 2006). O genótipo Arg/Arg da proteína TP53 está relacionado à suscetibilidade à degradação *in vitro* mediada pelo gene *E6* do HPV16, podendo facilitar o efeito oncogênico do vírus (STOREY et al. 1998). Entretanto, em estudos realizados por HUMBEY et al. (2003) e TORNOSSELLO et al. (2008) não foi encontrada associação entre o genótipo Arg/Arg em *TP53* e a presença de HPV. Em adição, este genótipo não foi considerado um fator de risco para o aparecimento de CaPe.

Alterações nos genes *CDKN2A* e *TP53* foram avaliadas em uma série de lesões pré-malignas e carcinomas invasivos genitais, incluindo 3 CaPe e 5 carcinomas de vulva (SOUFIR et al. 2007). Foram identificadas mutações nos éxons 5, 7 e 8 do gene *TP53* em 6/8 tumores invasivos analisados. Mutações no éxon 2 de *CDKN2A* ocorreram em 50% dos tumores invasivos, todos com mutação em *TP53*, sugerindo que a co-inativação de ambas as vias é importante nesses tumores genitais e indicando um efeito cooperativo. Não foram detectadas alterações genéticas nas lesões precursoras, o que indica que mutações em *TP53* e *CDKN2A* correspondem a eventos tardios nestes processos tumorais.

A expressão de algumas proteínas foi determinada por imunoistoquímica quanto à capacidade de diferenciar biologicamente dois subtipos histológicos de

CEC: usual e verrucoso. OUBAN et al. (2003) relataram aumento da expressão de MDM2 e diminuição de TP53 em carcinomas verrucosos com relação ao CEC usual. A correlação inversa entre a expressão das proteínas está de acordo com o esperado, uma vez que a proteína MDM2 é um regulador chave de TP53, inibindo a ação do gene supressor tumoral e levando à proliferação celular descontrolada em células tumorais (CHEN et al. 1998).

Alguns relatos sugeriram que carcinomas de pênis com expressão aumentada da proteína TP53 possuem risco aumentado de metástase em nódulos linfáticos quando comparados a indivíduos com baixa expressão de TP53 (LOPES et al. 2002; MARTINS et al. 2002; ZHU et al. 2007). Além disso, a expressão aumentada de TP53 foi correlacionada à maior diferenciação celular e profundidade da lesão primária (MARTINS et al. 2002).

A expressão das proteínas microsossomais prostaglandina E sintase (PGES-1), prostaglandina E2 (PGE2) e cicloxigenase 2 (COX-2) foi avaliada em seis casos de CEC, uma displasia e sete casos de carcinoma *in situ* de pênis (GOLIJANIN et al. 2004). A enzima COX catalisa a síntese de prostaglandina H2 (PGH2), a qual é convertida pela mPGES-1 em PGE2. A proteína PGE2, por sua vez, está envolvida na proliferação celular e indução de angiogênese (BEM-AV et al. 1995; TSUJII et al. 1998), entre outras funções. Assim, a inibição da síntese de PGE2 pode impedir a formação e o crescimento do tumor (DANNENBERG et al. 2001). GOLIJANIN et al. (2004) relataram um aumento da expressão de COX-2 e mPGES-1, além de presença de PGE2 em todos os casos analisados. Segundo os autores estes dados fornecem a base para que a utilização de drogas que inibem COX-2 possam ser melhor investigadas em pacientes com CaPe.

A proteína pró-apoptótica BAX apresentou expressão similar em CECs e carcinoma verrucoso de pênis, enquanto a imunorreatividade da proteína anti-apoptótica BCL2 e a taxa BCL2/BAX foram significativamente superiores em pacientes com CEC, sugerindo que estes tumores são distintos molecularmente (SAEED et al. 2005).

A capacidade do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da proteína Ki-67 em prever metástases linfonodais e sobrevida dos pacientes foi avaliada pela técnica de imunoistoquímica em 125 CaPe (GUIMARÃES et al. 2007). Embora a expressão aumentada de PCNA e diminuída de Ki-67 tenham sido associadas à metástase linfonodal, não foi obtida relação entre a imunorreatividade dessas proteínas e a sobrevida dos pacientes. MARTINS et al. (2002) não encontraram associação significativa entre a expressão de PCNA e fatores prognósticos em CaPe. Em uma análise envolvendo 26 pacientes, FARIA et al. (2000) não observaram correlação entre o índice de Ki-67 e a agressividade biológica dos tumores de pênis.

A expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), família de enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz celular que facilita os processos de migração e motilidade celular, foi estudada e confrontada com padrões de crescimento e invasão do CaPe. Uma associação interessante foi observada entre a expressão aumentada das MMP2 e MMP9 e tumores pouco diferenciados histologicamente (SOARES et al. 2006).

A expressão das metaloproteinases MMP2 e MMP9 foi analisada por CAMPOS et al. (2006) para verificar a sua possível utilização como marcadores prognósticos em pacientes com CaPe. Os autores observaram que a expressão

proteica elevada da MMP9 era fator de risco independente para a recorrência da doença indicando seu potencial uso para seleção de pacientes que necessitam de maior atenção em tratamentos pós-operatórios. A imunorreatividade de MMP2 não mostrou associação com nenhum dos parâmetros avaliados.

A baixa expressão de algumas proteínas foi independentemente associada à presença de metástases nos nódulos linfáticos, entre elas a proteína supressora de metástase CD82 e a E-caderina (CAMPOS et al. 2006; PROTZEL et al. 2008). Segundo os autores, apesar do pequeno número de estudos e casos, a associação entre baixos níveis dessas proteínas e a presença de metástases linfonodais sugere seu papel como potenciais marcadores para indicação de linfadenectomia preventiva, contribuindo para um melhor prognóstico nos pacientes com CaPe.

Há um número limitado de estudos utilizando métodos de triagem em larga escala em CaPe, os quais poderiam identificar genes pertencentes às vias biológicas alteradas e associados com o desenvolvimento e/ou progressão da doença. ALVES et al. (2001) utilizaram CGH (hibridação genômica comparativa) cromossômico em 26 casos de CEC de pênis. Esta técnica permite a análise de perdas e ganhos de regiões cromossômicas na amostra tumoral pela comparação com DNA normal diferencialmente marcado. Os autores relataram ganhos em 8q24, 16p11-12, 20q11-13, 22q, 19q13 e 5p15 e perdas em 13q21-22, 4q21-32 e Xq. Não foi observada associação entre as alterações cromossômicas e grau ou estágio tumoral, embora houvesse uma tendência a menor sobrevida dos pacientes em casos que apresentavam um número menor de alterações genômicas.

Para o nosso conhecimento, há apenas um relato em literatura que descreveu os resultados expressão gênica global em CaPe. KROON et al. (2008) avaliaram por

microarrays de expressão, 56 CEC de pênis sendo que 36 destes pacientes apresentavam metástases linfonodais. Os 56 pacientes foram divididos em dois grupos: treinamento e validação. Baseado nas alterações de expressão gênica entre indivíduos linfonodos-positivos e negativos no grupo de treinamento, um classificador gênico foi construído para prever envolvimento linfonodal, de forma que sua precisão foi testada aplicando-o em pacientes do grupo de validação. O classificador construído separou corretamente 29/30 casos (96%) no grupo de treinamento, enquanto para o grupo de validação foram classificados de forma correta somente 14/26 amostras (56%). Estes dados demonstraram que o perfil de expressão gênica não produziu um classificador preciso para prever o envolvimento de linfonodos. Assim, a busca por fatores precisos e não-invasivos para esse tipo tumoral é uma área de pesquisa importante, porém pouco explorada, em especial nos CaPe de pacientes brasileiros.

1.7 ANÁLISE GENÔMICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA EM CaPe DE PACIENTES BRASILEIROS

Em recente estudo do grupo (BUSSO 2011) foram avaliadas variações no número de cópias genômicas (array-CGH) e alterações na expressão gênica por análises em larga escala em CaPe de acordo com o genótipo de HPV. Todos os casos foram genotipados para HPV com a utilização do *Linear Array HPV Test Genotyping* (Roche). As alterações genômicas e na expressão de transcritos foram obtidos com plataformas 4x44K (Agilent). Alterações no número de cópias de DNA

foram detectadas por aCGH em 31 casos de CaPe. Análise de expressão gênica foi realizada em 29 amostras CaPe. A análise integrada dos dados obtidos pela metodologia de aCGH e array de expressão foi realizada nos 29 casos incluindo todos os genes com alterações no número de cópias e expressão gênica diferencial. Foram também avaliadas as vias e redes gênicas com o *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems). As análises de aCGH revelaram 450 alterações no número de cópias (média de $14,52 \pm 10,17$ CNVs/indivíduo), sendo que o maior número de alterações genômicas foi detectado em tumores HPV negativos. A análise de expressão gênica global revelou mais de 3.000 genes diferencialmente expressos.

A análise integrada entre os genes que apresentaram variação no número de cópias genômicas pela metodologia de aCGH e dos genes que mostraram alteração nos níveis de transcritos revelou um grupo de 584 genes com alterações por ambas as metodologias. Destes, um subgrupo de genes apresentou resultados concordantes entre as duas técnicas, ou seja, os genes que mostraram ganhos genômicos apresentaram aumento de transcritos (230 genes) ou o contrário, os genes envolvidos em perdas mostraram diminuição de expressão (113 genes).

No entanto, um subgrupo de genes apresentou resultados não concordantes entre as duas metodologias, mostrando alteração nos níveis de expressão sem alteração no número de cópias genômicas, ou o contrário, sugerindo que outros mecanismos poderiam estar envolvidos na regulação da expressão dos transcritos, incluindo o envolvimento de micro-RNAs (miRNAs). De especial interesse, 49 genes da família de genes carreadores de solutos (*SLC*) mostraram-se com níveis de expressão alterados sem alteração no número de cópias gênicas, o que sugeria a importância dessas moléculas em CaP. A seguir, foi avaliado quais destes genes

poderiam ser regulados por miRNAs, utilizando para análise *in silico* as ferramentas de predição de alvos biológicos de miRNAs: Target Scan (<http://www.targetscan.org/>) e PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>). Interessantemente, foram identificados 36 membros da família *SLC* que apresentaram possível regulação por miRNAs. Foi gerada uma lista de miRNAs potencialmente reguladores destes genes e foram anotadas suas localizações cromossômicas. Na sequência foi avaliado se haviam alterações no número de cópias identificadas nas análises de aCGH nas regiões onde estes miRNAs estavam mapeados. Foi identificado um grupo de miRNAs potencialmente reguladores dos genes *SLCs* mapeados em regiões detectadas como alteradas por aCGH, fortalecendo a hipótese que as alterações nos níveis de transcritos destes genes poderiam ser decorrentes de alterações genômicas nos seus miRNAs reguladores.

1.8 SUPERFAMÍLIA SLC

A superfamília carreadora de solutos (SLC) compreende um grande grupo de proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela absorção de nutrientes, metabólitos, drogas e toxinas. Esta superfamília SLC abrange 55 famílias de genes com pelo menos 362 genes codificadores de proteínas e estão organizadas com base em semelhanças de alinhamento e especificidades de substrato (HEDIGER et al. 2004; HE et al. 2009). Pelo menos 20 a 25% de identidade de sequências de aminoácidos são compartilhadas entre as proteínas membros de uma mesma família SLC (HE et al. 2009). A nomenclatura dos genes pertencentes a estas famílias envolve as letras *SLC*, seguido por um número, a letra *A* (a qual age como um divisor

entre os números) e finalmente o número individual do transportador, por exemplo, *SLC1A3* (HEDIGER et al. 2004; WOJTAL 2009).

Transportadores SLC sofrem mudanças conformacionais sequenciais durante o ciclo de transporte e estas proteínas são capazes de transportar mais de um substrato simultaneamente (BERGERON et al. 2008). Os transportadores agem como “porteiros” das células e organelas, controlando a captação e efluxo de compostos essenciais, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, íons inorgânicos e drogas.

Além disso, sabe-se que os transportadores SLC mantêm a homeostase celular e corporal pela promoção da importação de nutrientes e exportação de compostos tóxicos celulares (URBAN et al. 2006). Esses transportadores também possuem papel crucial na resposta a drogas, funcionando como alvos e facilitando sua absorção, metabolismo e eliminação. Adicionalmente, os membros dessa família fazem parte de diversas classes funcionais, incluindo neurotransmissores e transportadores de nutrientes, metais pesados e xenobióticos (URBAN et al. 2006).

Diversas alterações nos transportadores SLC foram identificadas e apresentam-se associadas a doenças humanas. Como exemplo, dois diferentes tipos de hipertensão resultam de mutações nos genes *SLC12*: *SLC12A1* na síndrome de *Bartter* e em *SLC12A3* na síndrome de *Gitleman*. Além disso, alterações em *SLC37A4* causam doenças resultantes do acúmulo de glicose, enquanto mutações em *SLC40A1* resultam em hemocromatose (HEDIGER et al. 2004).

Pouco é conhecido sobre os genes que constituem essa família e sua relação com o câncer. SWEET et al. (2010) relataram um aumento na expressão do transportador de tiamina *SCL19A3* em linhagens celulares de câncer de mama BT474

submetidas à condições de hipóxia. Estudos adicionais sugeriram um papel da via mediada pelo fator induzido por hipóxia 1α (*HIF-1 α*) na regulação desse transportador.

Além disso, sabe-se que esses transportadores podem funcionar como alvo de drogas ou no sistema de entrega das drogas. Dessa forma, a quimiorresistência, afetada parcialmente pelo efluxo da droga pelos transportadores, pode ser superada pela identificação de transportadores de absorção específicos expressos em células cancerosas, os quais podem ser utilizados para facilitar um melhor acúmulo da droga e promover sucesso na quimiossensibilidade do tumor. Entre esses alvos estão incluídos os transportadores da família SLC22, os quais são expressos em diversos órgãos e possuem papel na absorção e distribuição de alguns agentes quimioterápicos, como o Paclitaxel, Bendamustine, entre outras (KOBAYASHI et al. 2002; TAKEDA et al. 2002). O SLC19A1 (RFC1) foi o primeiro membro da família SLC associado à resistência a drogas usadas em câncer. O SLC19A1 é um transportador de folato com alta afinidade por folatos reduzidos e está envolvido na resistência à droga metotrexate (revisado em HUANG 2007).

A família gênica *SLC* é de grande interesse para investigação nos CaPe considerando que resultados prévios do grupo identificaram 36 membros desta família com alteração na expressão gênica alterada nos CaPe (aumento ou diminuição) e possivelmente associada com desregulação de miRNAs. A expressão diferencial dos transportadores *SLC* nos CaPe faz destes genes potenciais alvos terapêuticos. Em adição, estes genes podem ter relevância na sua interação com as diferentes drogas, além de poder auxiliar no desenvolvimento de tratamentos baseados nas necessidades individuais minimizando possíveis efeitos colaterais.

1.9 OS GENES CANDIDATOS *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25*, *SLC27A4* em CaPe

Dentre os genes *SLC* diferencialmente expressos entre CaPe e tecidos normais detectados por microarray foram selecionados como genes candidatos para o presente estudo aqueles que mostraram os maiores valores de *fold change* (maior ou igual a 3), sendo eles: *SLC1A3* (aumento de expressão), *SLC8A1* (diminuição), *SLC25A4* (diminuição), *SLC25A16* (aumento), *SLC25A25* (diminuição) e *SLC27A4* (aumento). O segundo critério para seleção é serem candidatos a regulação por miRNAs (análise *in silico*), sendo que os potenciais miRNAs reguladores deveriam estar mapeados em regiões genômicas alteradas identificadas por aCGH.

1.9.1 *SLC1A3* - Família carreadora de soluto 1 (transportador alta afinidade por glutamato da glia), membro 3

O gene *SLC1A3/EA6/EAAT1/GLAST/GLAST1/FLJ25094* está mapeado em 5p13 e é um membro da família *SLC1*, que compreende 7 membros envolvidos no transporte de aminoácidos neutros e glutamato de alta afinidade (HE et al. 2009). Há poucos relatos em literatura associando este gene a doenças. Os raros trabalhos estão associados a doenças neurológicas ou neurodegenerativas, como ataxia esporádica, hiperatividade ou déficit de atenção.

Para o nosso conhecimento, há um único relato recente relacionado ao câncer que mostrou associação entre *SLC1A3* e *SLC1A2* e a proliferação de tumores do

plexo coroide (CPT) (BESCHORNER et al. 2009). As expressões de SLC1A3 e SCL1A2 foram detectadas por imunistoquímica em amostras de plexo coroide normal não-neoplásico (CP) (n = 68) e neoplásico CPT (n = 79). Observou-se aumento de expressão de SLC1A3 nos tumores em comparação aos tecidos não neoplásicos, sugerindo ser este um bom marcador diagnóstico nestes tumores.

1.9.2 SLC8A1 - Família carreadora de soluto 8 (trocador de sódio/cálcio) membro 1

O gene *SLC8A1* (alias: *NCX1*; *FLJ37694*; *FLJ43417*; *MGC119581* e *DKFZp779F0871*) está mapeado em 2p23-p22 e é um membro da família SLC8, que compreende três membros envolvidos nas trocas de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sendo que SLC8A1 é conhecido por trocar 3 íons Na^+ extracelular por um Ca^{2+} intracelular e está envolvido na contração cardíaca (HE et al. 2009). Há relatos mostrando alterações na expressão da proteína codificada pelo gene *SLC8A1* na insuficiência cardíaca (LU et al. 2002).

A proteína responsável pela troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permite a redução do Ca^{2+} do citosol. O Ca^{2+} do meio intracelular precisa ser reduzido para que o processo de relaxamento ocorra adequadamente e há dois mecanismos conhecidos de redução do Ca^{2+} : a recaptação pelo retículo sarcoplasmático por meio do Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2) e sua extrusão da célula pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este último parece ser o mecanismo mais importante da extrusão do Ca^{2+} pelo sarcolema (LU et al. 2002; MACE et al. 2003).

1.9.3 *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* Família carreadora de soluto 25 (carreadores mitocondriais), membros 4, 16 e 25

A família SLC25 inclui 43 membros e é a maior de todas as famílias SLC. As proteínas desta família estão envolvidas no transporte de diferentes substâncias pela membrana mitocondrial, e são conhecidos como carreadores mitocondriais (HE et al. 2009).

- ***SLC25A4***

O gene *SLC25A4* (alias: *T1*; *ANT*; *AAC1*; *ANT1*; *PEO2* e *PEO3*), mapeado em 4q35, é membro 4 da família carreadora de soluto 25 (carreador mitocondrial, translocador do nucleotídeo adenina). O translocador do nucleotídeo adenina (ANT) é uma família de proteínas envolvidas nas vias de morte celular que desempenham funções nitidamente opostas a decisões habituais do destino da célula. Por um lado, a *SLC25A4*/ANT catalisa exportação da adenosina trifosfato da matriz mitocondrial para o espaço interno com a importação concomitante de ADP do espaço intermembranar à matriz. Por outro lado, durante períodos de estresse, a *SLC25A4*/ANT pode funcionar como um poro letal e desencadear o processo de permeabilização da membrana mitocondrial, o que leva à morte celular irreversível. Em humanos, a *SLC25A4*/ANT é codificada por quatro genes homólogos, cuja expressão não é apenas tecido-específica, mas também varia de acordo com o estado fisiopatológico da célula. Evidências recentes revelaram um papel diferencial das isoformas *SLC25A4*/ANT na apoptose e da alteração de sua expressão em câncer. Estes dados indicam que *SLC25A4*/ANT é essencial para muitos processos celulares,

especialmente em células tumorais, que aumentam as exigências metabólicas para a síntese de DNA e proteínas (GOTTSLIEB e TOMLINSON 2005).

As ANT podem influenciar na morte celular por meio da cooperação com as proteínas pró-apoptóticas, tais como BAX, proteínas virais (por exemplo, a proteína viral R de HIV-1 (Vpr), PB1-F2 da Influenza) ou pela sua participação em um complexo poliproteico mitocondrial, o chamado complexo do poro de transição de permeabilidade (PTPC) em diversos sistemas, tais como linhagens de carcinomas humanos, cardiomiócitos e neurônios (BRENNER e GRIMM 2006). Em 1999, SLC25A4/ANT1 foi identificado como um fator pró-apoptótico (BAUER et al. 1999). A apoptose induzida pelo aumento de SLC25A4/ANT1 é acompanhada pela liberação do citocromo c e ativação das caspases 9 e 3, indicando que sua expressão facilita a apoptose mitocôndria-dependente (ZAMORA et al. 2004). A transfecção do SLC25A4/ANT1 em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) em um modelo de camundongos "nude" comprovou a indução da apoptose, inativando NF- κ B, aumentando a expressão de BAX e, finalmente, estimulando a regressão do tumor, sugerindo que SLC25A4/ANT1 poderia ser um alvo terapêutico interessante para o tratamento de câncer (JANG et al. 2008; BRENNER et al. 2011).

- ***SLC25A16***

O gene *SLC25A16* (*aliases*: *GDA*; *GDC*; *ML7*; *hML7*; *HGT.1*; *D10S105* e *MGC39851*), membro 16 da família carreadora de soluto 25 (carreador mitocondrial, auto-antígeno da doença de Graves) está mapeado em 10q21.3. O nome carreador da doença Graves (GDC) deriva do fato de que este gene foi clonado a partir de uma biblioteca de expressão de cDNA de células de carcinoma de tireoide folicular destes

pacientes (ZARRILI et al. 1989). Não há relatos em literatura do envolvimento da proteína codificada por este gene em tumores ou outras doenças humanas.

- ***SLC25A25***

O gene *SLC25A25* (aliases: *APC3*, *MCSC*; *PCSCL*; *SCAMC-2*; *KIAA1896*; *MGC105138*; *MGC119514*; *MGC119515*; *MGC119516*; *MGC119517* e *RP11-395P17.4*) (carreador mitocondrial; carreador de fosfato) está mapeado em 9q34.11.

O gene *SLC25A25* codifica a proteína *APC3* (carreadora de ATP-Mg/Pi isoforma 3), que está envolvida no transporte mitocondrial de nucleotídeos de adenina (FIERMONTE et al. 2004). Não há relatos em literatura do envolvimento deste gene em doenças humanas.

1.9.4 *SLC27A4* - Família carreadora de soluto 27 (transportador de ácido graxo), membro 4

O gene *SLC27A4* está mapeado em 9q34.11 e é um membro da família *SLC27*, que contém 6 membros envolvidos no transporte de ácidos graxos de cadeia longa (HE et al. 2009).

Proteínas de transporte de ácidos graxos (FATPs - Família carreadora de soluto 27) aumentam a absorção de ácidos graxos de cadeia longa em células. Em humanos FATPs compõem uma família de seis membros de proteínas altamente homólogas, hsFATP1-6, que são encontrados em todos os tecidos que utilizam ácidos graxos. A absorção de ácidos graxos de cadeia longa desterrificados (LCFA) em células de mamíferos ocorre por meio tanto de um flip-flop passivo, assim como por um mecanismo saturável mediado por proteínas.

O gene *FATP* murino tem um elemento de resposta à insulina e os níveis de expressão de mRNA da *FATP* em adipócitos 3T3-L1 é aumentada pela insulina e diminuída pelo esgotamento de nutrientes (HUI et al. 1998). BLASK et al. (1999) utilizando a técnica de *Northern blot* mostraram que, em comparação com o tecido normal do fígado, células de hepatoma 7288CTC expressam níveis aumentados dos transcritos *FATP*. Os autores também mostraram em modelo *in vivo* que a melatonina é capaz de inibir o crescimento do tumor, provavelmente pela diminuição de *FATP*, diminuindo o transporte e metabolismo de ácidos graxos no tumor.

1.10 A POSSÍVEL REGULAÇÃO DE COMPONENTES DA FAMÍLIA SLC POR miRNAS

É crescente o número de relatos de genes regulados por miRNAs, tanto em situações fisiológicas como em afecções como o câncer, podendo ser este um dos mecanismos envolvidos na regulação dos genes SLCs nos CaPe.

1.10.1 Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não-codificadores derivados de precursores maiores, que formam estruturas imperfeitas *stem-loop* (BARTEL 2004; LAI 2003). São pequenos RNAs (19 a 25 nucleotídeos) codificados por genes específicos, atuando principalmente na repressão da tradução ou degradação do RNA mensageiro (geralmente nas regiões 3' não traduzidas do gene) (GROSSHANS e FILIPOWICZ 2008; MEOLA et al. 2009).

Em alguns casos a formação da dupla fita de RNA quando ligada ao mRNA desencadeia a degradação do mRNA transcrito por um processo similar ao RNA de interferência. Em outros casos, acredita-se que o miRNA bloqueia o complexo de proteínas traduzidos ou impede, de alguma forma, a tradução da proteína sem causar a degradação do mRNA (FABIAN et al. 2010; HUNTZINGER e IZAURRALDE 2011).

Os miRNAs são nomeados por números sequenciais. A nomenclatura dos miRNAs inclui prefixos de 3 ou 4 letras que designam a espécie, como por exemplo hsa-miR-101 (para *Homo sapiens*). As seqüências maduras são comumente designadas como “miR”, enquanto que os *hairpins* precursores são chamados de “mir”. Por exemplo, hsa-miR-101 em humanos e mmu-miR-101 em camundongos são ortólogos. Seqüências paralógicas cujos miRNAs maduros diferem em apenas uma ou duas posições são dadas por letras sufixos, por exemplo, mmu-miR-10a e mmu-miR-10b nos camundongos. *Loci* de *hairpins* distintos que dão origem a miRNAs maduros idênticos são identificados por um número sufixo adicional, por exemplo dme-mir-281-1 e dme-mir-281-2 em *Drosophila melanogaster*. (GRIFFITHS-JONES et al. 2006).

A via canônica da biogênese dos miRNAs envolve um complexo sistema proteico e inicia-se com a síntese pela RNA polimerase II de longos transcritos primários contendo cap 5' e cauda poli (A), conhecido como pri-miRNAs (KIM et al. 2005). Os pri-miRNAs, por sua vez, são processados no núcleo pelas enzimas RNase III, DROSHA e pela proteína de ligação à dupla fita de RNA PASHA (também conhecida como DGCR8), resultando em um pré-miRNA que contém cerca de 70 nucleotídeos em formato de *hairpins*. O pré-miRNA é então exportado para o

citoplasma pelo complexo Exportina-5/ Ran-GTP e submetido a um passo adicional no qual um RNA de dupla fita de aproximadamente 22 nucleotídeos, conhecido como duplex miRNA:miRNA, é excisado do pré-miRNA pela proteína DICER que se liga à proteína TRBP que cliva a estrutura de *hairpin* do pré-miRNA dando origem a duplas fitas de RNA (dsRNA) (LUND et al. 2004; YI et al. 2003). Em seguida, o duplex miRNA:miRNA é incorporado ao complexo multiproteico miRISC (do inglês *multiprotein RNA-induced silencing complex*). Uma das fitas do duplex miRNA é degradada, enquanto a outra permanece no complexo RISC, ligando-se a proteína argonauta 2 (Ago2). A fita de miRNA maduro é preferencialmente retida no complexo funcional miRISC, que em seguida se ligará ao mRNA que direciona a ligação principalmente à região 3' não traduzida dos mRNAs-alvo e essa constitui a principal forma de regulação negativa dos genes, podendo controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo ou mesmo ser degradado (WINTER et al. 2009).

Alguns miRNAs podem ser processados de maneira diferente à via canônica e sua maturação pode ser independente da DGCR8 e RNase III, como miR-320 ou miR-484 (YI et al. 2009; FARAZI et al. 2011) ou são DICER1-independentes, como o miR-451 relacionado com eritropoiese (CHELOUFI et al. 2010; FARAZI et al. 2011). Os miRNAs DGCR8 e RNASEN independente incluem mirtrons e cauda mirtrons, que liberam seus pré-miRNA por *splicing* e excisão por exonuclease (BEREZIKOV et al. 2007). Enquanto o miRNA maduro é carregado pela proteína Argonauta no miRISC, onde o miRNA é liberado e degradado. O miR-451 é gerado a partir de uma estrutura *hairpin* incomum que é processada por Ago2 em vez de DICER1 (CHELOUFI et al. 2010). Após a transcrição, os miRNAs podem ser

modificados por diversas enzimas, incluindo deaminases, resultando na edição de miRNAs e transferases uridil terminais, levando a uridilação premiRNA, afetando potencialmente a quantidade e proporção de miRNA e as suas seqüências (FARAZI et al. 2011).

Os miRNAs regulam negativamente seus alvos de duas maneiras, o que varia de acordo com o grau de complementaridade entre a seqüência do miRNA e a região do transcrito. Os miRNAs com complementaridade perfeita ou quase perfeita a mRNA induzem a via de interferência mediada por RNA (RNAi). Basicamente, mRNA são clivados por ribonucleases associadas a miRNAs presentes no miRISC, o que resulta na degradação do RNA alvo (ESQUELA-KERCHER e SLACK 2006). No entanto, a maioria dos miRNAs presentes em animais utiliza um segundo mecanismo de regulação gênica que não envolve a clivagem dos mRNAs alvo. Esses miRNAs ligam-se por complementaridade imperfeita a regiões não traduzidas (UTR) de seus mRNA alvo, reprimindo a expressão gênica pós-transcricionalmente, aparentemente em nível da tradução. Nesse processo é utilizado um RISC similar ou idêntico ao utilizado na via do RNAi (CARMELL et al. 2002; PILLAI et al. 2005). Os miRNAs que utilizam esse mecanismo reduzem os níveis proteicos de seus genes alvo, enquanto a quantidade de mRNA na célula é pouco afetada. Além da ligação ao mRNA, há relatos da ligação de miRNAs a proteínas. EIRING et al. (2010) demonstraram que o hsa-miR-328 pode interagir com uma ribonucleoproteína que apresenta capacidade de ligação ao RNA, impedindo essa interação. A biogênese e principais ações dos miRNAs na regulação gênica encontram-se esquematizadas na Figura 1.

Os miRNAs são transcritos a partir de regiões intergênicas, íntrons e éxons (LANDGRAF et al. 2007), e estão localizados em regiões variadas do genoma. Aproximadamente 50% dos miRNAs estão localizados em íntrons de genes codificadores de proteínas ou em transcritos longos não-codificadores, enquanto que o restante constitui-se de unidades de transcrição independentes com elementos do promotor e sinais de poliadenilação (DI LEVA e CROCE 2010).

Em geral, os miRNAs são expressos de maneira constitutiva, no entanto, alguns têm sido descritos e identificados em células de tecido-específico, como o miR-122, expresso em grandes quantidades apenas nos hepatócitos e em quantidades marginais em outros tecidos (BURCHARD et al. 2010; BIHRER et al. 2011; QUINTANA et al. 2011). A participação dos miRNAs em vários processos funcionais das células como proliferação, sobrevivência e apoptose começaram a ser estabelecidos, bem como sua participação na fisiopatologia das doenças (SONKOLY e PIVARCSI 2009).

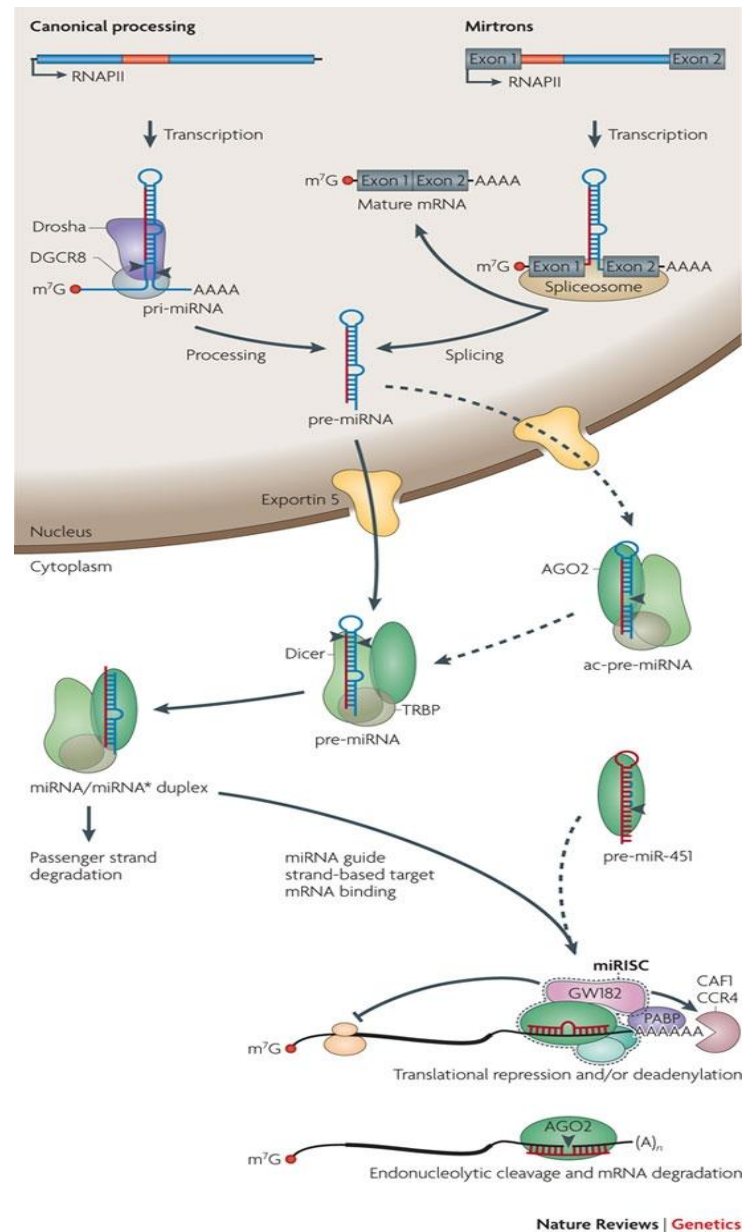


Figura 1 – Vias de biogênese dos miRNAs e seus principais mecanismos de ação.

Fonte: KROL et al. (2010)

Devido a complementaridade parcial entre o miRNA e seu transcrito alvo, um único miRNA é capaz de regular simultaneamente centenas de genes, dando origem a um enorme potencial regulatório. Por outro lado, um único mRNA pode ser

regulado por vários miRNAs. A identificação de mRNAs que constituem alvos verdadeiros de um miRNA específico é um dos maiores desafios dentro do campo da pesquisa. Estão descritos 1.400 miRNAs no genoma humano de acordo com o banco de dados mirBase (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, dados atualizados em 03/06/2011).

Estima-se que 30% dos genes humanos codificadores de proteínas são controlados por miRNAs, e que estes últimos participam na regulação da maioria dos processos celulares já investigados (DI LEVA e CROCE 2010). Evidências recentes indicam que os miRNAs podem atuar no controle da expressão gênica, diminuindo modestamente (10-20%) um número considerável de mRNAs, ou como reguladores principais de um repertório menor de genes alvo, diminuindo sua expressão em 50-70% (CANNEL e BUSHEL 2010).

1.10.2 miRNAs e Câncer

Desde a descoberta dos miRNAs, 4.149 publicações associam essas moléculas ao processo carcinogênico, incluindo 955 revisões (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> - palavras chave “miRNA” e “câncer”, acesso 20/05/2011).

Os miRNAs, podem agir tanto como oncogenes quanto como supressores tumorais (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006; VOLINIA et al. 2010). Um miRNA que normalmente regula negativamente um oncogene pode ser definido como um supressor de tumor e freqüentemente está perdido ou diminuído nas células tumorais. Essa perda de função do miRNA supressor pode causar o aumento nos níveis protéicos de oncogenes. Da mesma forma, miRNAs que regulam genes

supressores tumorais podem ser definidos como oncogenes e geralmente apresentam ganho de função nos tumores. A expressão elevada de um miRNA com função de oncogene pode reduzir os produtos protéicos de genes supressores de tumor. Há ainda miRNAs associados a processos metastáticos, podendo ser classificados em duas categorias: miRNAs indutores de metástase e miRNAs supressores de metástase. O resultado final dessa perda da regulação de miRNAs pode resultar em alterações importantes nos processos de apoptose e diferenciação celular, aumentando a proliferação e o desenvolvimento de metástase (GARZON et al. 2010).

Como exemplo de mecanismo de regulação de genes associados ao câncer, foi mostrado que miR-15a e miR-16-1 são responsáveis pela regulação negativa de *BCL2*, um gene anti-apoptótico freqüentemente com aumento de expressão em diversos tumores, incluindo leucemias e linfomas (CALIN et al. 2002; CIMMINO et al. 2005). Assim, acredita-se que a deleção ou diminuição na expressão destes miRNAs resulte no aumento de expressão de *BCL2*, o que contribui para o desenvolvimento do fenótipo maligno.

Em outro estudo foi observado que os níveis de miRNA maduro de miR-143 e miR-145 estão significativamente reduzidos em tumores colorretais (MICHAEL et al. 2003). Interessantemente, os transcritos precursores desses miRNAs foram detectados em quantidades semelhantes em tecidos normais e tumorais, o que indica que o processamento dessas moléculas ocorreu de forma incorreta nas células tumorais.

Mecanismos genéticos e epigenéticos estão envolvidos na perda da regulação de miRNAs que podem potencialmente estar envolvidos na carcinogênese. Os

mecanismos genéticos envolvem geralmente alterações cromossômicas como mutação, deleção, amplificação ou translocação dos miRNAs. Estudos demonstraram que aproximadamente 50% dos miRNAs humanos estão presentes em áreas do genoma conhecidas como sítios frágeis (SF), os quais estão associadas ao câncer (CALIN et al. 2004). Como exemplo, o miR-125b-1 está localizado em um SF em 11q24, o qual se encontra deletado em um grupo de pacientes com câncer de mama, pulmão, ovário e cervical (CALIN et al. 2004; IZZOTTI et al. 2009).

A descoberta de uma mutação germinativa nos transcritos primários de miR-16-1 e miR-15a, associados à leucemia linfocítica crônica, corroboram o papel dos miRNAs como genes de predisposição ao câncer (CALIN et al. 2002; CALIN et al. 2005; RAVECHE et al. 2007). Foi também demonstrada a associação entre mutações na linhagem germinativa de miR-125a e tumores de mama (LI et al. 2009).

Uma série de variantes do miRNA precursor ou transcrito primário, que altera a estrutura secundária da molécula e conseqüentemente a expressão do miRNA maduro, foi associada a vários tipos de câncer, incluindo carcinomas de mama e ovário familiares com ausência de mutações em *BRCA1/2* (SHEN et al. 2008; SHEN et al. 2009; SHEN et al. 2010), carcinoma papilar de tireóide (JAZDZEWSKI et al. 2008), câncer gástrico (PENG et al. 2010), câncer de pulmão (HU et al. 2008; TIAN et al. 2009), câncer de próstata (XU et al. 2010), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (LIU et al. 2010a) e câncer de bexiga (YANG et al. 2008). Além disso, foram reportados mutações nos sítios de ligação de miRNAs ligados ao câncer (RYAN et al. 2010; PELLETIER et al. 2010). Muitas dessas mutações influenciam a suscetibilidade ao câncer (NICOLOSO et al. 2010), de forma que uma mutação hereditária em um suposto sítio de ligação de miRNAs da família let-7 no oncogene

KRAS aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de câncer de ovário e pulmão (CHIN et al. 2008; RATNER et al. 2010). Esse risco aumentado pode, em parte, ser atribuído à modulação da regulação do mRNA como resultado de alteração na afinidade de sítios de ligação alvos do miRNA (CHAN et al. 2011). Além disso, os miRNAs por sua vez também podem ser regulados por oncogenes ou supressores tumorais, como já descrito para o gene supressor *TP53* e o oncogene *cMYC* que regulam cascatas de miRNAs (DI LEVA e CROCE 2010).

SUZUKI et al. (2009) demonstraram que a associação da proteína TP53 com a enzima Droscha em células tratadas com doxorrubicina promove o processamento de miRNAs supressores tumorais mediados pela Droscha em resposta a danos no DNA. Portanto, a perda do *TP53* nos tumores reduz os níveis dos miRNAs que são transcricionalmente regulados pela proteína TP53 ou pelo seu processamento induzido pela Droscha.

O cluster do miR-17-92 é freqüentemente amplificado em linfomas e age cooperativamente como um oncogene, possivelmente regulando fatores apoptóticos ativado em resposta à expressão aumentada do *MYC* (MU et al. 2009). OTA e cols. demonstraram que a proteína MYC induz a expressão do cluster miR-17-92, e experimentos de imunoprecipitação da cromatina revelam que a MYC se liga no primeiro intron do gene receptor do cluster miR-17-92, produzindo o RNA não-codificante C13orf25 (CANNELL e BUSHELL 2010; PETROCCA et al. 2008). De fato, os autores identificaram o mRNA *E2F1*, que gera um *loop feedback* positivo recíproco com MYC, como um alvo direto do miR-17-5p e miR-20a. Com base nestes resultados, o cluster miR-17-92 deve limitar a atividade do *E2F1*, reduzindo a proliferação celular induzida pelo MYC. Neste contexto, o cluster miR-17-92 age

como um supressor do tumor, levando em consideração que o aumento do E2F1 induz apoptose (WU e YU 2009). Este cluster pode ser ativado por MYC para bloquear a atividade apoptótica de E2F1, permitindo a proliferação mediada pelo MYC.

Outro aspecto importante e que merece ser ressaltado é que uma série miRNAs apresenta padrões inversos de expressão em diferentes tumores, podendo apresentar expressão aumentada em alguns tumores e diminuída em outros. Um exemplo é o miR-205, cuja expressão está aumentada em carcinomas de pulmão, bexiga e pâncreas, em contrapartida com sua expressão diminuída em carcinomas de próstata, mama e de células escamosas de esôfago. Sugerindo, portanto, que alguns miRNAs podem apresentar um papel duplo, agindo como oncogenes ou supressores tumorais, dependendo do tipo de célula e o padrão de expressão gênica (revisado em MELO e ESTELLER 2010).

Além dos casos citados, diversos outros estudos demonstraram associação entre alterações em miRNAs e em seus genes alvo e o desenvolvimento e/ou progressão de diferentes tumores. No entanto, apesar da importância dessas moléculas no câncer e a possibilidade de utilização dos miRNAs como alvo de drogas, não há, para o nosso conhecimento, nenhum estudo publicado em literatura (base de dados Pubmed, acesso em 20/05/2011) avaliando miRNAs em CaPe.

1.11 Os miRNAs candidatos em CaPe

No presente estudo optou-se pela avaliação de miRNAs presentes em regiões de ganhos e perdas genômicas identificados pela análise de CGH array e que foram

identificados como reguladores putativos dos genes membros da família SLC que apresentaram padrão de expressão gênica alterado nos experimentos de expressão gênica em larga escala. Os miRNAs, miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133b e miR-223 e os genes por eles regulados estão listados na Quadro 1.

Embora estes miRNAs tenham sido identificados como potencialmente reguladores dos genes *SLCs* alvos deste estudo, é bastante provável que regulem outros genes envolvidos no desenvolvimento/progressão dos CaPe, uma vez que cada miRNA pode regular um grande número de genes.

Quadro 1 - miRNAs e seus genes alvo pertencentes à família SLC detectados como alterados no estudo de Busso (2011).

miRNA	Alterações aCGH (no. casos)	Genes da família SLC regulados (localização citogenética)
hsa-miR-22	Perdas (6)	↑ <i>SLC1A3</i> * (5p13)
hsa-miR-26b	Perdas (3)	↓ <i>SLC25A37</i> , ↓ <i>SLC25A20</i> , ↑ <i>SLC25A16</i> * (10q21.3)
hsa-miR-23b	Ganhos (5)	↑ <i>SLC30A1</i> , ↑ <i>SLC7A1</i> , ↑ <i>SLC1A3</i> * (5p13), ↓ <i>SLC25A4</i> * (4q35)
hsa-miR-27b	Ganhos (5)	↓ <i>SLC25A25</i> * (9q34.11)
hsa-miR-133b	Ganhos (3)	↓ <i>SLC25A36</i> , ↑ <i>SLC27A4</i> * (9q34.11)
hsa-miR-223	Ganhos (2)	↓ <i>SLC8A1</i> * (2p23-p22)

↑ aumento na expressão gênica, ↓ diminuição na expressão gênica, * genes selecionados para investigação no presente estudo com base nos maiores valores de *fold change* (maior ou igual a 3).

1.11.1 miR-22

Além de possivelmente regular *SLC1A3*, segundo BAR et al. (2010), o miR-22 é também uma molécula regulatória da via PTEN/AKT, e que atua diminuindo os níveis de *PTEN*. Curiosamente, o próprio miR-22 é regulado por AKT, sugerindo que miR-22 forma um circuito de *feed-forward* nesta via. (BAR et al. 2010)

PANDEY e PICARD (2009) relataram a inibição da expressão do gene do receptor de estrógeno alfa (*ER α*) por miR-22. O miR-22 apresenta níveis de expressão alterados em alguns tipos de cânceres, como aumentada em câncer de próstata (POLISENO et al. 2010) e diminuído em câncer de mama e mieloma múltiplo (LIONETTI et al. 2009; XIONG et al. 2010). Os resultados controversos indicam que o miR-22 regula genes-alvo diferentes e portanto desempenha papéis distintos em diferentes tipos de tumor.

Recentemente, ZHANG et al. (2010) identificaram o papel funcional de miR-22 no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC). Os autores avaliaram a

expressão de miR-22 em 160 amostras de HCC e de tecidos não neoplásicos pareados e observaram diminuição de sua expressão nos tumores cujos pacientes também apresentavam pior sobrevida. Neste mesmo relato, foi observado que a diminuição de expressão de miR-22 estava associada com aumento da expressão da histona deacetilase 4 (*HDAC4*), que tem um papel importante na regulação epigenética e em câncer. Estudos funcionais em linhagens de HCC mostraram que o silenciamento de *HDAC4* inibia significativamente a proliferação celular dessas linhagens, mostrando assim que a perda da regulação de miR-22 leva ao aumento do gene alvo *HDAC4*, contribuindo assim para o processo tumoral.

1.11.2 miR-23b

GAO et al. (2009) relataram que miR-23a e miR-23b regulam a glutaminase mitocondrial (GLS), uma enzima envolvida no catabolismo da glutamina, que é a maior fonte de energia e nitrogênio no catabolismo da célula tumoral. Estes miRNAs são por sua vez regulados pelo oncogene c-MYC. Assim, em tumores com aumento de c-MYC ocorre repressão transcricional de miR-23a e miR-23b, que por sua vez leva ao aumento da expressão de *GLS* na célula tumoral, aumentando a sua capacidade energética.

Em estudo recente, LIU et al. (2010b) identificaram a expressão aumentada de miR-23b no câncer renal como um importante regulador da Prolina Oxidase (POX). A expressão ectópica aumentada do miR-23b em células renais normais resultou em uma marcante diminuição da expressão da *POX*, enquanto a expressão de *POX* aumentou acentuadamente quando miR-23b endógena foi silenciada por seu antagomirs (induz ROS, inibe a sinalização do HIF e aumenta a apoptose) em células

de câncer renal. Amostras de carcinoma renal e tecidos humanos normais pareados mostraram uma correlação negativa entre o miR-23b e a expressão da proteína POX, demonstrando assim a sua comprovação clínica. Esses resultados sugerem que miR-23b tem como alvo dirigido a *POX* podendo agir como um oncogene. Assim, a diminuição da expressão do miR-23b pode ser uma forma eficaz de inibir o crescimento do tumor renal.

1.11.3 miR-26b

JI et al. (2009) relataram que a expressão de miR-26a e miR-26b em tecido hepático não tumoral era maior nas mulheres que nos homens. Nos carcinomas hepáticos, os autores observaram a redução dos níveis de expressão do miR-26, em comparação com os tecidos pareados não tumorais. Além disso, tumores com expressão reduzida do miR-26 tinham um padrão distinto do transcriptoma. A análise de redes de genes revelou que ativação de vias de sinalização de NF-kb e a interleucina-6 podem desempenhar um papel no desenvolvimento do tumor. Os pacientes cujos tumores tiveram expressão diminuída de miR-26 tinham redução da sobrevida global, porém uma melhor resposta ao interferon que os pacientes cujos tumores tiveram alta expressão de miR-26.

Recentemente, JI et al. (2010) mostraram que miR-26b está envolvido no aumento de expressão da *COX-2* em células de carcinoma epitelial da nasofaringe (CNE) tratadas com desferroxamina (DFOM). O nível de expressão do miR-26b em células CNE tratadas com DFOM foi inversamente proporcional ao nível de expressão da proteína COX-2. A expressão aumentada do miR-26b em células CNE tratadas com DFOM inibiu a proliferação celular. No mesmo estudo, o ensaio de

gene repórter luciferase indicou que a região 3' não traduzida da *COX-2* é a região de ligação para o miR-26b.

1.11.4 miR-27b

O objetivo do trabalho do LI et al. (2010) foi encontrar um grupo de miRNAs que poderiam ser usados como novos marcadores de risco para o diagnóstico de aterosclerose obliterante (ASO) na fase precoce. O aumento no nível de expressão foi significativo nos miR-130, miR-27b e miR-210 e foi observada em amostras sorológicas de pacientes com ASO. A expressão de miR-130 e miR-27b, em soros de pacientes com ASO foi positivamente correlacionada com Estágios Fontaine ou (classificação de Fontaine). O escore de Fontaine é baseado nos sintomas do paciente. O estágio I corresponde a pacientes assintomáticos, o estágio IIa corresponde a claudicação intermitente com uma distância de caminhada limitada a 200 metros e o estágio IIb corresponde a menos de 200 metros. O estágio III descreve pacientes com DOAP (doença obstrutiva arterial periférica) severa com dor em repouso e o estágio IV descreve pacientes com lesões tróficas (úlceras/necroses).

KARBIENER et al. (2009) demonstraram que o miR-27b tem expressão diminuída durante a adipogênese de células humanas multipotentes derivadas de célula mãe de adipócitos. Os autores observaram que a expressão aumentada de miR-27b leva a indução de PPAR- γ e C/EBP α , dois reguladores chave da adipogênese.

Em um análise *in silico*, AKAHTAR et al. (2010), identificaram uma sequência na região 3'-não traduzida (3'-UTR) do mRNA da *MMP-13* (metaloproteinase 3) que poderia ser reconhecida por miR-27b. A expressão aumentada da *MMP-13* foi correlacionada com a expressão diminuída de miR-27b.

A regulação de *MMP-13* pelo *mir-27b* foi demonstrada por ensaio de gene repórter em culturas de condrócitos. Estes dados mostram que o *miR-27b* pode desempenhar um papel na regulação da expressão da *MMP-13* em condrócitos humanos.

1.11.5 miR-133b

A análise de expressão de miRNAs em larga escala em carcinomas de pulmão revelou 41 miRNAs alterados, sendo que *miR-133b* apresentou a menor expressão no tecido tumoral em relação ao tecido não neoplásico (redução de 28 vezes). Dois membros de família Bcl-2 (*MCL-1* e *BCL2L2/BCLw*) envolvidas com sinais anti-apoptóticos foram detectados como alvos prováveis de *miR-133b*. Estes dados foram confirmados em ensaios *in vitro* em que a expressão aumentada de *miR-133b* promoveu diminuição de *MCL-1* e *BCL2L2* (CRAWFORD et al. 2009).

A diminuição de expressão de *miR-133b* foi relatada em carcinoma colorretal (CCR) em comparação com tecido pareado não neoplásico. A análise em linhagens de CCR mostrou que a expressão ectópica de *mirR-133b* regulou negativamente o receptor tirosina quinase *MET*, afetando a proliferação celular e a apoptose (HU et al. 2010). Recentemente, foi mostrado que a diminuição de expressão de *miR-133b* estava associada a pior sobrevida em pacientes com CCR, sugerindo seu papel como marcador prognóstico nestes tumores (AKÇAKAYA et al. 2011).

1.11.6 miR- 223

Estudo de XU et al. (2011) mostraram que os níveis séricos dos *miR-21*, *miR-122* e *miR-223* estavam elevados em pacientes com carcinoma hepatocelular ou

hepatite crônica, sugerindo que estes miRNAs podem ser novos biomarcadores de lesão no fígado, mas não especificamente no carcinoma hepatocelular (HCC).

A expressão aumentada do miR-223 foi relatada em diferentes tumores sólidos como carcinoma de cólon, pâncreas, próstata e de estômago (VOLINIA et al. 2006).

Os perfis de expressão de miRNAs por análise em larga escala (228 miRs na plataforma) foram obtidos a partir de 4419 amostras que incluíram 51 tumores sólidos (pulmão, mama, estômago, próstata, cólon, e pâncreas) e 177 amostras normais dos mesmos tecidos. Os autores usaram uma abordagem diferente para identificar miRNAs que eram marcadores prognóstico no câncer, sem o viés da especificidade de cada tecido. Para isso, primeiro foram identificadas as seis assinaturas de câncer tecido-específico, e em seguida, foram selecionados os miRNAs compartilhados entre as diferentes assinaturas de miRNAs. Foi obtida uma lista de 21 miRNAs que apresentavam expressão aumentada em pelo menos 3 dos 6 tumores, sendo miR-21 o único alterado nos seis tumores diferentes. Interessantemente, o miR-223 foi o quinto mais comumente alterado nos tumores, apresentando aumento de expressão em quatro dos seis tumores (colon, pâncreas, próstata e estômago), sendo que estes mostraram maior compartilhamento de miRNAs entre suas assinaturas (VOLINIA et al. 2006; VOLINIA et al. 2010).

2 OBJETIVOS

Resultados de um estudo anterior, em nosso laboratório, identificaram um conjunto de miRNAs e genes da família SLC que parecem ser relevantes em tumores de pênis (CaPe). Sendo assim, miRNAs presentes em regiões com alterações genômicas e seus genes alvo, pertencentes à família SLC e que apresentaram alteração na expressão de transcritos foram selecionados para avaliação. Portanto, este estudo teve como objetivos:

- Avaliar a expressão dos miRs: hsa-miR-22, hsa-miR-23b, hsa-miR-26b, hsa-miR-27b, hsa-miR-133b e hsa-miR223 presentes em regiões de ganhos e perdas genômicas na análise prévia de CGH array;
- Avaliar a expressão dos genes alvo desses miRNAs pertencentes à família SLC: *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4*, os quais estavam diferencialmente expressos na análise de expressão gênica em larga escala;
- Correlacionar os resultados obtidos para miRNAs com dados de expressão dos genes por eles regulados;
- Comparar os resultados obtidos nos pacientes HPV positivos e negativos;
- Comparar os achados de expressão gênica com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes com CaPe.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Amostras de 36 carcinomas de pênis (CaPe) foram obtidas de pacientes acompanhados no Hospital AC Camargo, SP e Hospital do Câncer de Barretos, SP. As amostras de CaPe compreenderam dois grupos: grupo de validação técnica e de validação biológica. O grupo de validação técnica incluiu 29 tumores de pênis previamente investigados pela análise integrada (aCGH e expressão gênica em larga escala) e genotipagem de HPV, dos quais 10 são provenientes do Banco de Tumores do Hospital AC Camargo, SP e 19 do Hospital do Câncer de Barretos, SP. No entanto, uma amostra (ID nº 24) foi excluída das análises de expressão (detalhado na seção de Resultados), totalizando desta forma 35 CaPe avaliados. O grupo de validação biológica compreendeu um grupo independente de amostras tumorais constituída de 7 pacientes, sendo 4 do Hospital AC Camargo e 3 do Hospital de Barretos. Todos os casos preencheram os critérios de inclusão (ausência de tratamento quimio ou radioterápico prévio, presença de outro tumor primário prévio ou em concomitância) e exclusão (metástase à distância ao diagnóstico). Os dados clínicos e histopatológicos foram obtidos dos 35 pacientes com CaPe investigados nestes estudo e estão listados na Tabela 1. Amostras de glândula (N=4) obtidas à necrópsia de pênis de homens adultos foram utilizadas como referência após a confirmação histopatológica como normais.

Os tecidos congelados de CaPe e tecidos normais foram submetidos à análise histológica para avaliar a porcentagem do tecido de interesse (sob a responsabilidade

do Dr Fernando Augusto Soares, Departamento de Anatomia Patológica, Hospital do Câncer AC Camargo, SP). Foram macrodissecadas manualmente amostras que continham tecido não-neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes. Somente amostras com pelo menos 70% de células malignas foram incluídas no estudo e seguiram extração do RNA.

Todas as amostras foram coletadas após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética do Hospital AC Camargo (Processo 1230/2009) e do Hospital do Câncer de Barretos (Processo 363/2010).

Tabela 1 - Características clínicas e histopatológicas dos pacientes com CaPe dos grupos de validação técnica (N=28) e biológica (N=7).

Variável	Grupo de Validação Técnica N (%)	Grupo de Validação Biológica N (%)
<i>Idade (anos)</i>		
Mediana (min-max)	54 (30-91)	54 (24-86)
<i>Seguimento (meses)</i>		
Mediana (min-max)	8 (1-35)	10 (3-44)
<i>Classificação histológica</i>		
CEC usual	25 (89)	7 (100)
Verrucoso	2 (7)	-
nd	1 (4)	-
<i>Raça</i>		
Branco	15 (54)	3 (43)
Não-branco	11 (39)	4 (57)
nd	2 (7)	-
<i>Postectomia</i>		
Sim	10 (36)	2 (29)
Não	1 (4)	-
nd	17 (60)	5 (71)
<i>Infecção HPV</i>		
HPV16	7 (25)	-
HPV16/40	-	1 (14)
HPV 16/52/59	-	1 (14)
HPV18	1 (3,6)	-
HPV18/40	1 (3,6)	-
HPV31	1(3,6)	-
HPV81	-	-
Negativa	18 (64)	5 (72)

Cont/ Tabela 1

<i>Variável</i>	Grupo de Validação Técnica Nº (%)	Grupo de Validação Biológica Nº (%)
<i>Tabaco</i>		
Sim	12 (43)	1 (14)
Não	12 (43)	4 (57)
nd	4 (14)	2 (29)
<i>Álcool</i>		
Sim	8 (29)	1 (14)
Não	16 (57)	3 (43)
nd	4 (14)	3 (43)
<i>Estadio</i>		
I	7 (25)	-
II	6 (21)	2 (29)
III	11 (39)	2 (29)
IV	3 (11)	1 (14)
nd	1 (4)	2 (28)
<i>Grau histológico</i>		
I	10 (36)	4 (57)
II	13 (46)	3 (43)
III	2 (7)	-
nd	3 (11)	-
<i>T</i>		
1	8 (29)	-
2	8 (29)	4 (57)
3	10 (36)	1 (14)
4	1 (3)	-
nd	1 (3)	2 (29)
<i>N</i>		
0	18 (64)	2 (29)
1	3 (11)	1 (14)
2	5 (18)	1 (14)
3	1 (3,5)	1 (14)
nd	1 (3,5)	2 (29)
<i>M</i>		
0	27 (96)	5 (71)
1	0	0
nd	1 (4)	2 (29)
<i>Invasão perineural</i>		
Presente	5 (18)	2 (29)
Ausente	22 (79)	5 (71)
nd	1 (3)	-
<i>Invasão angiolinfática</i>		
Presente	2 (7)	-
Ausente	25 (89)	7 (100)
nd	1 (4)	-

Min: mínima; max: máxima

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração do RNA

As alíquotas de RNA foram obtidas do Banco de Macromoléculas sob a responsabilidade da Dra Dirce Carraro. Os tecidos de CaPe do Hospital de Câncer de Barretos, SP, foram obtidas com a colaboração do Dr André Lopes Carvalho e Dr Cristovam Scapulatempo Neto.

Em parte das amostras de CaPe (12 de 35 amostras), o RNA foi extraído pelo kit comercial RNasy (Quiagen) seguindo as recomendações do fabricante e foram previamente utilizadas nos estudos de expressão gênica por microarray. Em 23 de 35 amostras foi utilizado o método de extração pelo *Trizol*® (Invitrogen).

Resumidamente, os tecidos congelados (até 100mg) foram homogeneizados utilizando o equipamento Precellys® (Carlsbad, Califórnia, EUA) e 1 mL de *Trizol*® (Invitrogen), de acordo com especificações do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA). O Bioanalyzer fornece um número de integridade do RNA (RIN-*RNA Integrity Number*) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA íntegro (SCHOEDER et al. 2006). Os resultados das análises dos RNAs estão apresentados no Anexo I. As amostras de RNA foram estocadas em alíquotas a -80°C.

3.2.2 Análise de expressão dos genes da família SLC

Os experimentos para a análise da expressão gênica foram realizados segundo as orientações descritas em *MIQE guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, descrito por BUSTIN et al. 2009).

- **Obtenção de cDNA**

Previamente à reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA), 2µg de cada amostra de RNA foi diluída com H₂O DEPC a uma concentração final de 0,125 ug/µL e a seguir tratadas com *DNAseI Amplification Grade* (Invitrogen - 1 U/µL). A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 32 µL contendo 5x *First Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 10 mM de cada dNTP, 0,5 ug/µL de Oligo(dT)₁₈, 0,1M ditioneitol (DTT), 100 ng/µL de *random primer* e 200U da transcriptase reversa *SuperScript™ III* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 50°C por 60 min e a reação foi subsequentemente inativada por 15 min a 70°C. O cDNA foi estocado a -20°C.

- **Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa via Transcriptase Reversa (RT-qPCR) para confirmação de dados de microarray**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos genes alvos *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4* foram desenhados a partir da sequência de mRNA do gene em questão (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), pelo programa Primer-Blast

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Essa ferramenta permite que o desenho dos iniciadores leve em consideração alinhamentos, mesmo que parciais, com outras seqüências potencialmente amplificáveis pelos iniciadores, avaliados em conjunto, não separadamente. Para evitar a amplificação de DNA genômico por possível contaminação, os iniciadores desenhados flanqueavam junções éxon-éxon ou com íntron de mais de 1.000 pares de bases entre os éxons. Para que a reação de amplificação apresentasse alta eficiência, foi considerado um tamanho máximo de 150 pb. Para aumentar os índices de concordância entre os dados de *microarray* e RT-qPCR, foram selecionadas regiões para a construção dos iniciadores de modo que houvesse apenas a amplificação das mesmas variantes de *splicing* detectadas pelas sondas do *microarray*.

O programa Oligoanalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) foi utilizado para prever possíveis formações de estruturas secundárias estáveis (*hairpins*) e dímeros de iniciadores (homo e heterodímeros, no caso de estrutura estável com 3' livre), que podem levar a redução da eficiência da reação. Foram testados como genes de referência *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HMBS*, *HPRT* e *RPLP0*. As seqüências dos iniciadores para os genes alvo e referência estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

Símbolo do gene	Código de acesso	Seqüência	T _m (°C)	Localização	Tamanho do produto
<i>SLC1A3</i>	NM_004172.4	D - 5' ATGAAGGAACAGGGGCAGGC 3'	60	5p13	116pb
		R - 5' GCAATCAGGAAGAGAATACCCACGG 3'			
<i>SLC8A1</i>	NM_021097.2	D - 5AGTGCTGGGGAAGATGATGACGACG 3'	60	2p23-p22	164pb
		R - 5AGGATGGAGACAATGAAACACGCCC 3'			
<i>SLC25A4</i>	NM_001151.3	D - 5' TGGTCTGGGCGACTGTATCATC 3'	60	4q35	143pb
		R - 5' GCAGCATCCCCTTGGCAGTATC 3'			
<i>SLC25A16</i>	NM_152707.3	D - 5' TACTTTGTGGTGGTGTGCTGG 3'	60	10q21.3	127pb
		R - 5' GTATCCCGCATGGTAAGGCACTT 3'			
<i>SLC25A25</i>	NM_052901.2	D - 5' TGGACAGGCTCAAGGTGTCAT 3'	60	9q34.11	119pb
		R - 5' ATTGCCCCGCCAGAGTGACC 3'			
<i>SLC27A4</i>	NM_005094.3	D - 5' GCCGCATCATCCAGAAAGACCCC 3'	60	9q34.11	137pb
		R - 5' GTCCATCACCAGCACATCACCAGT 3'			
<i>ACTB*</i>	NM_001101.3	D - 5' TTCCTGGGCATGGAGTC 3'	60	7p22	84pb
		R - 5' CAGGTCTTTGCGGATGTC 3'			
<i>GAPDH*</i>	NM_002046	D - 5' TGCACCACCAACTGCTTAG 3'	60	12p13	176pb
		R - 5' GATGCAGGGATGATGTTT 3'			
<i>GUSB*</i>	NM_000181.3	D - 5' GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT 3'	60	7q21.11	101pb
		R - 5' CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA 3'			
<i>HMBS*</i>	NM_000190	D - 5' GGCAATGCGGCTGCAA 3'	60	11q23.3	64pb
		R - 5' GGGTACCCACGCGAATCAC 3'			
<i>HPRT1*</i>	NM_000194.2	D - 5' TCATTATGCTGAGGATTGGAAAG 3'	60	Xq26.1	101pb
		R - 5' GGCCTCCCATCTCCTTCATC 3'			
<i>RPLP0*</i>	NM_001002.3	D - 5' GGAGACGCATTACACCTTC 3'	60	12q24.2	139pb
		R - 5' CTTACCTTAGCTGGGG 3'			

Legenda: * Genes de referência (endógenos); D= iniciador direto; R = iniciador reverso.

• Padronização das reações de (RT-qPCR)

Para a otimização das reações para os genes alvo foi selecionada a temperatura de anelamento ideal para cada par de iniciadores estudados. Para isso foi realizada uma PCR com gradiente de temperatura, a qual permite avaliar a intensidade das bandas após 20-30 ciclos de amplificação e a concentração ideal de

iniciadores. Foi utilizada uma curva de diluição com 300, 100, 33, 11 nM de cada iniciador.

Foi determinada a eficiência da reação de amplificação para cada dupla de iniciadores utilizados, por meio de uma curva de diluição de cDNA de um *pool* de amostras de CaPe em concentrações seriadas (100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,8 ng e 0,16 ng). Os valores de C_q (ciclo de quantificação) para cada diluição de cDNA e as concentrações respectivas de RNA (log₁₀ RNA) foram plotados num gráfico para obtenção da curva-padrão. A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, bem como o valor da inclinação da reta ou slope. O cálculo da eficiência da amplificação foi realizado segundo a fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Os ensaios demonstraram eficiências próximas a 100%, indicando que ao final de cada ciclo o transcrito molde é duplicado, com variação de cerca de 10%, que não interfere significativamente nos resultados obtidos. As curvas de dissociação apresentaram picos bastante definidos, demonstrando especificidade do produto amplificado.

- **RT-qPCR para os genes *SLCs***

Para cada reação foram utilizados 20 ng de cDNA, 1X de tampão para PCR (Invitrogen), 0,2 uM de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso) num volume final de 12,5 µl. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e submetidas às seguintes condições (para todos os iniciadores): 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min no sistema de PCR em tempo real ABI 7500 (Life technologies). A especificidade do produto amplificado foi verificada por meio da curva de dissociação. Controles negativos e positivos foram incluídos em todas as reações. O controle positivo constitui-se de um pool de

amostras tumorais preparado em quantidade suficiente para ser utilizado em todas as reações. Este controle foi utilizado como amostra “normalizadora”, o que permitiu avaliar as variações intra-ensaios (detalhes no item 3.4). Amostras cujas réplicas mostraram desvio padrão maior que 0,5 do ciclo de quantificação (Cq) entre as replicatas foram re-avaliadas. A média dos valores de Cq das triplicatas de cada amostra foi usada na quantificação da expressão dos genes de interesse.

3.2.3 Análise de expressão de microRNAs (miRNA)

Para a análise de expressão foram selecionados seis miRNAs candidatos à regulação transcricional dos genes *SLCs*: miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133b e miR-223. A seleção dos miRNAs candidatos foi baseada em algoritmos para predição de alvos de bancos de dados públicos, como *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>) e *PicTar* (<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar>).

Como referências foram testados dois genes codificadores de miRNAs (let7-a e miR-16) em conjunto com quatro genes codificadores de pequenos RNAs nucleolares (RNU44, RNU48, RNU6B e RNU47). Para todos as referências foi utilizado o sistema TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems, que utiliza sondas marcadas com fluorescência (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab/TaqManMicroRNAassays>; Códigos de acesso miRBase: RNU6B (NR_002752), RNU44 (NR_002750); RNU48 (NR_002745), U47 (AF141346), hsa-let-7a (MIMAT0000062) e hsa-miR-16 (MIMAT0000069).

Quadro 3 - Caracterização das sequências de microRNAs alvos avaliadas em amostras de CaPe e controles.

MicroRNA	Sequência referência	Localização	Sequência madura	Sequência <i>Stem loop</i>
hsa-mir-22	NR_029494.1	17p13.3	AAGCUGCCAGUUGAAGAAC UGU MIMAT0000077	GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAG CUUUUUGUCCUGACCCAGCUAAAGCUGCCAG UUGAAGAACUGUUGCCCUCUGCC MI0000078
hsa-mir-23b	NR_029664.1	9q22.32	AUCACAUUGCCAGGGAUUA CC MIMAT0000418	CUCAGGUGCUCUGGCUGCUUGGGUUCUGGC AUGCUGAUUUGUGACUUAAGAUUAAAAUCA CAUUGCCAGGGAUUAACCACGCAACCACGACC UUGGC MI0000439
hsa-mir-26b	NR_029500.1	2q35	UUCAAGUAAUUCAGGAUAG GU MIMAT0000083	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGAUAGG UUGUGUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCAUAUACU UGGCUCGGGGACCGG MI0000084
hsa-mir-27b	NR_029665.1	9q22.32	UUCACAGUGGCUAAGUUCU GC MIMAT0000419	ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGA UUGGUGAACAGUGAUUGGUUCCGCUUUGU UCACAGUGGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGA AGGUG MI0000440
hsa-mir-133b	NR_029903.1	6p12.2	UUUGGUCCCCUUAACCAG CUA MIMAT0000770	CCUCAGAAGAAAGAUGCCCCCUGCUCUGGCU GGUCAAACGGAACCAAGUCCGUCUCCUGAG AGGUUUGGUCCCCUUAACCAGCUACAGCAG GGCUGGCAAUGCCCAGUCCUUGGAGA MI0000822
hsa-mir-223	NR_029637.1	Xp12	UGUCAGUUUGUCAAAUACC CCA MIMAT0000280	CCUGGCCUCCUGCAGUGCCACGCUCCGUGUA UUUGACAAGCUGAGUUGGACACUCCAUGUGG UAGAGUGUCAGUUUGUCAAAUACCCCAAGUG CGGCACAUGCUUACCAG MI0000300

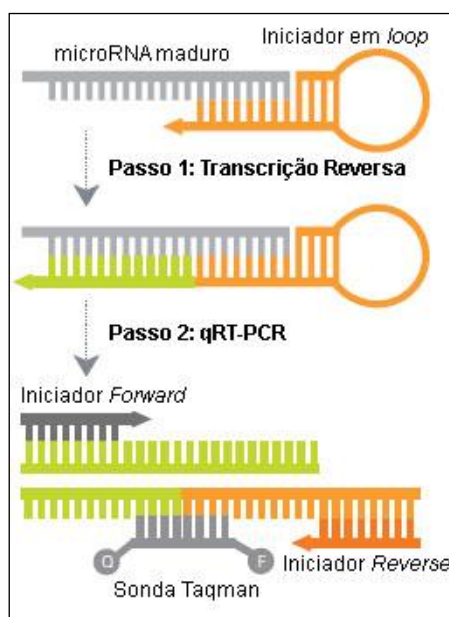
- Obtenção do cDNA**

As amostras de RNA foram previamente diluídas em uma concentração de 2ng/μL e a síntese de cDNA foi realizada usando o kit *Taqman miRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), conforme especificações do fabricante.

- **Síntese cDNA (Taqman miRNA Reverse Transcription Kit - Applied Biosystems)**

A síntese de cDNA foi realizada com iniciadores específicos para os miRNAs alvos e endógenos. Resumidamente, num volume final de 15µl foram adicionados 1,5µl de tampão 10X, 0,15µl de dNTP (100mM cada), 3µl de cada iniciador, 0,19 µl RNase Inhibitor (20U/µl), 1 µl Multiscribe RT enzyme e 5 µl de RNA diluído a 2ng/µl.

Nesta etapa foram utilizados iniciadores em forma de *loop*, os quais apresentam uma região complementar a sequência de cada miRNA maduro (Figura 2).



Fonte: CHEN et al. (2005)

Figura 2 - Modelo representativo das reações de síntese de cDNA e de PCR quantitativa em tempo real pelo sistema Taqman

- **RT-qPCR dos miRNAs**

As reações foram realizadas no sistema de PCR em tempo Real *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Life Technologies), conforme protocolo descrito

anteriormente. Todos os iniciadores para os miRNAs alvo (miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133b e miR-223) e de referência (RNU6B, RNU44, RNU48, RNU47, let-7a e miR-16) foram obtidos pelo sistema TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems, que utiliza sondas marcadas com fluorescência. Os miRNAs foram amplificados utilizando o *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* (Applied Biosystems). Resumidamente, num volume final de 10µl de reação foram adicionados 5µl de Master Mix 2X concentrado, 0,5µl do mix de iniciadores e sonda e 0,7µl cDNA específico para cada miRNA. As reações seguiram as mesmas condições citadas anteriormente para os genes *SLC*. Os critérios de análise das réplicas foram os mesmos que para os genes *SLC*.

3.3 SELEÇÃO DOS GENES E miRNAS DE REFERÊNCIA PARA A NORMALIZAÇÃO DE RT-qPCR

Os genes *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* e *RPLP0* foram avaliados como possíveis genes de referência nos CaPe, uma vez que não existe nenhuma informação sobre transcritos estáveis em tecido peniano para uso como referência em ensaios de RT-qPCR. A escolha das amostras de CaPe para esse pré-teste foi baseada na maior quantidade de RNA disponível.

A mesma estratégia foi utilizada para a seleção dos miRNAs de referência. Foram testados os miRNAs *LET-7a*, *MIR-16*, *RNU44*, *RNU48*, *RNU6b* e *RNU47*. A seleção destes miRNAs de referência baseou-se em dados da literatura que mostraram pouca variação em outros tecidos tumorais. Para esta análise foram incluídas as quatro amostras de tecido peniano não-tumoral, pois a técnica necessita

de pouco RNA total para a análise. Isso leva a uma quantificação mais precisa, caso exista uma modulação dos miRNAs testados durante a tumorigênese.

A estimativa da estabilidade de expressão dos genes candidatos a referência (pré-teste) e a estabilidade real de expressão do conjunto de genes selecionados entre o total de amostras alvo foi realizada pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Esse algoritmo foi desenvolvido por VANDESOMPELE et al. (2002) para determinar os genes de referência mais estáveis para um determinado grupo de amostras.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

3.4.1 Normalização dos dados de RT-qPCR e obtenção da expressão relativa dos genes SLC e miRNA em CaPe.

Para a quantificação relativa de expressão gênica para os mRNA e miRNA alvos, foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001):

$$ERN = \frac{(E+1)_{\text{alvo}}^{\Delta Cq_{\text{alvo}}}}{(E+1)_{\text{referência}}^{\Delta Cq_{\text{referência}}}}$$

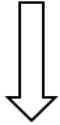
Onde:

ERN – expressão relativa normalizada do gene alvo ou QR (quantificação relativa)

E – eficiência de reação de amplificação

ΔCq – diferença entre o Cq obtido para a amostra referência e o Cq obtido para a amostra em análise.

Ao utilizar mais de um gene na normalização das RT-qPCR aplica-se a média geométrica dos valores de expressão relativa (ou fator de normalização gerado pelo programa geNorm) dos genes de referência mais apropriados, como segue:

$$\text{ERN} = \frac{(E+1)_{\text{alvo}}^{\Delta Cq_{\text{alvo}}}}{\cancel{(E+1)_{\text{referência}}^{\Delta Cq_{\text{referência}}}}}$$


$$\text{ERN} = \frac{2^{\Delta Cq_{\text{alvo}}}}{\text{FN}}$$

Onde FN é o fator de normalização

Para corrigir variações intra-ensaios, a expressão relativa (ERN) do miRNA ou do gene alvo de cada amostra em cada reação foi obtida dividindo-se o valor de expressão de cada amostra pelo fator de normalização (FN). O FN se refere ao valor da expressão do mesmo gene ou miRNA na amostra normalizadora (*pool* de tumores de pênis).

Para a obtenção dos valores de expressão relativa nas amostras tumorais em relação aos tecidos penianos normais, dividiu-se a expressão relativa de cada gene ou miRNA de cada amostra pela mediana dos valores de expressão relativa dos controles.

3.4.2 Análise estatística

As comparações entre os valores de expressão gênica dos genes candidatos e dos miRNAs determinados por RT-qPCR entre CaPe e controles foram realizadas utilizando teste t não paramétrico, teste de Mann-Whitney. A análise de correlação entre os transcritos foi realizada pelo teste de Spearman. A comparação entre os níveis de transcritos e as variáveis clínicas e histopatológicas foi realizada usando testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, quando apropriado. Todas as análises estatísticas consideraram o nível de significância de 5%. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS version 17.0 (SPSS; Chicago, IL) e o *software Graphpad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) para Windows.

4 RESULTADOS

4.1.1 Escolha de transcritos referência para normalização de RT-qPCR

Considerando que não há em literatura relatos sobre transcritos estáveis em tecido peniano para uso como referência em ensaios de RT-qPCR, foram selecionados os genes *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* e *RPLP0* como possíveis referências nos CaPe. O critério de seleção baseia-se no fato destes genes se mostraram estáveis em outros tumores avaliados pela equipe e em relatos da literatura.

O pré-teste, com parte das amostras tumorais (14 de 35 CaPe) que apresentavam maior quantidade de RNA, e seis genes de referência candidatos a normalizadores, demonstrou boa estabilidade (M) de expressão para todos os transcritos testados, segundo o coeficiente de estabilidade de expressão abaixo do limiar de 1,5 sugerido pelo programa geNorm (Tabela 2). O coeficiente de estabilidade de expressão (M) é determinado partindo do princípio de que dois genes referência ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras a serem analisadas, independente de quaisquer condições experimentais ou tipos celulares. O programa geNorm avalia a razão de expressão de cada gene referência em relação aos demais sempre aos pares, o que permite a exclusão dos transcritos menos estáveis (VANDESOMPELE et al., 2002).

Não foi considerada a amostra de menor Cq como referência nessa análise, conforme sugerido por VANDESOMPELE et al. (2002), pois um *pool* de amostras de câncer de pênis foi utilizado como referência, para calibrar os valores de

expressão inter-placas. Os valores de expressão do *pool* para cada gene (1,000) foi omitido na análise pois essa já é composta por uma mistura das amostras-alvo avaliadas.

Nesta análise, *ACTB* demonstrou a expressão mais estável ($M=0,994$) e *GAPDH* menos estável ($M=1,444$) entre as amostras. Após a remoção em série dos genes com maior variação entre as amostras, o programa geNorm indicou o uso de *ACTB* + *GUSB* como o melhor par de transcritos, seguidos dos seguintes genes em ordem decrescente de estabilidade: *HMBS*, *HPRT*, *RPLP0* e *GAPDH* (Figura 3).

O conjunto de genes referência apropriado foi também estimado, pelo cálculo do desvio padrão da relação dos fatores de normalização com a adição de um novo transcrito ao grupo prévio. Observou-se aumento do desvio padrão quando da inclusão de um novo transcrito ao grupo prévio, indicando que a normalização por este conjunto de genes ainda estava adequada (Figura 4).

Tabela 2 - Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência testados.

Amostras	<i>HPRT</i>	<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GUSB</i>	<i>HMBS</i>	<i>RPLP0</i>	FN
PE10T	0.247	0.664	1.087	0.451	0.382	1.007	0.866
PE11T	0.646	0.693	1.007	1.010	0.274	1.366	1.150
PE12T	2.282	3.095	4.959	2.483	1.698	1.625	3.851
PE15T	0.293	0.053	0.019	0.039	0.159	0.017	0.087
PE16T	0.807	1.301	1.149	1.034	0.748	1.866	1.695
PE17T	2.114	2.497	3.053	2.162	2.191	2.395	3.681
PE18T	1.495	1.558	3.972	0.756	1.412	1.283	2.359
PE1T	0.599	0.500	0.257	0.583	0.302	0.406	0.649
PE21T	1.173	0.953	2.173	0.648	1.191	0.895	1.684
PE22T	3.053	1.007	2.219	0.710	0.918	1.815	2.188
PE4T	0.966	2.621	1.214	1.442	0.961	1.165	2.018
PE5T	0.080	0.015	0.004	0.028	0.093	0.012	0.036
PE6T	3.204	1.659	0.973	0.435	0.675	1.231	1.715
PE8T	0.454	0.483	0.319	0.232	0.473	1.072	0.694
M < 1.5	1.371	0.994	1.444	1.093	1.286	1.216	

ACTB apresenta expressão mais estável (verde) individualmente e *GAPDH* é o mais variável (vermelho) nas 14 amostras de CaPe testadas. O fator de normalização (FN) representa a média geométrica da expressão relativa dos seis genes avaliados.

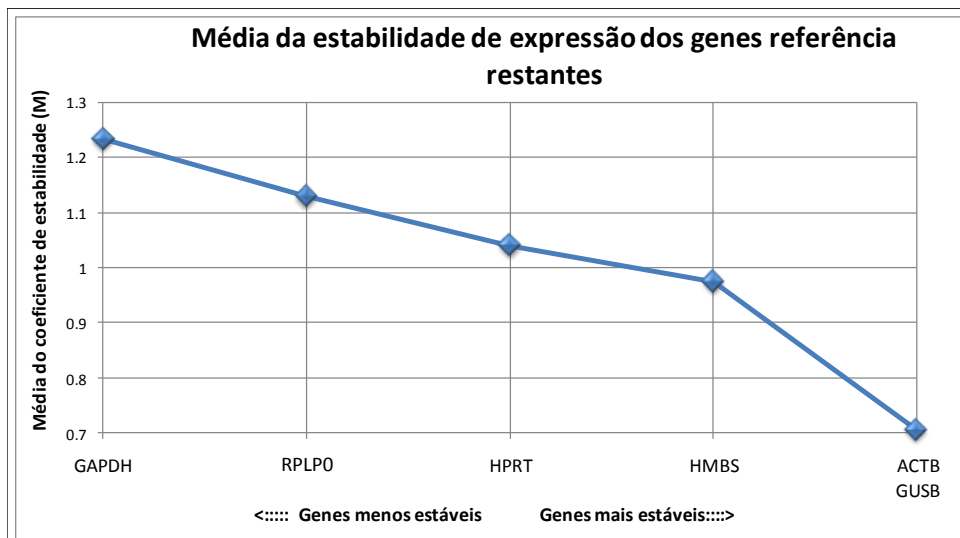


Figura 3 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos genes de referência. Cálculo para a determinação dos melhores genes de referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável, indicando ACTB+GUSB como os mais estáveis com o mesmo valor de estabilidade

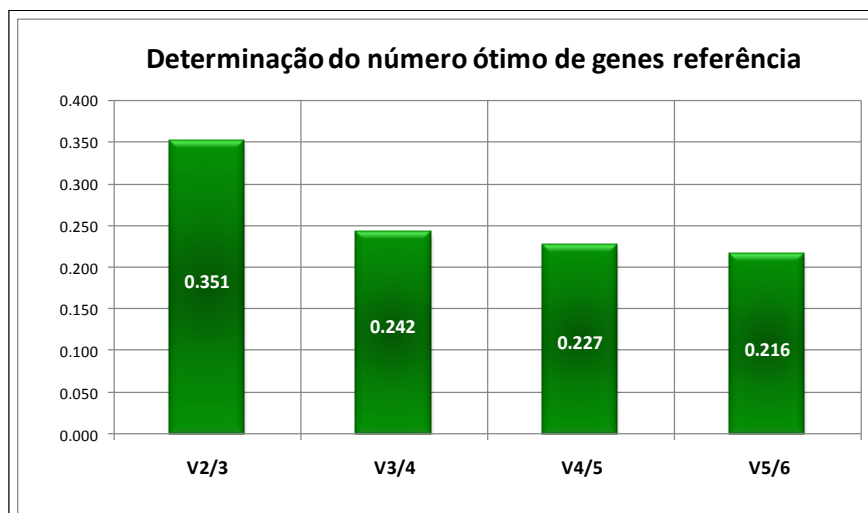


Figura 4 - Determinação do número adequado de genes de referência. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos seis transcritos (5/6) se obtém a normalização de maior fidelidade (*ACTB* + *GUSB* + *HMBS* + *HPRT* + *RPLP0* + *GAPDH*). A análise estima o número de genes de referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação aos fatores de normalização.

Esta análise mostrou que deveriam ser utilizados seis genes de referência para a normalização da expressão dos genes alvos nos CaPe. Isso porque o menor desvio entre os fatores de normalização foi obtido na inclusão do sexto transcrito (*GAPDH*) ao grupo prévio com os cinco ($V_{5/6} = 0,216$). Entretanto, mesmo com tantos genes de referência, não foi possível atingir o ideal ($<0,150$) proposto por VANDESOMPELE et al. (2002), no qual a adição de um novo transcrito para a normalização seria redundante.

Considerando a quantidade limitada das amostras de RNA dos tumores e que não houve diferença significativa após a adição do quarto gene de referência (adição do *HPRT* não alterou de forma significativa a relação dos fatores de normalização com apenas os três genes mais estáveis, $V_{3/4}=0,242$), optou-se por utilizar três genes de referência: *ACTB*, *GUSB* e *HMBS*. Vale ressaltar que a seleção de três genes de referência permite que a estabilidade de expressão seja confirmada no total de amostras de CaPe ao final das análises para a confirmação da estabilidade dos genes de referência (três é o número mínimo de genes para a análise pelo programa geNorm).

4.1.2 Confirmação da estabilidade dos genes de referência para normalização da RT-qPCR

A análise pelo geNorm dos três genes de referência em 35 amostras de CaPe e quatro tecidos penianos normais como controles (N) também revelou boa estabilidade de expressão para todos os genes ($M < 1,5$), indicando agora *GUSB* como o gene de expressão mais estável ($M=0,963$) (Tabela 3). O desvio padrão dos fatores de normalização com os genes *GUSB* + *HMBS* em relação aos genes *GUSB* + *HMBS* + *ACTB* foi praticamente o mesmo que o obtido no pré-teste ($V_{2/3}=0,354$). Este

dado confirmou que a inclusão de novos genes de referência, provavelmente, não resultaria em melhora significativa na normalização (Figura 5).

Tabela 3 –Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos três genes de referência *ACTB*, *GUSB* e *HMBS* selecionados em amostras de carcinoma de pênis (CaPe) e tecido normal de pênis (N).

Amostra	Tecido	<i>ACTB</i>	<i>GUSB</i>	<i>HMBS</i>	FN
1391	N	0.040	0.044	0.094	0.1014
1392	N	0.187	0.091	0.081	0.2057
1394	N	0.020	0.028	0.090	0.0683
1409	N	0.030	0.048	0.082	0.0907
1388	CaPe	1.205	2.406	3.559	4.0232
1389	CaPe	1.054	1.668	4.758	3.7514
PA10T	CaPe	0.517	0.537	1.015	1.2116
PA11T	CaPe	0.236	0.893	0.720	0.9857
PA12T	CaPe	0.033	0.072	0.159	0.1336
PA13T	CaPe	0.044	0.265	0.309	0.2833
PA14T	CaPe	0.016	0.106	0.076	0.0934
PA17T	CaPe	3.493	2.899	8.401	8.1276
PA19T	CaPe	0.458	1.740	1.780	2.0764
PA1T	CaPe	0.166	0.374	0.227	0.4464
PA20T	CaPe	6.546	3.767	14.371	13.0775
PA22T	CaPe	0.968	1.927	5.634	4.0479
PA5T	CaPe	0.399	0.723	0.808	1.1373
PA6T	CaPe	0.486	0.890	1.416	1.5694
PA7T	CaPe	0.334	0.392	0.730	0.8449
PE10T	CaPe	0.664	0.451	0.382	0.8971
PE11T	CaPe	0.693	1.010	0.274	1.0657
PE12T	CaPe	3.095	2.483	1.698	4.3507
PE15T	CaPe	0.053	0.039	0.159	0.1275
PE16T	CaPe	1.301	1.034	0.748	1.8518
PE17T	CaPe	2.497	2.162	2.191	4.2106
PE18T	CaPe	1.558	0.756	1.412	2.1895
PE19T	CaPe	0.516	1.139	1.761	1.8693
PE1T	CaPe	0.500	0.583	0.302	0.8221
PE21T	CaPe	0.953	0.648	1.191	1.6681
PE22T	CaPe	1.007	0.710	0.918	1.6060
PE23T	CaPe	0.521	0.968	3.068	2.1374
PE24T	CaPe	0.243	0.282	0.887	0.7266
PE26T	CaPe	0.177	0.292	0.478	0.5382
PE2T	CaPe	2.700	2.630	6.332	6.5714
PE3T	CaPe	1.443	3.594	5.059	5.4913
PE4T	CaPe	2.621	1.442	0.961	2.8407
PE5T	CaPe	0.015	0.028	0.093	0.0627
PE6T	CaPe	1.659	0.435	0.675	1.4541
PE8T	CaPe	0.483	0.232	0.473	0.6942
M < 1.5		1.147	0.963	1.090	

O gene *GUSB* apresenta expressão mais estável (verde) individualmente e o gene *ACTB* é o mais variável (vermelho) nas 39 amostras de tecido peniano (CaPe e controles) analisadas. O fator de normalização (FN) representa a média geométrica da expressão relativa dos três genes avaliados.

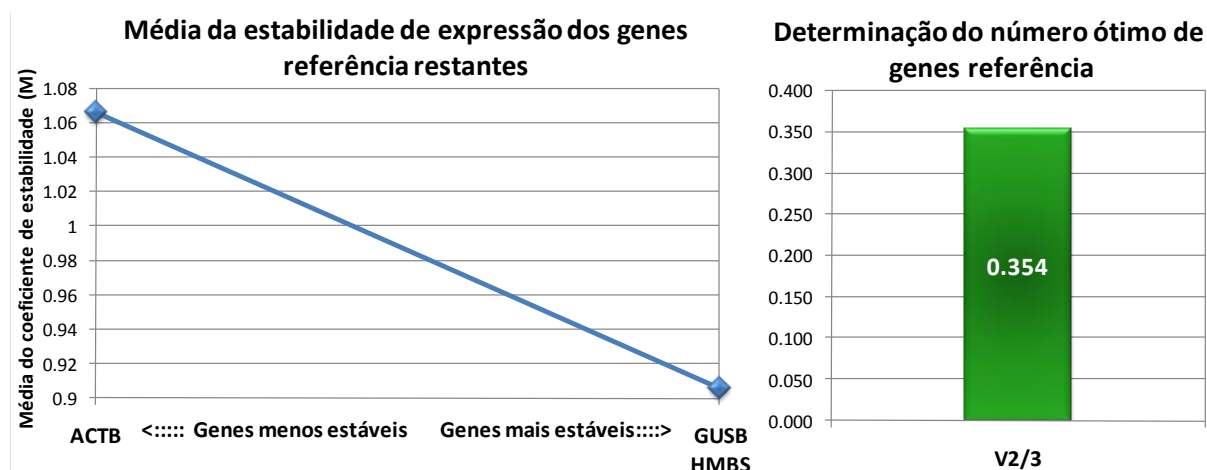


Figura 5 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão ($M=0,92$) e impacto no fator de normalização com o uso dos genes de referência *GUSB* + *HMBS* em relação aos genes *GUSB* + *HMBS* + *ACTB* ($V2/3=0,354$).

4.1.3 Correlação entre valores de expressão relativa dos genes SLCs avaliados por microarray e RT-qPCR

Após a seleção dos genes *GUSB*, *HMBS* e *ACTB* em conjunto como genes de referência para as análises de expressão gênica, todas as amostras foram testadas para os seis genes da família *SLC*: *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4*. Os resultados de expressão relativa dos genes descritos caso a caso estão apresentados no Anexo 2.

A primeira análise realizada avaliou se havia correlação estatística entre os valores de expressão relativa obtidos por RT-qPCR e pelos ensaios prévios de *microarray* de expressão (BUSSO 2011).

A casuística do presente estudo compreendeu dois grupos de pacientes, o grupo de validação técnica e o grupo de validação biológica. O grupo de validação biológica foi incluído em outras análises descritas mais adiante.

O grupo de validação técnica incluiu 28 do total de 29 pacientes anteriormente estudados por *microarray* (Tabela 4). Uma amostra (ID24) foi excluída da análise por não ter apresentado resultados de qualidade na RT-qPCR, devido aos valores de Cq muito altos (acima de 35) e por vezes indeterminado para alguns transcritos avaliados. Além disso, apesar de dispormos de 3 das 4 amostras controle não-tumorais (N) previamente analisadas pela técnica de *microarray*, as mesmas não foram incluídas nesta análise de correlação entre os dados de *microarray* e RT-qPCR, uma vez que nas análises de expressão gênica global as amostras controle compuseram um *pool* que foi co-hibridado com as amostras tumorais.

Foi detectada correlação positiva estatisticamente significativa para os genes *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4* e *SLC27A4*. Por outro lado, os genes *SLC25A16* e *SLC25A25* não tiveram correlação significativa entre os valores obtidos pelas diferentes técnicas.

Tabela 4 - Correlação entre valores de expressão relativa dos genes *SLCs* avaliados por *microarray* e RT-qPCR em tempo real em 28 amostras de carcinoma de pênis (CaPe).

	Correlação de Pearson		Correlação de Spearman	
	r	P	r	P
SLC1A3	0,520*	0.005	0,478*	0.010
SLC8A1	0,709*	<0,001	0,677*	<0,001
SLC25A4	0,721*	<0,001	0,679*	<0,001
SLC25A16	0.079	0.691	0.032	0.873
SLC25A25	0.051	0.797	-0.051	0.795
SLC27A4	0,642*	<0,001	0,651*	<0,001

r = coeficiente de correlação; * correlação significativamente positiva ($P < 0,05$).

4.1.4 Expressão gênica diferencial dos genes da família SLC entre amostras de CaPe e controles

Foi avaliada a expressão dos genes alvo detectada por RT-qPCR entre tecidos normais de pênis (N - grupo controle) e as amostras de CaPe do grupo de validação técnica (mesmas amostras analisadas por *microarray* de expressão) e comparamos com um grupo independente de tumores (grupo de validação biológica). As Figuras 6 e 7 ilustram os resultados para os genes *SLCA1*, *SLCA81* e *SLC25A4* e para os genes *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4*, respectivamente.

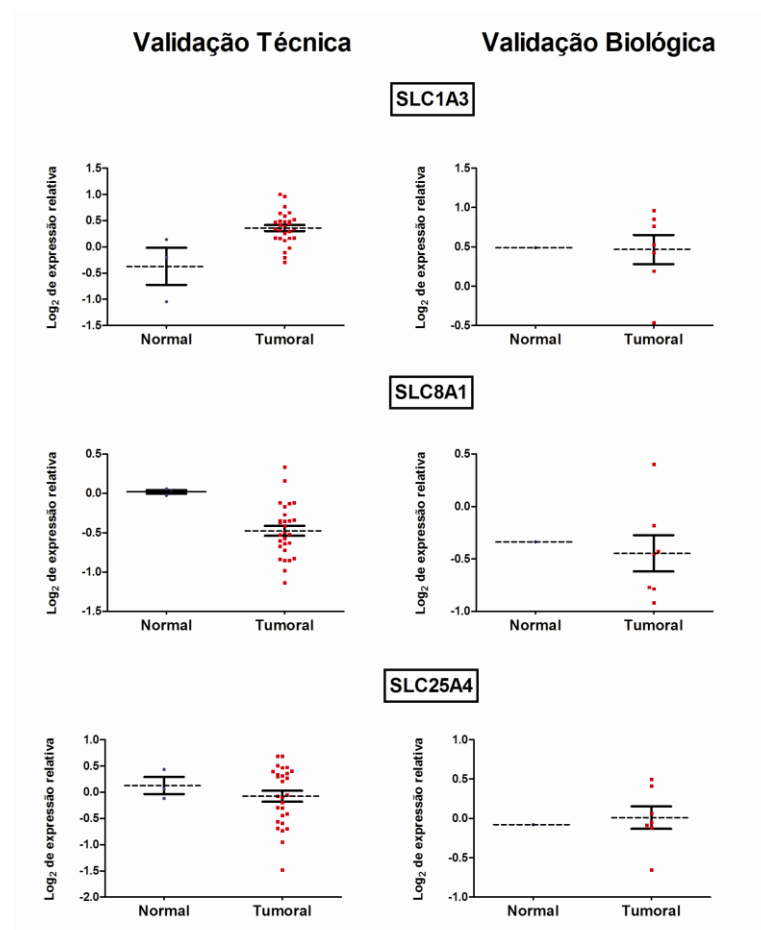


Figura 6 - Expressão relativa de *SLC1A3*, *SLC8A1* e *SLC25A4* avaliados por RT-qPCR em amostras não-tumorais (N) e tumorais de pênis (CaPe). A coluna esquerda mostra a comparação para o grupo de validação técnica (28 CaPe previamente avaliadas pelo *microarray* + três amostras N, que foram co-hibridadas em um pool de normais no *microarray*) e biológica (sete novas amostras independentes de CaPe e uma nova amostra N). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa ($\log_2$), com a linha tracejada ilustrando a mediana entre as barras dos intervalos interquartis.

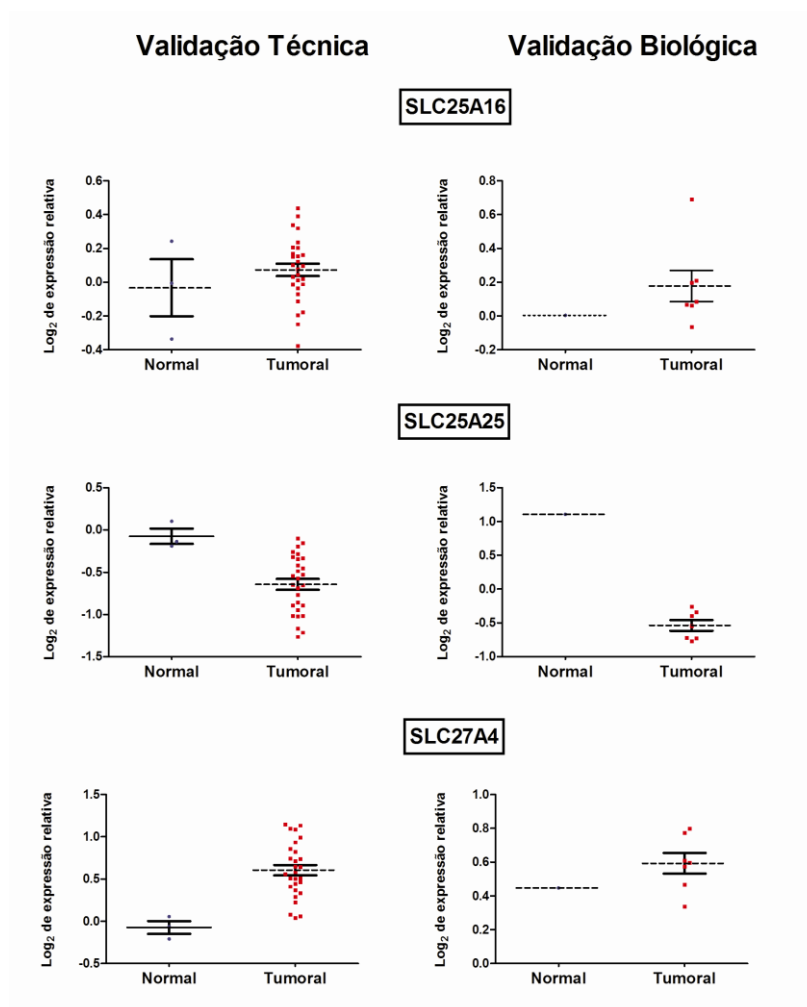


Figura 7 - Expressão relativa de *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4* detectada por RT-qPCR em amostras não-tumorais (N) e tumorais de pênis (CaPe). A coluna esquerda mostra a comparação para o grupo de validação técnica (28 CaPe previamente avaliadas pelo *microarray* + três amostras N, que foram co-hibridadas em um pool de normais no *microarray*) e biológica (sete novas amostras independentes de CaPe e uma nova amostra N). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa ($\log_2$), com a linha tracejada ilustrando a mediana entre as barras dos intervalos interquartis.

Considerando que o grupo de validação biológica se comportou de maneira semelhante ao grupo de validação técnica e devido ao número pequeno de amostras do grupo biológico, as amostras tumorais foram reunidas num único grupo para fins de comparação com o grupo de amostras normais (N).

Na Figura 8, foi observada diminuição de expressão significativa nos CaPe em relação aos tecidos normais para os genes *SLC8A1* ($P=0,0171$; Figura 8B) e *SLC25A25* ($P=0,0021$; Figura 8E). Para o gene *SLC8A1*, 26 de 35 tumores (74%) apresentaram diminuição de expressão quando comparados ao grupo N, sendo que a mediana de expressão relativa foi de 0,320. Para *SLC25A25*, 29 de 35 CaPe (83%) mostraram expressão diminuída deste gene, com mediana de 0,266. As seis amostras restantes de CaPe mostraram expressão relativa abaixo de 1,0 em relação ao normal, sendo que quatro delas estavam próximas do valor de 0,5.

Por outro lado, o gene *SLC27A4* apresentou expressão significativamente aumentada nos CaPe ($P=0,0068$, Figura 8F), com mediana de expressão relativa de 3,87. Do total de CaPe ($N=35$), 25 (71%) mostraram níveis de expressão acima dos tecidos normais, sendo que cinco amostras apresentaram expressão acima de 2,0, porém abaixo do limite máximo exibido pelas amostras normais, e nenhuma delas apresentou expressão abaixo de 1,0. *SLC1A3* mostrou um discreto aumento nos tumores, porém sem significância estatística ($P=0,0747$; Figura 8A).

Os genes *SLC25A4* e *SLC25A16* não se mostraram diferencialmente expressos entre os tecidos avaliados (Figura 8C e D).

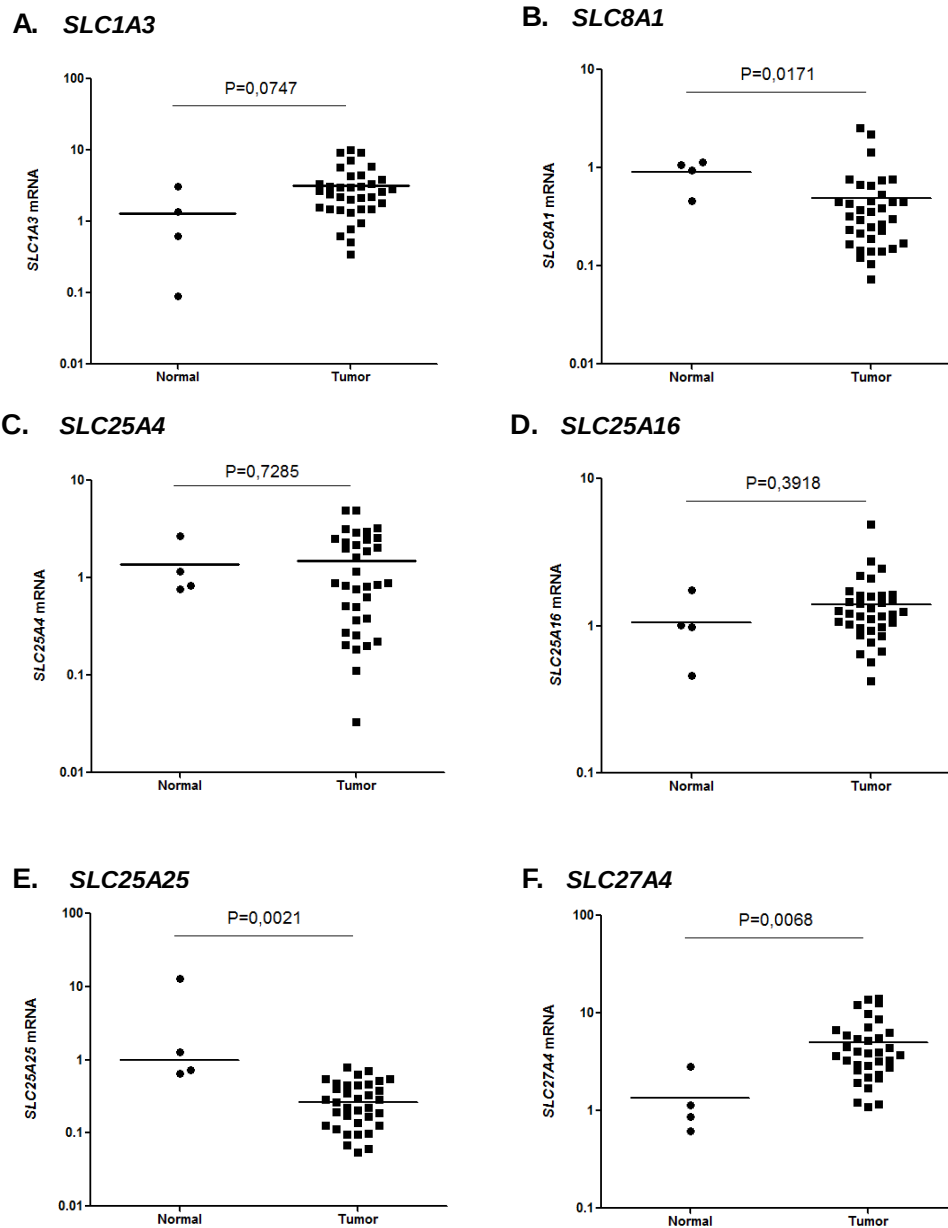


Figura 8 - Expressão relativa dos genes *SLC1A1*, *SLC8A1*, *SLC25A16*, *SLC25A4*, *SLC25A25* e *SLC27A4* avaliados por RT-qPCR em tumores de pênis (N=35) e tecidos normais (N=4). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa dos tumores em relação à mediana dos normais. A mediana de expressão de cada gene em cada grupo está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney. Os níveis de expressão relativa de cada gene estão apresentados em escala logarítmica.

4.2 EXPRESSÃO DOS miRNAs POTENCIALMENTE REGULADORES DOS GENES SLCs

4.2.1 Escolha das referências para normalização de RT-qPCR dos miRNAs

A partir de revisão da literatura foram selecionados como possíveis referências em CaPe dois genes codificantes de miRNAs (*LET-7a* e *MIR-16*) em conjunto com quatro genes codificadores de pequenos RNAs nucleolares (*RNU44*, *RNU48*, *RNU6b* e *RNU47*), que demonstraram expressão pouco variável em outros tecidos tumorais. O pré-teste para análise de expressão de miRNAs incluiu quatro controles e 10 amostras de CaPe (Tabela 5).

Tabela 5 - Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos seis transcritos (*MIR-16*, *LET-7a*, *RNU6b*, *RNU44*, *RNU47* e *RNU48*) candidatos a normalizadores testados.

Amostras	<i>Let-7a</i>	<i>MIR-16</i>	<i>RNU44</i>	<i>RNU48</i>	<i>RNU6b</i>	<i>RNU47</i>	FN
1391	1.214	1.087	2.928	2.042	1.659	2.329	5.652
1392	8.754	1.753	1.625	1.310	1.133	0.812	3.781
1394	2.114	0.959	0.763	0.642	0.993	0.693	2.164
1409	2.235	0.376	2.158	0.235	0.451	0.171	1.218
PA10T	0.356	0.167	1.223	0.248	0.164	0.167	0.869
PA11T	0.753	0.107	0.339	0.207	0.113	0.250	0.596
PA12T	0.142	0.061	0.616	0.253	0.088	0.342	0.684
PA13T	1.110	0.154	1.000	0.259	0.262	0.198	0.854
PA19T	0.563	0.144	0.457	0.291	0.075	0.342	0.815
PA1T	0.245	0.122	0.264	0.291	0.132	0.206	0.601
PA20T	0.089	0.154	0.454	0.079	0.001	0.068	0.399
PA5T	0.054	0.293	0.707	0.180	0.035	0.253	0.893
PA6T	0.262	0.039	0.423	0.078	0.026	0.112	0.314
PA7T	0.304	0.304	0.707	0.253	0.137	0.358	1.070
M < 1.5	1.614	1.367	1.437	1.123	1.933	1.255	

RNU48 apresenta expressão mais estável (verde) individualmente e *RNU6b* é o mais variável (vermelho) nas 14 amostras de tecido peniano testadas (4 amostras não-tumorais e 10 tumorais). O fator de normalização (FN) representa a média geométrica da expressão relativa dos seis candidatos avaliados.

O teste demonstrou que *LET-7a* e *RNU6b* apresentavam expressão muito variável para o uso como calibradores de expressão dos miRNAs ($M=1,933$ e $1,614$ respectivamente). Após a remoção em série dos transcritos menos estáveis, o programa geNorm indicou o uso de *RNU48* + *RNU47* como o melhor par de transcritos, seguidos da inclusão de *MIR-16*, *RNU44*, *LET-7a* e *RNU6b*, respectivamente (Figura 9).

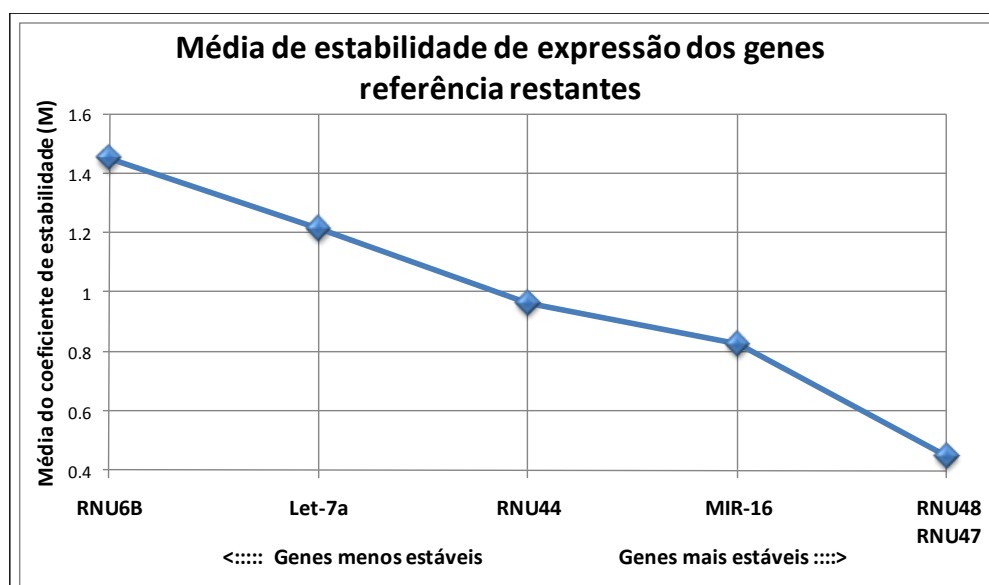


Figura 9 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos transcritos (*MIR-16*, *LET-7a*, *RNU6b*, *RNU44*, *RNU47* e *RNU48*) candidatos a normalizadores testados. Cálculo para a determinação dos melhores genes referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável, indicando *RNU47* + *RNU48* como o melhor par de genes ($M=0,42$).

O conjunto de genes referência apropriado estimado para a normalização dos miRNAs alvos foi *RNU48* + *RNU47* + *MIR-16* + *RNU44*, pois a inclusão de *LET-7a* e *RNU6b* aumentou a variação entre a relação dos fatores de normalização em comparação com o uso de um grupo menor de genes referência (Figura 10).

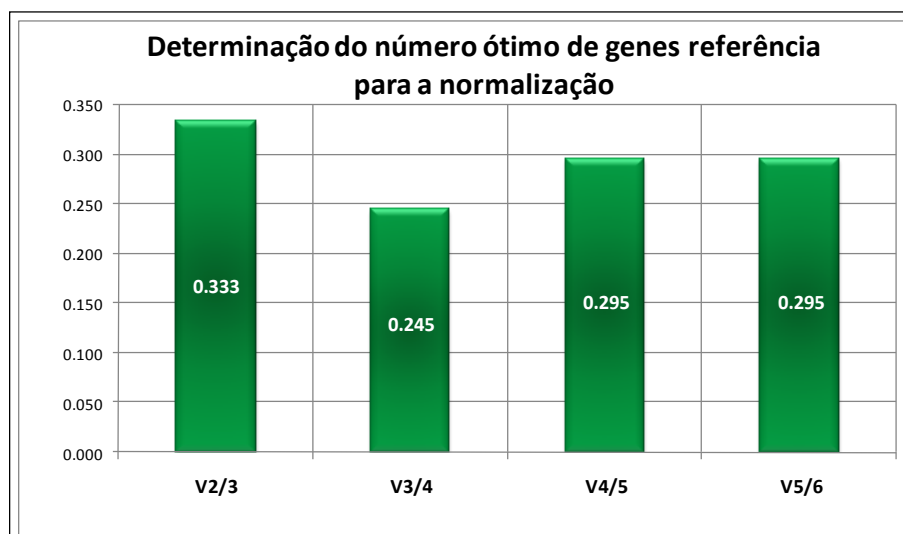


Figura 10 - Determinação do número adequado dos transcritos (MIR-16, LET-7a, RNU6b, RNU44, RNU47 e RNU48) candidatos a normalizadores testados. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que com o uso dos quatro transcritos mais estáveis (3/4) se obtém a normalização de maior fidelidade (*RNU48* + *RNU47* + *MIR-16* + *RNU44*). A análise estima o número de transcritos de referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização.

Assim, as demais amostras foram avaliadas incluindo apenas as referências *RNU48*, *RNU47*, *MIR-16* e *RNU44*. Sendo que *RNU6b* e *LET-7a* não se mostraram referências estáveis em CaPe.

4.2.2 Confirmação da estabilidade dos transcritos de referência para normalização da RT-qPCR para análise de miRNAs

Do total de 34 amostras de CaPe e 4 controles, apenas 21 tumores apresentaram resultados para todos os miRNAs e referências avaliados, e por isso foram incluídos nesta nova análise. Pela nova análise com o programa geNorm, *RNU48* foi considerado como o mais estável ($M=1,056$) e *MIR16* como o menos estável ($M=1,523$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão relativa, fator de normalização (FN) e coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos quatro transcritos de referência selecionados (MIR-16, RNU44, RNU47 e RNU48).

Amostras	<i>RNU44</i>	<i>miR-16</i>	<i>RNU48</i>	<i>RNU47</i>	FN
1391	5.709	1.458	3.378	3.638	15.380
1392	0.355	1.038	0.807	0.616	2.092
1394	0.940	1.147	0.996	0.579	3.040
1409	0.131	0.274	0.769	0.131	0.881
PA10T	1.187	0.081	0.197	0.215	1.376
PA11T	0.343	0.115	0.223	0.253	1.001
PA12T	0.812	0.077	0.264	0.284	1.467
PA13T	0.663	0.141	0.190	0.173	1.042
PA19T	0.897	0.149	0.385	0.297	1.746
PA1T	0.152	0.160	0.270	0.141	0.669
PA20T	0.261	0.003	0.052	0.051	0.330
PA5T	0.506	0.159	0.184	0.206	0.998
PA6T	0.171	0.027	0.097	0.069	0.390
PA7T	0.462	0.155	0.218	0.292	1.151
PE15T	2.061	0.271	1.127	1.135	5.151
PE16T	0.069	0.055	0.035	0.010	0.108
PE17T	0.898	0.159	0.340	0.336	1.746
PE18T	1.257	0.379	0.780	0.272	2.400
PE24T	0.674	0.091	0.246	0.189	1.176
PE26T	0.997	0.210	0.263	0.288	1.576
PE2T	0.103	0.013	0.039	0.055	0.225
PE4T	0.206	0.080	0.142	0.098	0.530
PE6T	0.075	0.205	0.037	0.013	0.123
PE8T	0.075	0.010	0.016	0.024	0.114
PET19T	4.486	0.448	0.547	0.670	4.401
M < 1.5	1.310	1.523	1.056	1.095	

RNU48 apresenta expressão mais estável (verde) individualmente e *MIR-16* é o mais variável (vermelho) nas 25 amostras analisadas (21 CaPe e 4 controles). O fator de normalização (FN) representa a média geométrica da expressão relativa dos três genes avaliados.

Após a exclusão progressiva das referências de maior variabilidade de expressão, com um novo cálculo de estabilidade de expressão, o programa indicou

novamente *RNU47* e *RNU48* como os mais estáveis, com a adição de *RNU44* como o grupo ideal de normalizadores a serem utilizados (Figuras 11 e 12, respectivamente).

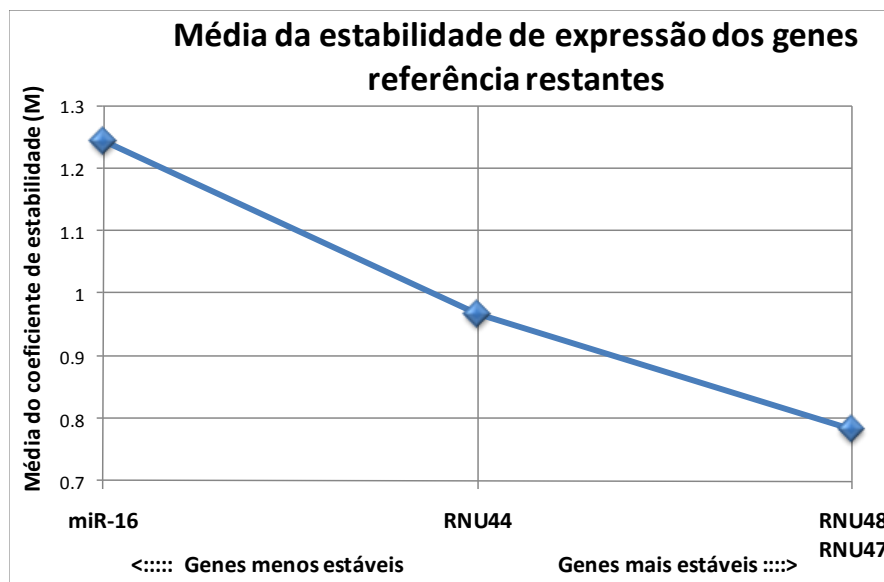


Figura 11 - Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M) dos quatro transcritos de referência selecionados (MIR-16, RNU44, RNU47 e RNU48). Cálculo para a determinação dos melhores genes referência após a exclusão progressiva dos genes de expressão menos estável, indicando *RNU47* + *RNU48* como o melhor par (M=0,79).

Determinação do número ótimo de genes referência

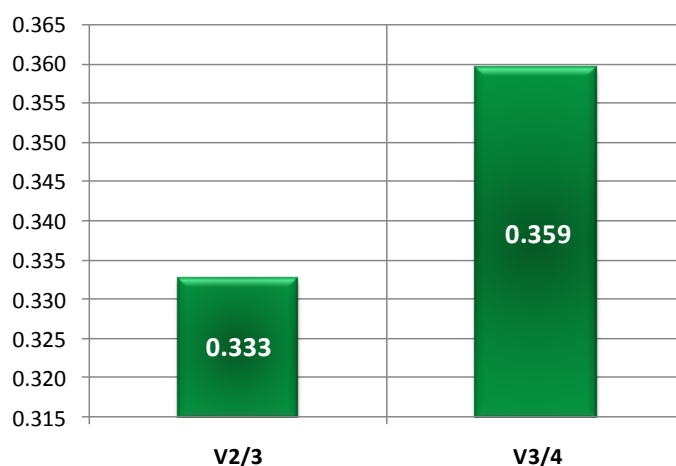


Figura 12 - Determinação do número adequado de transcritos de referência. Estimativa para o uso do número ideal de genes para a normalização, demonstrando que o uso dos três transcritos (2/3) se obtém a normalização de maior fidelidade (*RNU48* + *RNU47* + *RNU44*). A análise estima o número de transcritos referência mais apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização.

4.2.3 Expressão diferencial dos miRNAs entre amostras de CaPe e controles

Os resultados de expressão relativa dos miRNAs descritos caso a caso estão apresentados na Tabela do Apêndice 1. É importante ressaltar que dos 35 CaPe só foi possível avaliar os níveis de miRNAs em 21 amostras cujos RNAs foram extraídos pelo método do Trizol. Os demais casos foram extraídos com kit comercial baseado em separação do mRNA por coluna, o que leva à perda dos miRNAs durante o processo. Infelizmente não foi possível obter tecido tumoral de algumas amostras para re-extração do RNA pelo método do trizol, uma vez que alguns tecidos haviam se esgotado e outros apresentavam quantidade insuficiente de células tumorais.

A comparação entre CaPe e controles mostrou que *miR-23b*, *miR-26b*, *miR-27b* e *miR-133b* estavam significativamente menos expressos nas amostras dos tumores, enquanto *miR-223* se encontrava mais expresso (Figura 13).

Cinco dos seis miRNAs avaliados se mostraram diferencialmente expressos entre tumores e controles (Figura 13). Diminuição de expressão significativa em CaPe foi detectada para *miR-23b* ($P=0,0316$; Figura 13B), *miR-26b* ($P=0,0147$; Figura 13C), *miR-27b* ($P=0,0196$; Figura 13D) e *miR-133 b* ($P=0,0034$; Figura 13E). Em contraste, *miR-223* apresentou-se hiperexpresso nos tumores ($P=0,0085$; Figura 13F). A Tabela 7 apresenta a frequência de casos de CaPe com alteração nos níveis de expressão dos miRNAs e as medianas de expressão relativa dos miRNAs que se mostraram desregulados nos tumores. Foi observado que 95% dos CaPe apresentaram diminuição de *miR-133b*, com expressão pelo menos 40 vezes menor que os tecidos normais. Um único caso (5%) apresentou expressão normal deste miRNA (expressão relativa de 0,87).

Tabela 7 - Frequência de casos de carcinoma de pênis (CaPe) que se mostraram diferencialmente expressos na comparação com tecidos normais e mediana dos valores de expressão relativa nos miRNAs desregulados nos tumores.

		<i>miR-22</i>	<i>miR-23b</i>	<i>miR-26b</i>	<i>miR-27b</i>	<i>miR-133b</i>	<i>miR-223</i>
N ^o	casos						
	diferencialmente						
expressos (%)		8 (25)	12 (57)	16 (76)	16 (76)	20 (95)	15 (71)
Mediana da expressão relativa		0,76	0,49	0,29	0,26	0,03	3,69

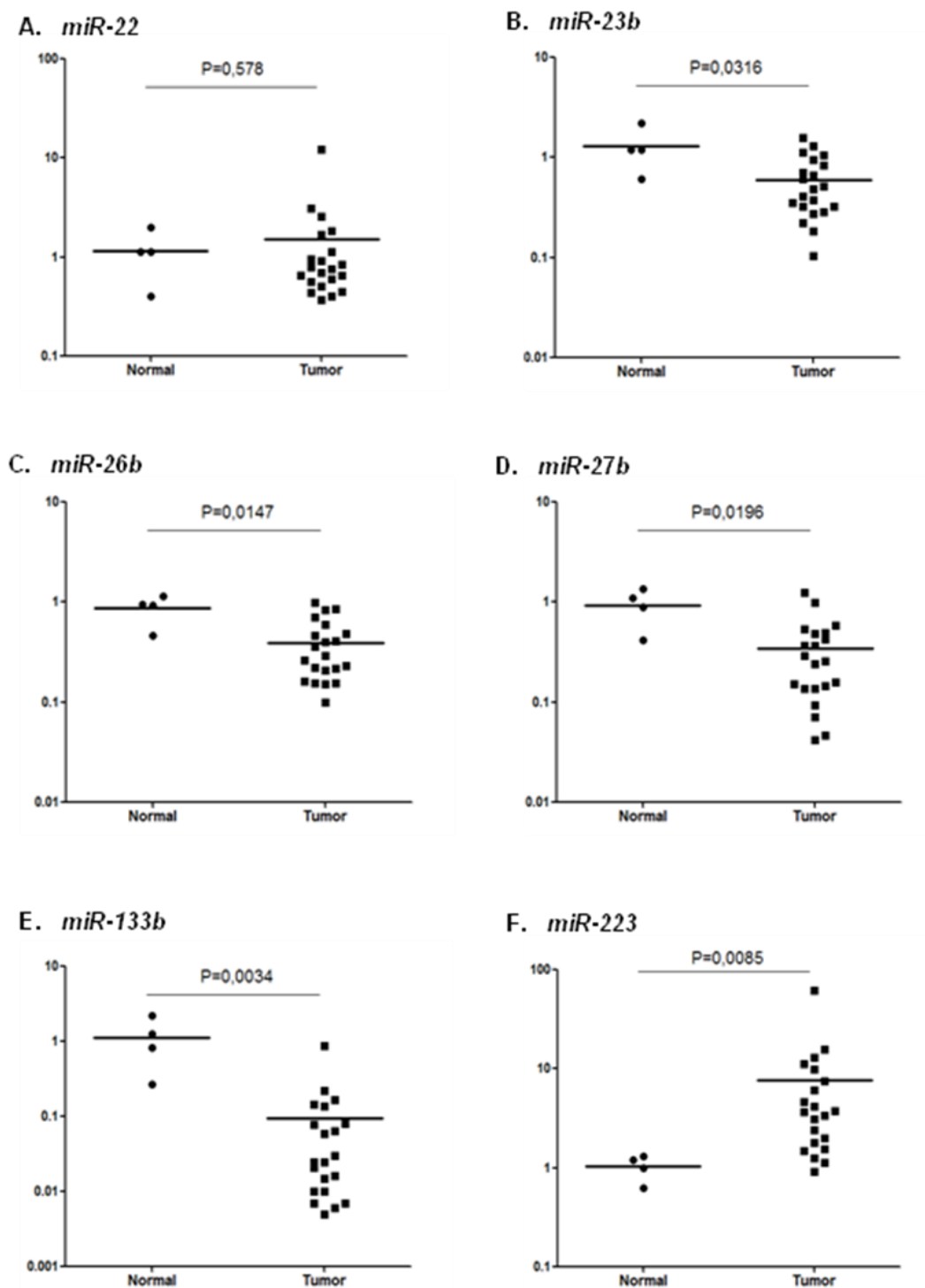


Figura 13 - Expressão relativa de miR-22, miR-23b, miR-26b, mi-27b, miR-133 e miR-223 avaliados por RT-qPCR em tumores de pênis (N=21) e tecidos normais (N=4). O gráfico mostra a distribuição dos valores de expressão relativa dos tumores em relação à mediana dos normais. A mediana de expressão de cada miRNA em cada grupo está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

4.2.4 Correlação entre os níveis de expressão dos miRNAs em amostras de CaPe

Para avaliar se havia correlação entre se os níveis dos miRNAs detectados nos CaPe, foram comparados os níveis de cada par de miRNAs (Figura 14). Com exceção de miR-223, que correlacionou-se significativamente apenas com miR-26b, todos os demais miRNAs se correlacionaram com pelo menos três miRNAs.

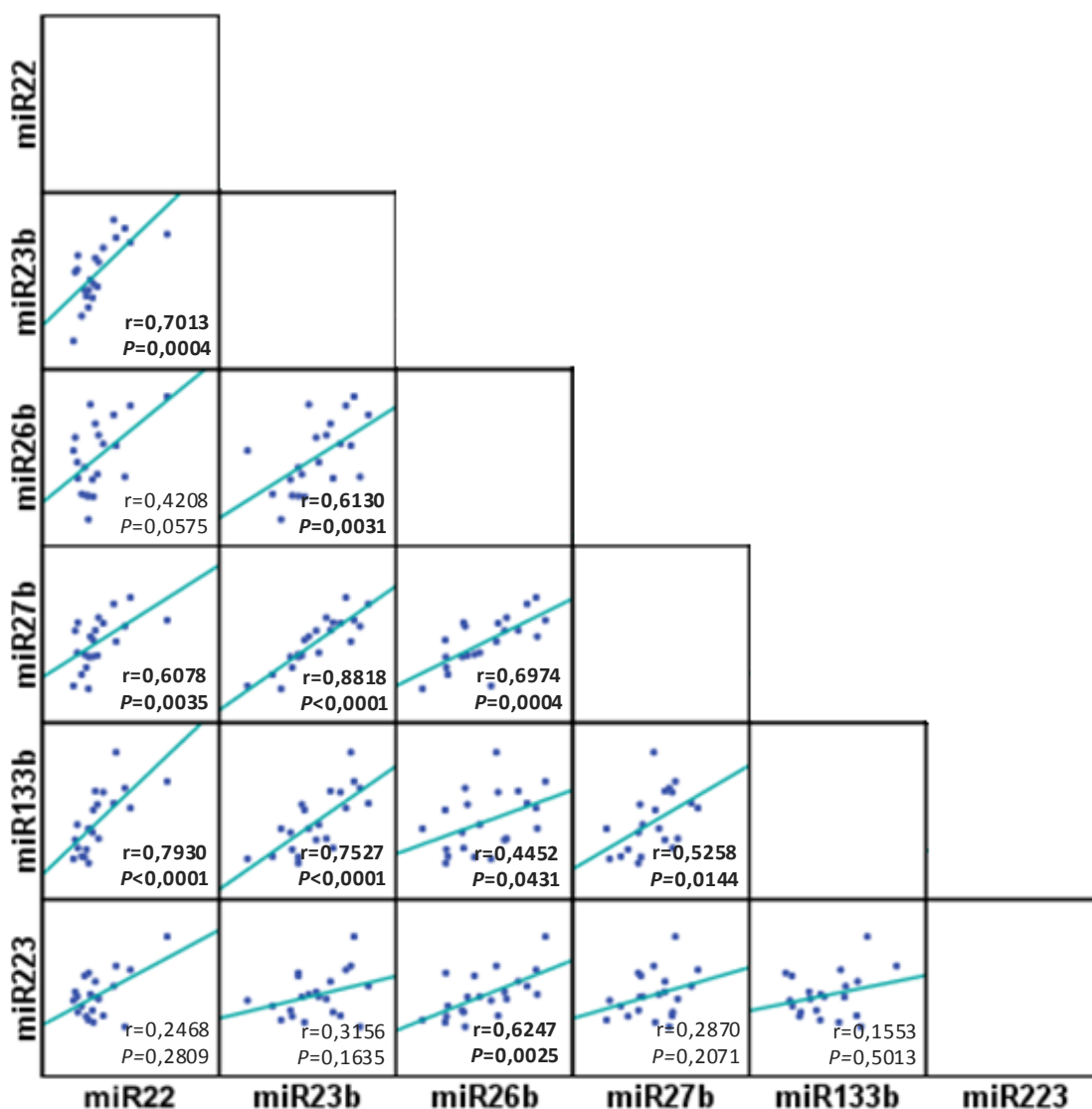


Figura 14 - Correlação entre os níveis de expressão de miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133 e miR-223 avaliados por RT-qPCR em CaPe (N=21). Apresentados na forma de matriz. r = correlação de Spearman.

O maior coeficiente de correlação foi observado entre os níveis de miR-23b e miR-27b ($r=0,8818$, $P<0,0001$), seguido de miR-22 e miR-133b; e miR-23b e miR-133b. Os miR-23b e miR-27b formam um cluster mapeado em 9q22.32. Embora ambos os miRNAs tenham apresentado diminuição significativa de expressão nos CaPe, cinco casos apresentaram ganhos de ambos os miRNAs nesta região detectados por aCGH. Apenas três dos cinco casos puderam ser avaliados quanto aos níveis de miRNA por RT-qPCR, sendo que para miR-23b, dois casos apresentaram níveis normais e um níveis diminuídos (expressão relativa de 0,94 e 1,28; e 0,32, respectivamente). Para miR-27b, dois casos mostraram diminuição de expressão e um expressão normal (expressão relativa de 0,137; 0,428 e 1,428).

4.2.5 Correlação entre valores de expressão relativa dos miRNAs e os genes SLCs por ele regulados

Para avaliar uma possível regulação negativa da expressão dos genes *SLCs* pelos miRNAs foram realizadas análises de correlação entre os pares (Figura 15).

Foi verificada uma correlação negativa significativa entre *SLC8A1* e *miR-223* ($P=0,015$, $r = -0,482$) e *SLC27A4* e *miR-133b* ($P=0,023$, $r = -0,454$). Outras correlações negativas significativas foram observadas, sugerindo outras regulações não previstas *in silico*. Foi detectada correlação negativa significativa do *miR-223* com 4 dos 6 genes *SLCs* analisados. A correlação inversa mais significativa foi observada entre *miR-223* e *SLC25A25* ($P=0,004$; $r = -0,555$).

A única correlação positiva significativa foi observada entre *miR-133b* e *SLC8A1* ($P=0,025$; $r = 0,446$).

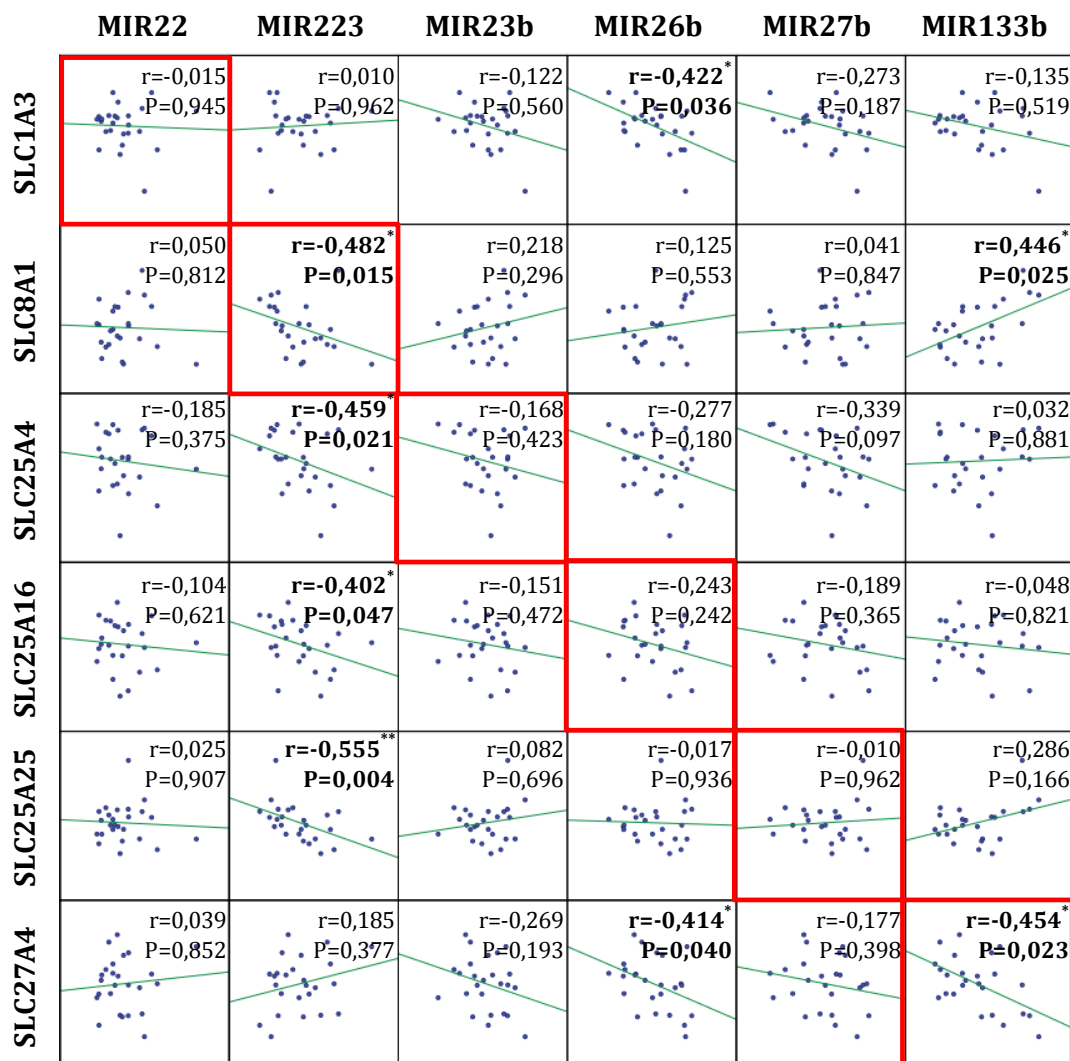


Figura 15 - Gráfico de matriz entre valores obtidos por RT-qPCR para os RNAs mensageiros (vertical) dos genes SLCs e os miRNAs (horizontal). Em caixa vermelha a corresponde ao transcrito SLC e seu respectivo regulador. r = correlação de Spearman; *P<0,05.

4.3 INTEGRAÇÃO DOS RESULTADOS DE RT-qPCR COM OS DADOS PRÉVIOS DE MICROARRAY E CGHarray (aCGH)

No presente estudo foram avaliados seis genes da família de carreadores de solutos (*SLCs*) em amostras tumorais e não-tumorais de pênis, como parte da confirmação de resultados previamente gerados por análise de *microarray* de expressão. Foi verificada também uma possível associação desses transcritos com seus respectivos microRNAs reguladores. Alterações no número de cópias nas regiões codificadoras desses miRNAs haviam sido previamente detectadas por aCGH. A Tabela 8 mostra uma compilação dos resultados do presente estudo e dos estudos prévios.

Tabela 8 - Compilação dos resultados encontrados, relacionando as análises por *microarrays* e RT-qPCR de RNA mensageiro e seus respectivos microRNAs reguladores em carcinomas de pênis (CaPe).

Gene	Análise do RNA mensageiro dos genes			miRNA regulador predito	Análise do miRNA		
	Microarray	RT-qPCR#	Correlação array vs PCR°		RT-qPCR#	Correlação com gene-alvo°	aCGH (tumor)
<i>SLC1A3</i>	aumento	aumento	positiva**	hsa-miR-22	diminuição	negativa	perda (6) [§]
<i>SLC8A1</i>	diminuição	diminuição**	positiva**	hsa-miR-223	aumento**	negativa*	ganho (2) [§]
<i>SLC25A4</i>	diminuição	diminuição	positiva**	hsa-miR-23b	diminuição*	negativa	ganho (5)
<i>SLC25A16</i>	aumento	aumento	positiva	hsa-miR-26b	diminuição*	negativa	perda (3) [§]
<i>SLC25A25</i>	diminuição	diminuição**	negativa	hsa-miR-27b	diminuição*	negativa	ganho (5)
<i>SLC27A4</i>	aumento	aumento**	positiva**	hsa-miR-133b	diminuição**	negativa*	ganho (3)

Legenda: correlação de Spearman; *P<0,05; **P<0,01; # mediana como parâmetro comparativo;

[§] resultados concordantes entre aCGH e expressão dos miRNAs

Considerando todos os resultados obtidos, o gene *SLC1A3* apresentou correlação positiva entre os valores obtidos por *microarray* e RT-qPCR ($P < 0,01$), demonstrando também tendência a aumento de expressão no tumor ($P = 0,057$). Não foi verificada expressão diferencial entre o tumor e o tecido normal para o seu regulador segundo análise *in silico*, o *miR-22*. No entanto, conforme observado na figura 15, *SLC1A3* correlacionou-se significativamente com outro miRNA não predito, *miR-26b* ($P = 0,036$, $r = 0,422$). O *miR-26b* se mostrou significativamente diminuído nos tumores comparados aos controles. Perdas genômicas de *miR-26b* foram detectadas em três casos avaliados por aCGH, sendo que apenas um caso foi avaliado para expressão gênica mostrando resultado concordante (expressão relativa de 0,23 em relação aos controles).

Foi observada diferença significativa para os genes *SLC8A1* e *SLC27A4* em todas as comparações, ambos mostraram forte correlação entre os dados de *microarray* e RT-qPCR ($P < 0,001$), correlação negativa com seus respectivos microRNAs ($P < 0,05$) (*SLC8A1* menos expresso nos tumores, $P < 0,01$ e *miR-223* mais expresso nos tumores, $P < 0,01$; *SLC27A4* mais expresso nos tumores, $P < 0,01$ e *miR-133b* menos expresso nos tumores, $P < 0,01$). No entanto, a comparação de alteração no número de cópias dos miRNAs e os níveis de transcritos mostrou resultado concordante apenas para *miR-223*, sendo que um caso foi avaliado pelas duas técnicas e mostrou ganho e aumento de expressão.

A quantificação do transcrito *SLC25A4* apresentou forte correlação entre as técnicas utilizadas ($P < 0,001$), no entanto, este gene não estava diferencialmente expresso entre os tecidos normais e tumorais pela técnica de RT-qPCR. O seu miRNA regulador predito, *miR-23*, mostrou-se menos expresso nas amostras de

CaPe ($P<0,05$). Novamente, detectou-se uma correlação negativa significativa entre outro miRNA não predito, miR-223 e *SLC25A4* ($P=0,02$, $r=-0,459$, Figura 15). Sendo que, níveis significativamente mais altos de miR-223 foram detectados nos tumores (Figura 13F).

Os genes *SLC25A16* e *SLC25A25* não mostraram correlação positiva significativa entre os níveis detectados pelas técnicas de array e RT-qPCR. Apesar disso, *SLC25A25* apresentou-se significativamente menos expresso no tecido tumoral ($P<0,001$) pela técnica de RT-qPCR. Não foi observada correlação com seu miRNA predito (miR-27b, que também estava diminuído nos tumores), porém uma correlação negativa significativa foi observada com miR-223, que se mostrou aumentado em 70% dos tumores (Figura 13F). Interessantemente, ganho de miR-223 foi observado em dois casos por aCGH, sendo que apenas um deles foi avaliado por RT-qPCR, que mostrou aumento de expressão (relativa de 9,78) em relação aos controles.

Não houve diferença significativa nos níveis de expressão de *SLC25A16* entre as amostras normais e tumorais. Entretanto, seu microRNA regulador (*miR-26b*) foi menos expresso nos tumores ($P<0,05$).

4.4 EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES SLCs E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Para avaliar se os genes *SLCs* poderiam estar associados com características de pior prognóstico ou outra característica clínica, como infecção pelo HPV, os dados foram comparados a todos os parâmetros clínicos e histopatológicos disponíveis.

As figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21 mostram os níveis de expressão dos genes *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*, *SLC25A16*, *SLC25A25* e *SLC27A4* de acordo com tamanho do tumor (T), envolvimento de linfonodos (N), estadio patológico, grau, invasão perineural, metástase linfonodal, recidiva e infecção pelo HPV.

Não foi observada qualquer associação entre as variáveis avaliadas e os níveis de expressão dos genes *SLCs*, com exceção do gene *SLC25A16*, que mostrou níveis mais altos do transcrito nos tumores HPV positivos. Especificamente para este gene foi comparado também os níveis de expressão nos tumores HPV positivos com os tecidos normais, porém nenhuma diferença foi observada (dados não mostrados).

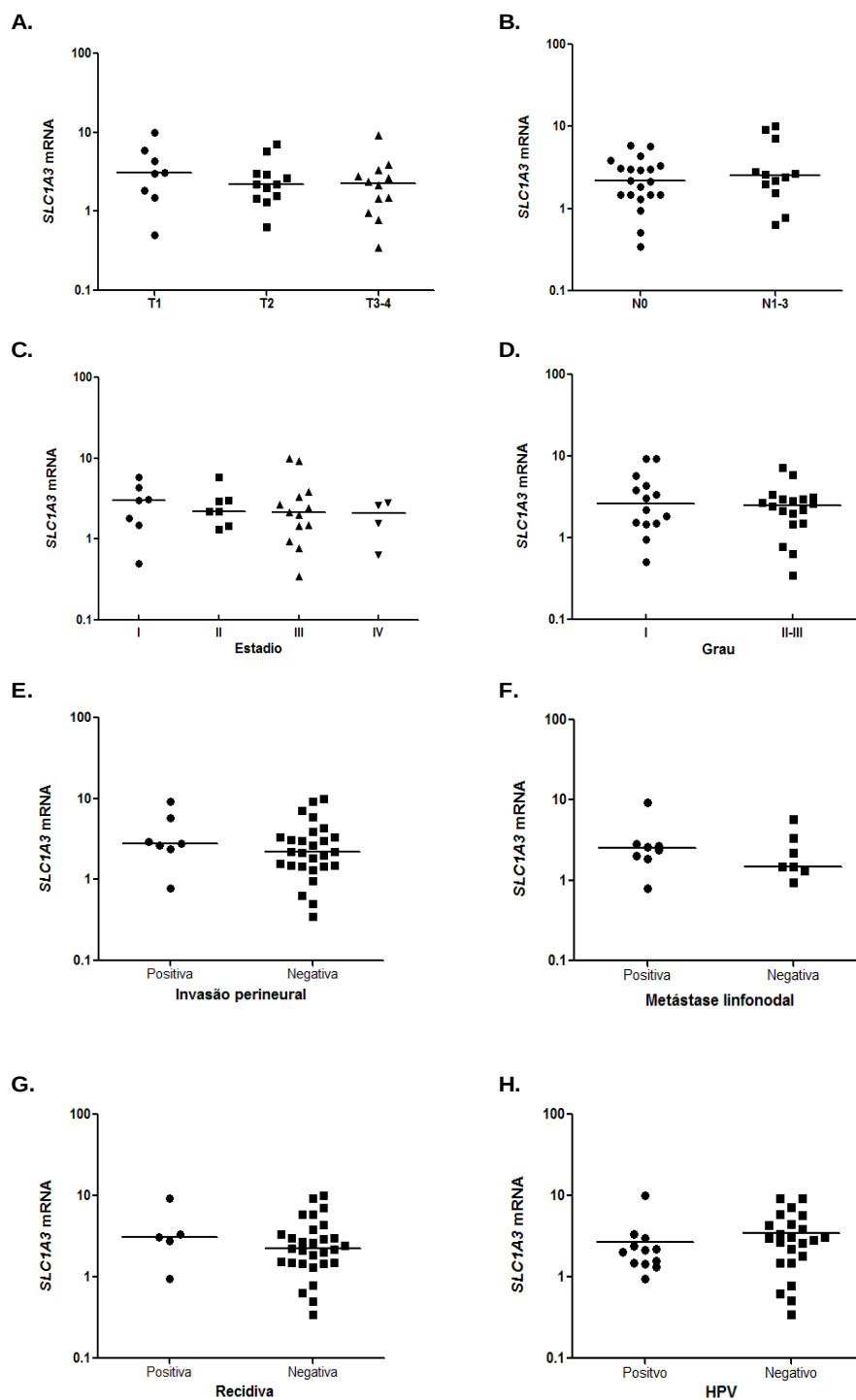


Figura 16 - Níveis dos transcritos de *SLC1A3*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

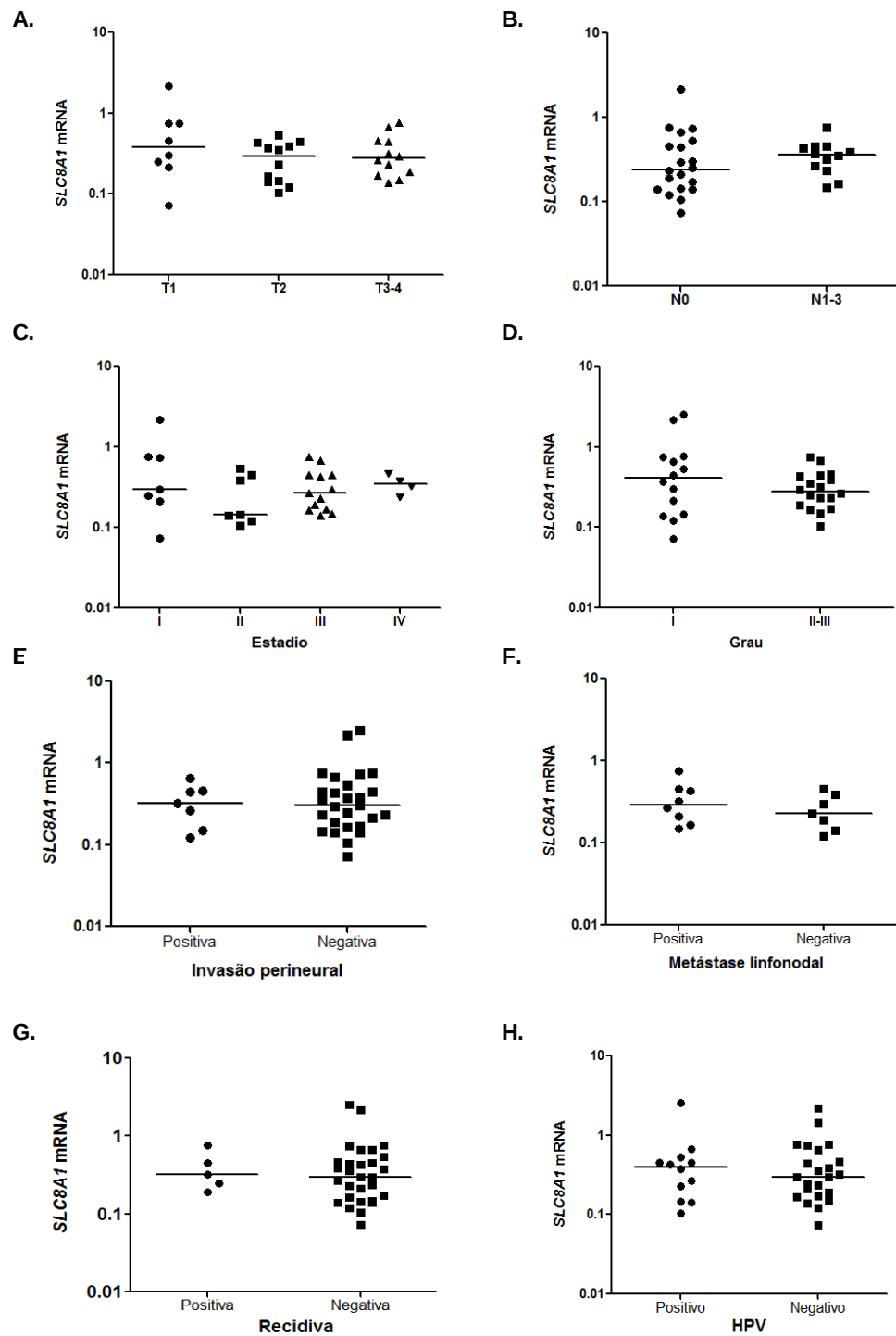


Figura 17 - Níveis dos transcritos de *SLC8A1*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

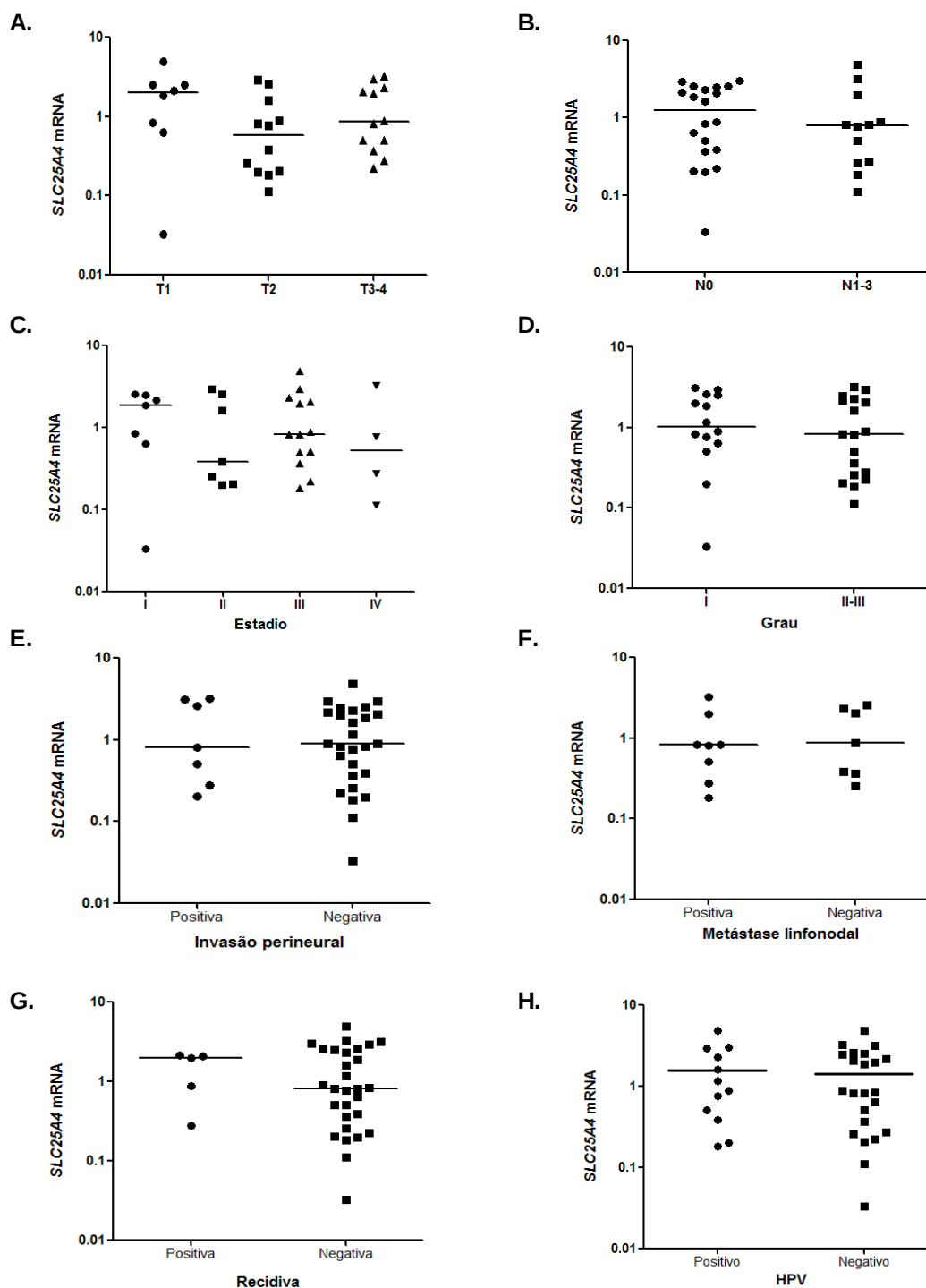


Figura 18 - Níveis dos transcritos de *SLC25A4*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadios patológicos; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

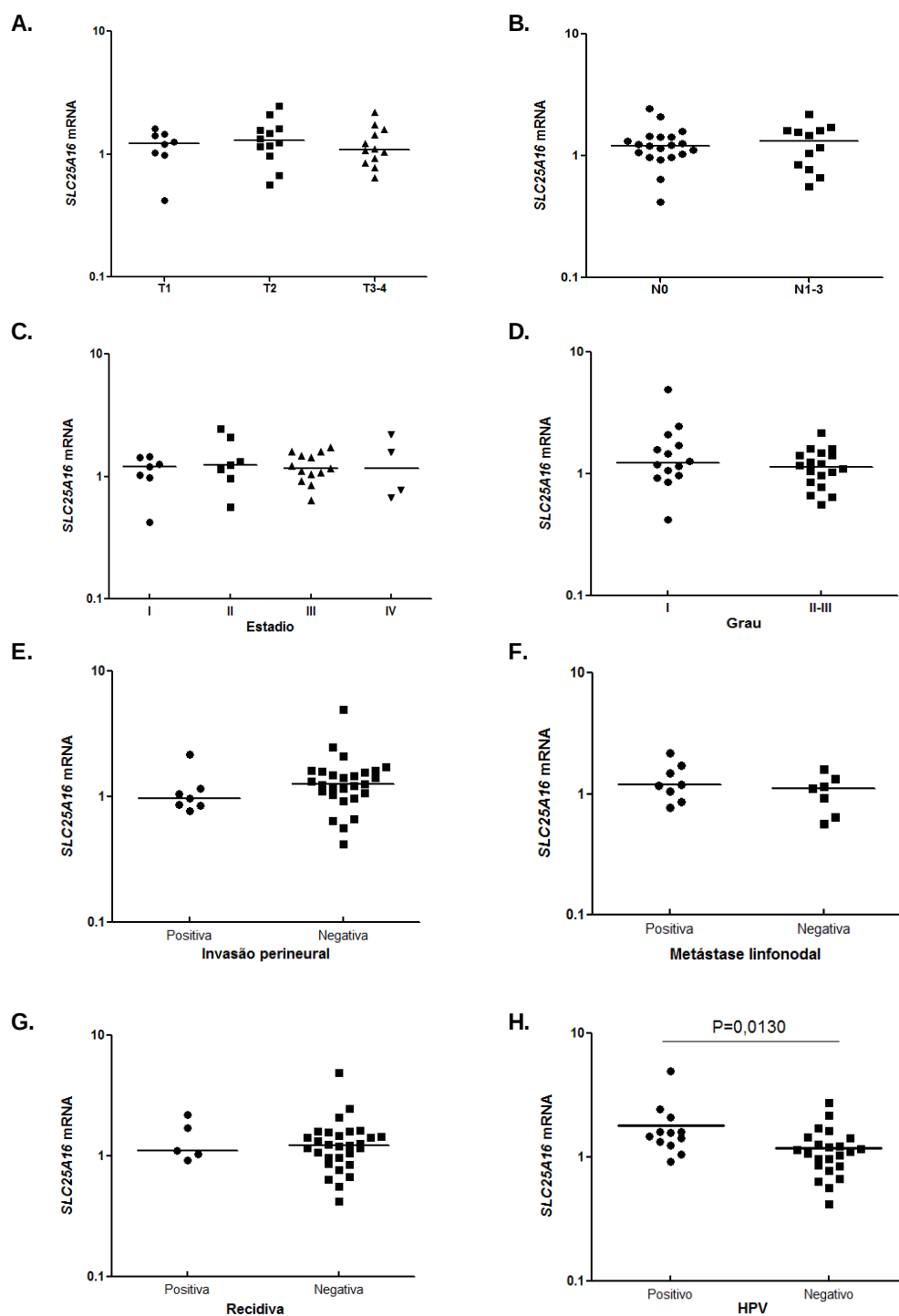


Figura 19 - Níveis dos transcritos de *SLC25A16*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

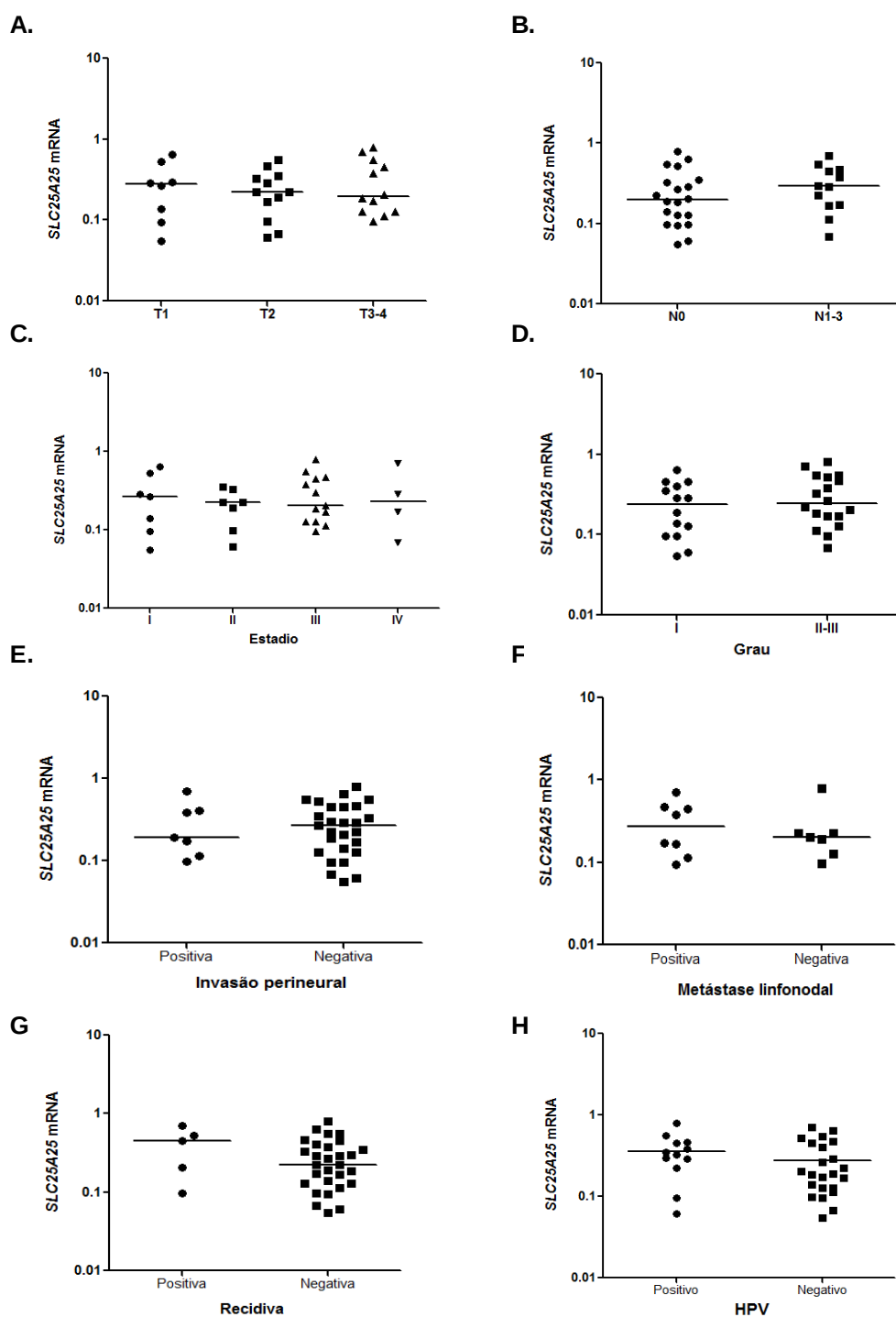


Figura 20 - Níveis dos transcritos de *SLC25A25*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadiopatológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

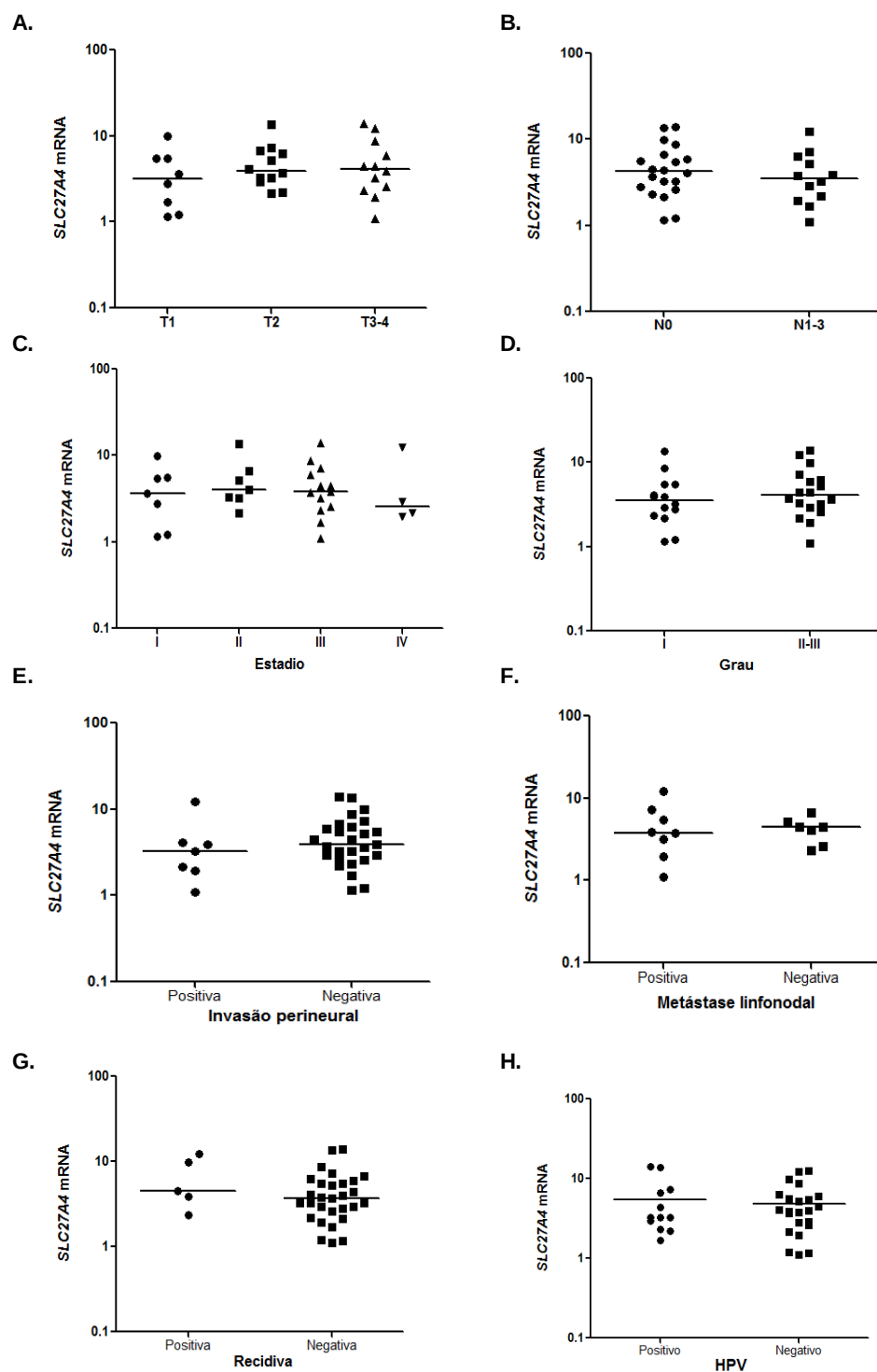


Figura 21 - Níveis dos transcritos de *SLC27A4*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estágio patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

4.5 EXPRESSÃO RELATIVA DOS miRNAs E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Para verificar se havia associação entre os níveis dos miRNAs e características de pior prognóstico ou infecção pelo HPV, os dados foram comparados aos mesmos parâmetros clínicos e histopatológicos avaliados para os genes *SLCs*.

As Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27 ilustram os níveis de expressão de *miR-22*, *miR-23b*, *miR-26b*, *miR-27b*, *133b* e *miR223*, respectivamente, de acordo com as variáveis.

Dentre todas as análises, detectou-se associação significativa entre menores níveis de *miR-22*, *miR-23b* e *miR-27b* e invasão perineural ($P=0,0391$; $P=0,0391$; $P=0,0323$; respectivamente; Figuras 22E, 23E, 25E). Além disso, níveis mais baixos de *miR-133b* foram detectados nos tumores com graus histológicos II e III, embora estatisticamente não significantes ($P=0,0524$, Figura 26D).

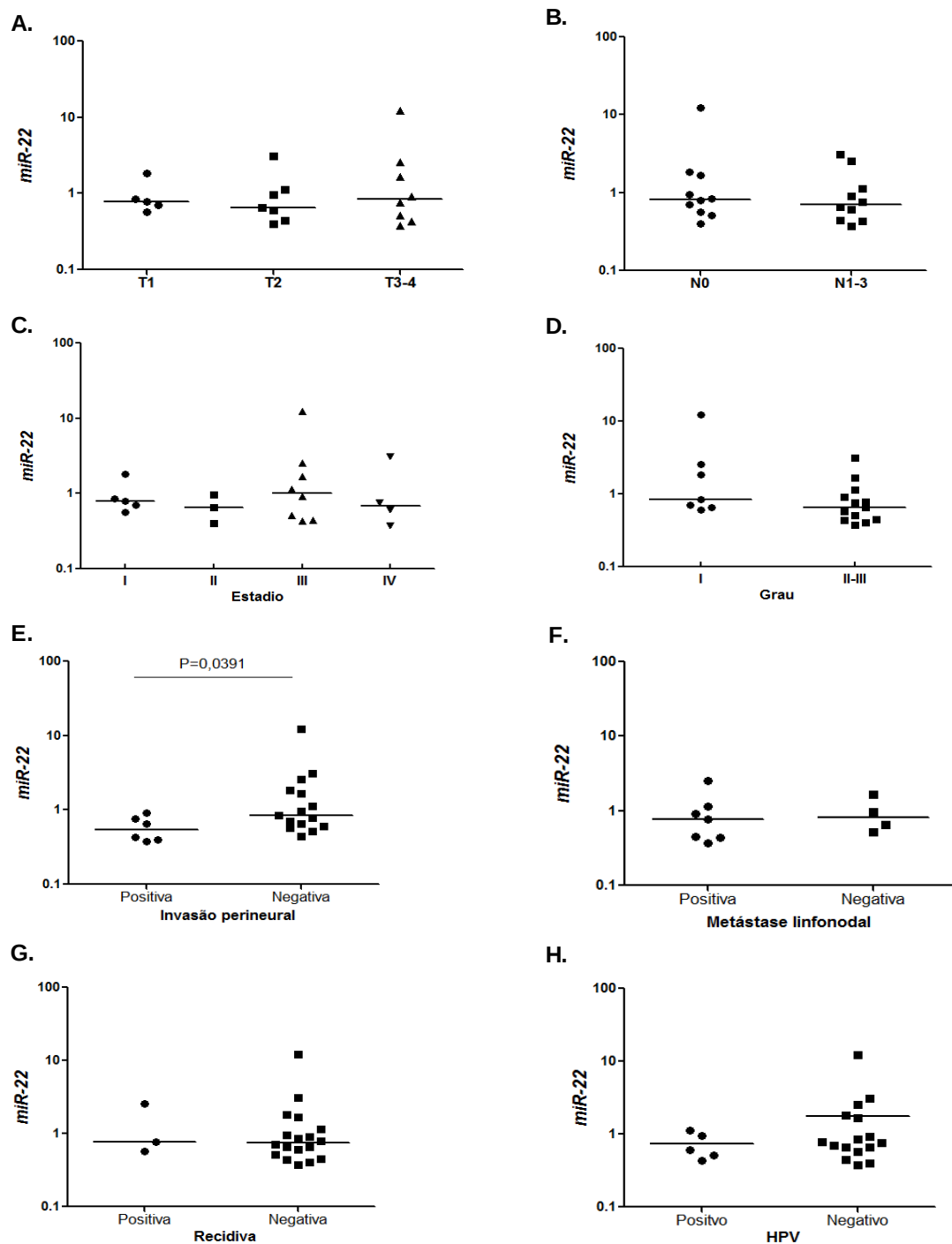


Figura 22 - Níveis dos transcritos de *miR-22*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

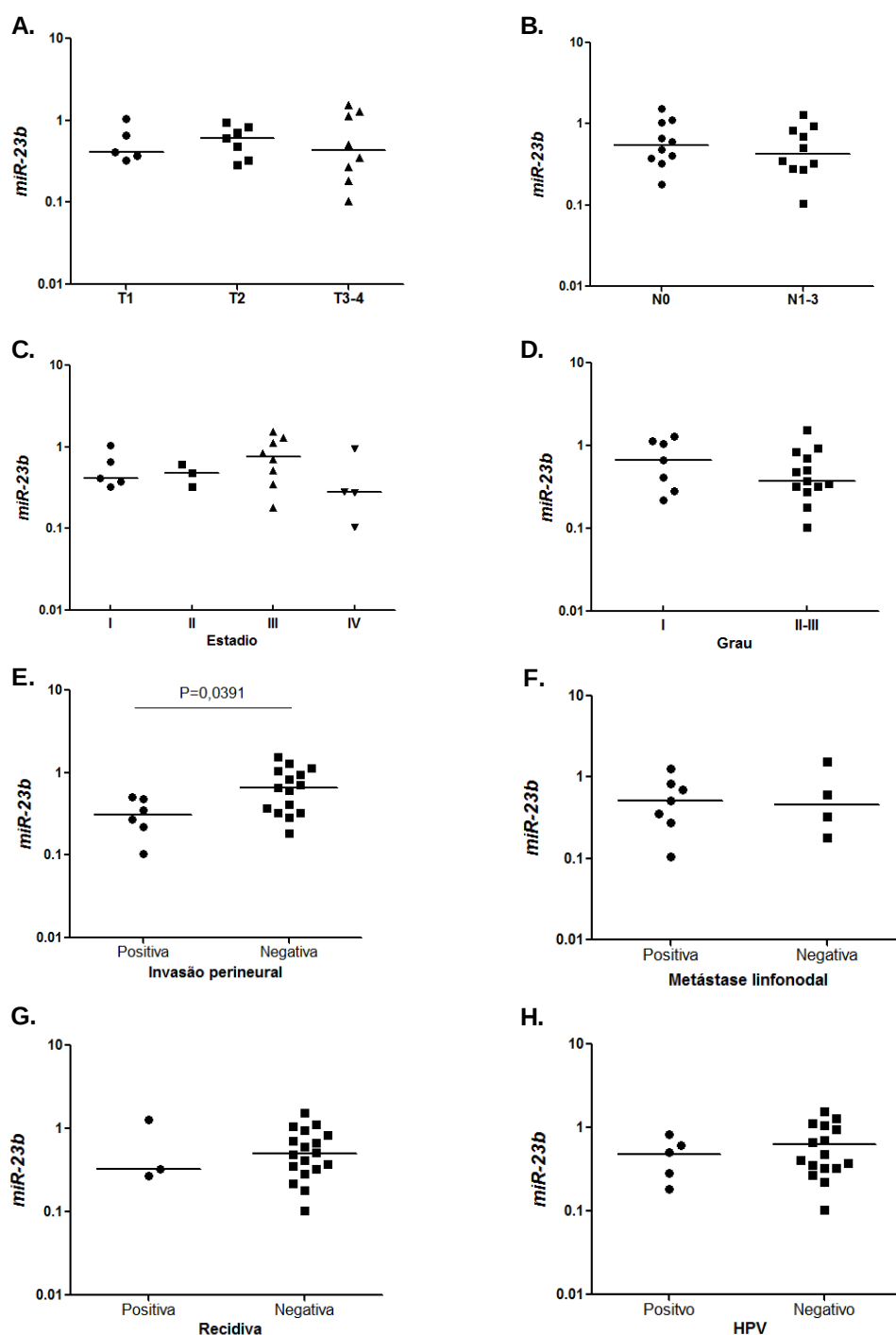


Figura 23 - Níveis dos transcritos de *miR-23b*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

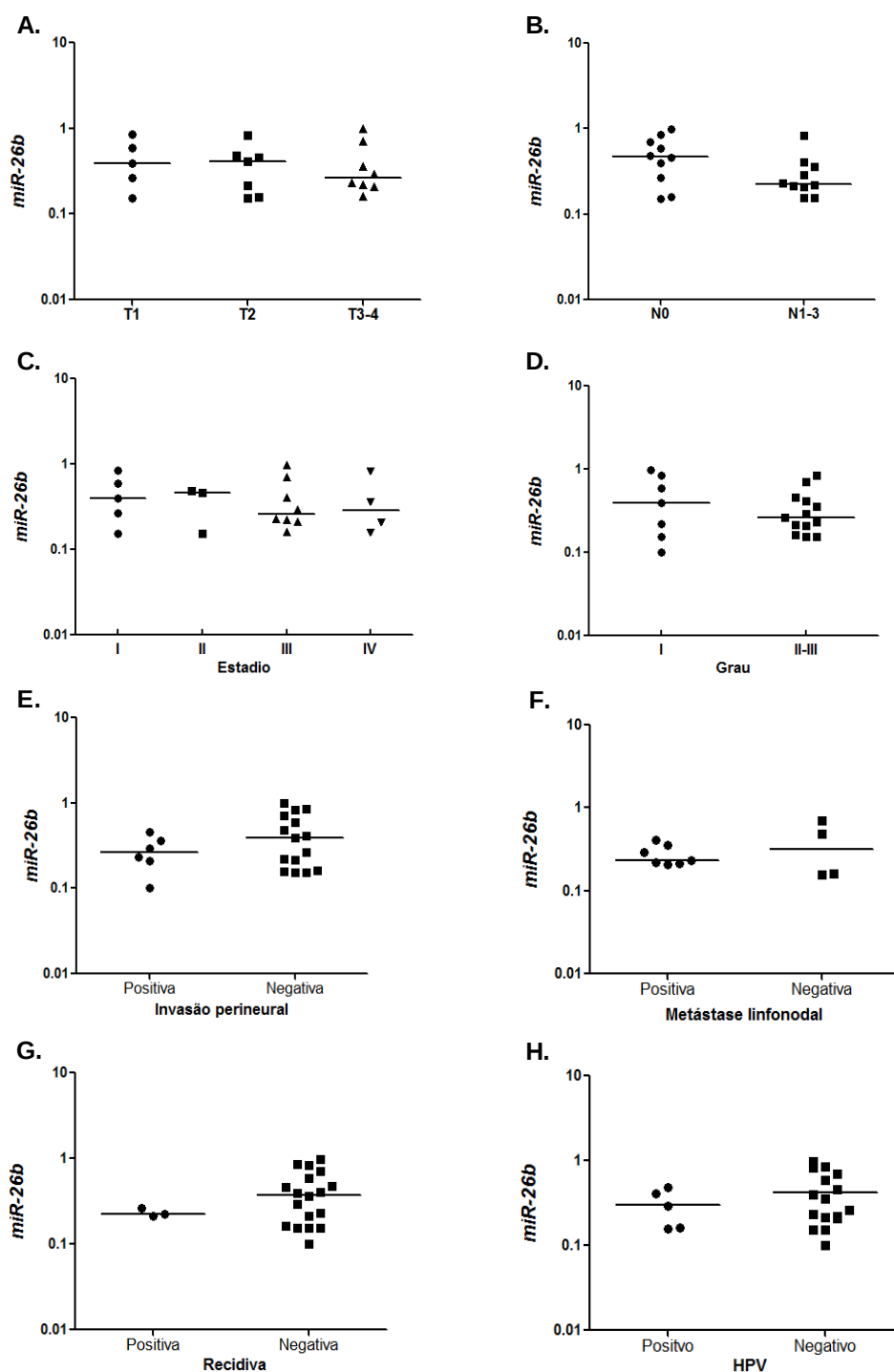


Figura 24 - Níveis dos transcritos de *miR-26b*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

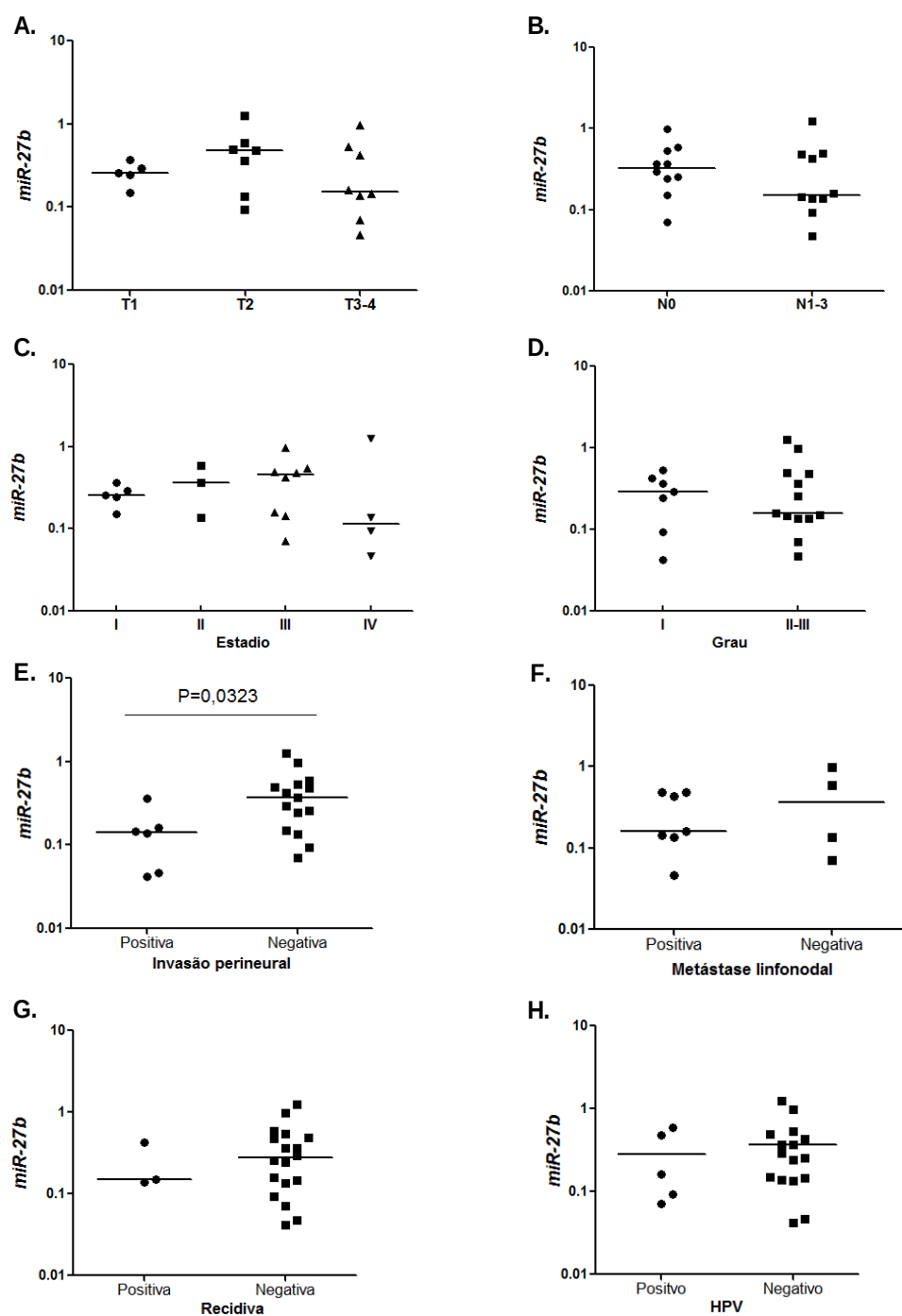


Figura 25 - Níveis dos transcritos de *miR-27b*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadió patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

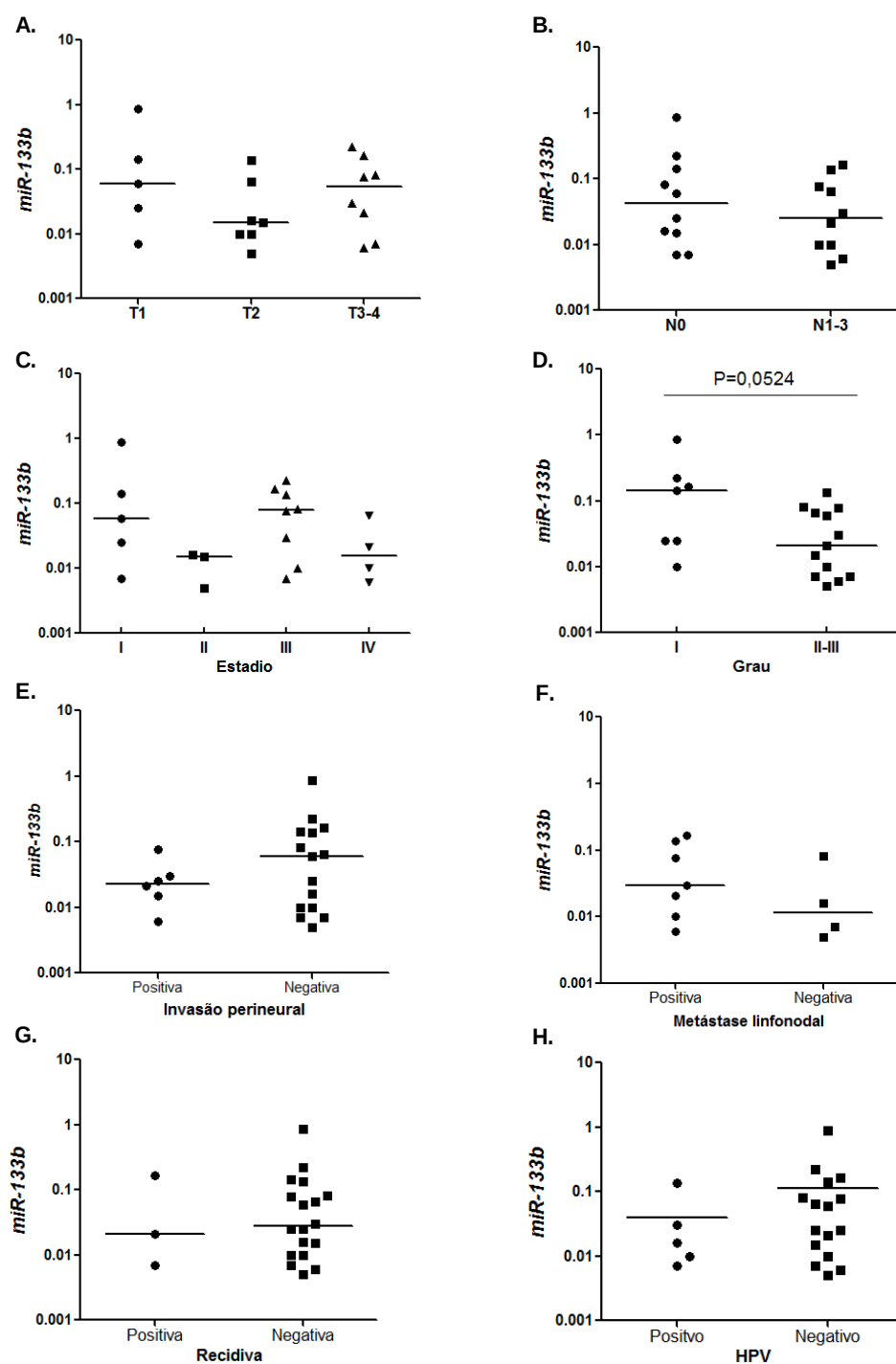


Figura 26 - Níveis dos transcritos de *miR-133b*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadiamento patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

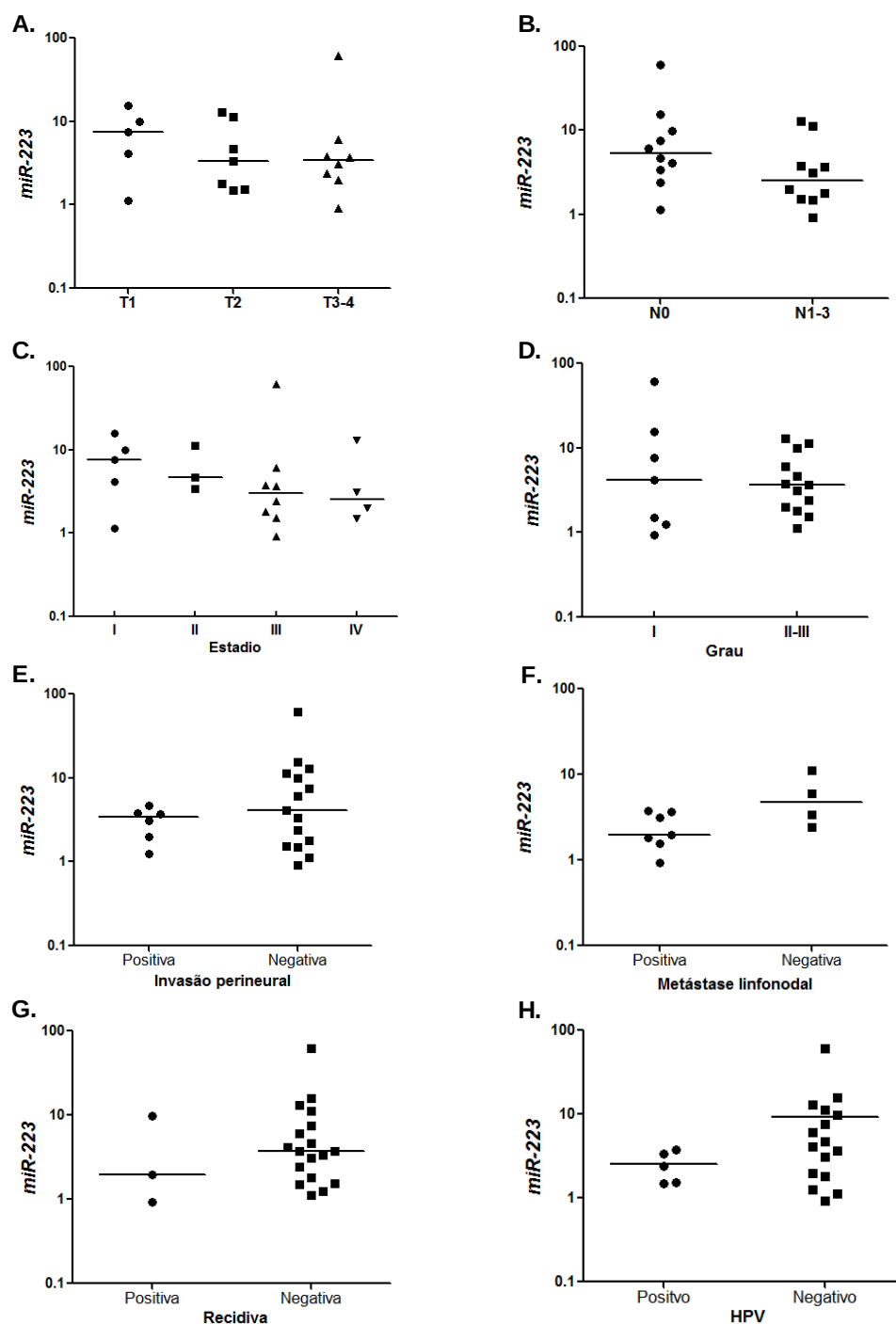


Figura 27 - Níveis dos transcritos de *miR-223*. De acordo com: **A.** tamanho do tumor (T); **B.** envolvimento de linfonodos (N); **C.** estadio patológico; **D.** grau; **E.** invasão perineural; **F.** metástase linfonodal; **G.** recidiva; e **H.** infecção pelo HPV. A mediana de expressão de cada miRNA para cada característica está mostrada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste de Mann-Whitney nas comparações entre pares e Kruskal-Wallis para múltiplas comparações com pós-teste de Dunn. Os níveis de expressão relativa estão apresentados em escala logarítmica.

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi delineado para confirmar os achados de um estudo prévio em carcinomas de pênis onde foi avaliado o envolvimento de ganhos e perdas genômicas detectados pela metodologia de array CGH (aCGH) e genes alterados quanto à expressão de transcritos pela metodologia de *microarrays* em plataformas 4x44K (Agilent Technologies). A análise de expressão gênica revelou um grupo significativo de genes da família de carreadores de solutos (*SLCs*) com expressão alterada nos CaPe em comparação com tecido peniano normal.

A superfamília *SLC* compreende 55 famílias de genes com pelo menos 362 genes codificadores de proteínas envolvidas no transporte de nutrientes, metabólitos, drogas e toxinas através da membrana plasmática (HE et al. 2009). Curiosamente, 36 membros da família *SLC* mostraram-se alterados nos CaPe em comparação com tecidos penianos normais segundo as análises de expressão gênica global, sugerindo que estes genes podem contribuir para o desenvolvimento e/ou progressão destes tumores. A integração dos dados de expressão e genômicos revelou que as alterações nos níveis de expressão não estavam associadas com alteração no número de cópias destes genes nos tumores, sugerindo que outros mecanismos de regulação poderiam estar envolvidos, como os miRNAs. Desta forma, foi realizada uma análise *in silico* utilizando os bancos de dados *Target Scan* e *PicTar* como ferramentas de predição de miRNAs reguladores para os genes da família *SLC* que se mostraram diferencialmente expressos em CaPe. Dentre os genes *SLC* alterados foram selecionados seis para a análise dos transcritos, a saber: *SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4*,

SLC25A16, *SLC25A25* e *SLC27A4*. Os critérios de seleção destes genes se basearam nos maiores valores de *fold change* detectados na análise de expressão gênica e nos possíveis miRNAs reguladores detectados pela análise *in silico* (miR-22, miR-23b, miR-26b, miR-27b, miR-133b, miR-223) que estavam mapeados em regiões envolvidas em ganhos ou perdas detectadas no aCGH, e que poderiam explicar, pelo menos em parte, as alterações dos genes por eles regulados.

A validação de achados de expressão gênica em larga escala requer uma série de cuidados que envolvem desde o desenho dos pares de iniciadores para os genes candidatos até a seleção criteriosa de genes de referência. Há vários estudos publicados apontando métodos e cuidados necessários desde a análise dos dados gerados em estudos em larga escala até as etapas de validação destes achados (*The MicroArray Quality Control consortium- MAQC- SHI et al. 2006 e SHI et al. 2010, ARIKAWA et al. 2008*). No presente estudo procurou-se seguir todas as recomendações para estudos de validação.

Os programas *Primer-Blast* e *Oligoanalyzer* foram utilizados para desenhar os pares de iniciadores dos genes alvo da família *SLC* considerando o tamanho do produto amplificado com a mínima probabilidade de formação de estruturas secundárias e de dímeros. Os iniciadores foram desenhados especificamente para as mesmas variantes de *splicing* detectadas pelas sondas do *microarray*. Além disso, foram utilizados controles de qualidade para todos os procedimentos como proposto pelo MIQE *Guidelines* (BUSTIN et al. 2009). Todas as reações foram padronizadas utilizando um *pool* de amostras de CaPe. Os ensaios incluíram uma etapa adicional para a obtenção de curvas de dissociação dos produtos amplificados, que revelaram picos únicos, indicativos de um único produto amplificado para cada par de

iniciadores e consequentemente atestando a especificidade das reações. Estes cuidados possibilitaram a geração de resultados com excelente padrão de qualidade e alta confiabilidade.

O segundo passo importante para a análise da expressão relativa dos genes SLCs foi a seleção dos genes de referência mais estáveis. Segundo o que é preconizado pelo MIQE *Guidelines* (BUSTIN et al. 2009), a escolha dos genes de referência utilizados na normalização dos dados da PCR é um componente essencial para a obtenção de resultados confiáveis, uma vez que estes genes permitem controlar variações de rendimento de extração, transcrição reversa, rendimento e eficiência de amplificação, permitindo comparações de concentrações de mRNA entre diferentes amostras. O uso de genes de referência como controles internos é o método mais comum para normalizar os dados de análise de transcritos e deve ser validado para cada tipo de tecido avaliado. Além disso, preconiza-se que o número ideal e a seleção dos genes de referência devem ser testados experimentalmente utilizando para isso *softwares* de análise da estabilidade dos genes de referência (BUSTIN et al. 2009).

A busca em literatura revelou que não há nenhum trabalho avaliando genes de referência em CaPe, sendo este, portanto, o primeiro trabalho que se propôs a avaliar a estabilidade de genes de referência nestes tumores. No presente estudo, foram testados seis genes de referência (*ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT*, *HMBS* e *HUPO*) nos CaPe. Estes genes foram selecionados a partir de dados de literatura apontando estes genes como estáveis em outros tipos tumorais e de acordo com a experiência do grupo em outros tumores. A estratégia utilizada foi avaliar os seis genes num subgrupo de tumores, uma vez que havia limitação da quantidade de RNA disponível

para todos os experimentos deste e de outros estudos que estão sendo conduzidos utilizando as mesmas amostras. A escolha das amostras para esse pré-teste foi baseada na maior quantidade de RNA disponível, de modo a não comprometer outros estudos por falta de material. O objetivo deste pré-teste foi selecionar dentre os seis genes de referência aqueles que apresentassem menor variação de expressão entre as amostras, e prosseguir as análises nas demais apenas com os genes pré-selecionados.

A análise da estabilidade de expressão dos genes candidatos a referência foi realizada utilizando o programa *geNorm* (disponível em <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), como recomendado por diversos autores (JUNG et al. 2007; DAUD e SCOTT 2008; JOHANSSON et al. 2007; LYNG et al. 2008; BUSTIN et al. 2009). Nesta análise todos os genes constitutivos avaliados apresentaram pequena variação de expressão. Os genes *ACTB* e *GUSB* mostraram as menores variações de expressão, sendo utilizados em conjunto com *HMBS* para a normalização dos dados de RT-qPCR. A utilização de três genes de referência (*ACTB*, *GUSB* e *HMBS*) em todas as amostras permite que ao final das análises seja possível testar e confirmar a estabilidade de expressão destes genes na casuística do estudo (três é o número mínimo de genes para a análise pelo programa *geNorm*). Sendo assim, ao final dos ensaios de RT-qPCR, os genes de referência foram novamente testados pelo *geNorm* e os resultados confirmaram que os genes selecionados são estáveis nos CaPe e nos tecidos penianos normais.

Há relatos da utilização dos genes *ACTB*, *GUSB* e *HMBS* como genes de referência em outros tumores. O gene *ACTB*, que codifica a β actina, tem sido utilizado em diferentes tecidos como gene de referência, inclusive em amostras tumorais. MORSE et al. (2005) observaram pouca variação na expressão de *ACTB*

em linhagens celulares de câncer de mama com diferentes potenciais metastáticos. Outros autores também relataram estabilidade de expressão de *ACTB* em linhagens celulares pulmonares e tecido pulmonar (NGUEWA et al. 2008) e neurônios de córtex pré-frontal (JOHANSSON et al. 2007). O gene *GUSB* (beta glucuronidase) foi relatado como pouco variável entre tumores de mama e tecido mamário normal (MCNEILL et al. 2007), e foi descrito como um bom gene normalizador para leucemia linfocítica crônica (ABRUZZO et al. 2005), leucemia mielóide crônica (LEE et al. 2006), e hepatite crônica (ROMANOWSKI et al. 2008). Em relação ao gene *HMBS* (hidroximetilbilano sintase), foi descrito como o melhor normalizador em estudos com células de carcinoma hepatocelular (CICINNATI et al. 2008), e como um bom normalizador em amostras de cérebro (COULSON et al. 2008, KOPPELKAMM et al. 2010),

Para a análise de expressão dos miRNAs a mesma estratégia foi aplicada. Sendo que, as quatro amostras de tecido peniano não-tumoral foram também incluídas no pré-teste, pois a técnica necessita de pouco RNA total para a análise. Isso leva a uma estimativa mais acurada, caso exista uma modulação dos miRNAs testados durante a tumorigênese.

Semelhante ao estudo dos genes *SLCs*, não há relatos em literatura envolvendo miRNAs em CaPe, consequentemente não há descrição de referências estáveis para estes ensaios. Assim, foram selecionados por meio de uma revisão em literatura dois genes codificadores de miRNAs (*LET7a* e *MIR16*) em conjunto com quatro genes codificadores de pequenos RNAs nucleolares (*RNU44*, *RNU48*, *RNU6b* e *RNU47*), que demonstraram expressão pouco variável em outros tecidos tumorais. Para os miRNAs, o pré-teste demonstrou que *LET7a* e *RNU6b* apresentavam

expressão muito variável para o uso como calibradores de expressão dos miRNAs ($M=1,933$ e $1,614$ respectivamente). Após a remoção em série dos transcritos menos estáveis, o programa *geNorm* indicou o uso de *RNU48* e *RNU47* como o melhor par de transcritos de referência. Sendo que o conjunto de genes de referência mais estáveis para a normalização dos miRNAs alvos identificado pelo *geNorm* foi *RNU48* + *RNU47* + *MIR16* + *RNU44*. A estabilidade destes calibradores foi confirmada na análise final contendo todas as amostras avaliadas. O presente estudo mostrou que *RNU6B* e *LET7a* não são indicados como normalizadores de expressão de miRNAs em câncer de pênis. Recentemente, *RNU44*, *RNU47* e *RNU48* foram relatados como bons normalizadores em linhagens de câncer de mama MCF-7 tratadas tanto com agentes tóxicos como terapêuticos (CHEN et al 2011).

Para a validação dos genes alvo da família *SLC* por RT-qPCR foram avaliados dois grupos de amostras: o grupo de validação técnica (mesmas amostras analisadas por expressão gênica global) e um grupo independente de amostras tumorais e normais (validação biológica). Apesar do número limitado de amostras no grupo de validação biológica, foi possível concluir que quatro dos seis genes avaliados (67%) confirmaram os resultados de expressão detectados por *microarray*, sendo que os genes *SLC8A1*, *SLC25A25* e *SLC27A4* se mostraram significativamente alterados nos tumores em comparação com os tecidos penianos normais, enquanto que *SLC1A3* foi marginalmente significativa.

A análise global de tumores e controles dos grupos de validação técnica e biológica mostrou uma diminuição significativa de expressão dos genes *SLC8A1* ($P<0,01$) e *SLC25A25* ($P<0,01$) nos tumores comparados aos controles. Por outro lado, foi verificado um aumento significativo do transcrito *SLC27A4* ($P<0,01$) nos

CaPe. O gene *SLC1A3* mostrou uma tendência a aumento de expressão em CaPe ($P=0,057$) no grupo técnico com mediana de expressão relativa de 2,31, no entanto a análise de todas as amostras tumorais mostrou mediana de expressão relativa de 2,62, porém com menor diferença estatística ($P=0,07$), provavelmente em decorrência da variabilidade da expressão deste gene nos controles.

Em contraste, não foram observadas diferenças significativas para a expressão de os genes *SLC25A4* e *SLC25A16* entre tumores e controles. A análise de correlação entre os níveis de expressão detectados por *microarray* e RT-qPCR nos CaPe mostrou correlação positiva significativa em quatro dos seis genes avaliados (*SLC1A3*, *SLC8A1*, *SLC25A4* e *SLC27A4*). Apenas dois genes, *SLC25A16* e *SLC25A25*, não mostraram correlação significativa.

Alguns estudos apontam correlações variadas quando analisam amostras pareadas avaliadas por *microarray* e RT-qPCR. DALLAS et al. (2005) estudaram 48 genes por *microarray* e RT-qPCR e observaram correlações estatisticamente significativas em 33 dos 48 genes (69%), enquanto que 13% dos genes avaliados mostraram correlações inversas. Os autores enfatizam a importância em validar os resultados antes da interpretação dos dados de expressão gênica. CHIU et al. (2005) observaram concordância entre os dados de expressão gênica por *microarray* e RT-qPCR em um estudo com amostras de câncer colorretal em 8 dos 20 genes avaliados (40%). Alguns fatores podem contribuir para que alguns genes não apresentem concordância de expressão quando avaliados por *microarray* e RT-qPCR. O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a PCR em regiões distintas das sondas do *microarray* pode resultar na quantificação de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de *splicing* alternativo. Outra possível explicação para resultados

conflitantes pode ser a exatidão das sequências de referência utilizadas para desenhar os iniciadores para RT-qPCR, que podem conter mutações ou SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) ainda não descritos, e, portanto, ainda não depositados nos bancos de dados. Além disso, as técnicas de *microarray* e RT-qPCR apresentam diferenças de sensibilidade e especificidade na identificação dos transcritos diferencialmente expressos. MORRISON et al. (1998) notaram que a sensibilidade do método de detecção pelo SYBR Green I é limitada quando se parte de um pequeno número de fitas-molde na amostra alvo, sugerindo o método de detecção por TaqMan, considerado mais específico e sensível. Por outro lado, MAEDA et al. (2003) não encontraram diferenças significativas em termos de especificidade e sensibilidade entre os métodos de detecção por SYBR Green e TaqMan. Da mesma forma, outros autores observaram resultados similares quando utilizaram as duas técnicas para o mesmo estudo (PONCHEL et al. 2003; HEMBRUFF et al., 2005). ARIKAWA et al (2008) mostraram que o método de detecção por SYBR Green tem alto grau de concordância quando comparado aos resultados obtidos com outras metodologias como TaqMan, QuantiGene e StaRT-PCR e quatro diferentes plataformas de *microarrays*. Em resumo, a taxa de concordância de 67% (4/6 genes) para os genes *SLC* diferencialmente expressos detectados por *microarray* e por RT-qPCR está dentro do esperado e reforça os achados obtidos no estudo de expressão em larga escala nos CaPe. Além disso, se for considerada a significância marginal encontrada para os demais genes, a qual pode ter sido encontrada pelo número limitado de amostras testadas, esse valor aumenta consideravelmente.

As alterações nos níveis de expressão em 36 membros da família *SLC* detectados previamente por *microarray* nos CaPe em relação aos tecidos normais

sugerem que estes genes devem ter um papel importante na carcinogênese peniana. Dos 36 genes alterados, seis foram selecionados para validação e quatro confirmaram os achados prévios. Os genes *SLC8A1* e *SLC25A25* apresentaram expressão diminuída em 74% e 83% dos tumores, respectivamente, enquanto que *SLC1A3* e *SLC27A4* mostraram aumento de expressão em 74% e 71% dos CaPe, respectivamente.

As proteínas SLCs têm um papel importante na homeostase celular associada ao transporte de nutrientes para o interior da célula e remoção de substâncias tóxicas intracelulares. Outra função importante atribuída a estas proteínas é o transporte de drogas, facilitando absorção, metabolismo e eliminação (URBAN et al. 2006). Há raros relatos de alterações nos transportadores SLCs associados a tumores. Já foi descrito aumento de *SLC19A3*, um carreador de tiamina, induzido por hipóxia em linhagens de câncer de mama, sendo que o aumento de expressão deste gene foi induzido via HIF-1 α . Estes dados sugeriram que alterações no microambiente do tumor podem modificar o padrão de expressão dos genes SLCs. Por outro lado, *SLC19A1*, um transportador de folato, foi associado a resistência ao tratamento com metotrexato em alguns tumores (revisado em HUANG 2007).

Especificamente o gene *SLC1A3*, também nomeado *EAAT-1* (*excitatory amino acid transporter-1*), que apresentava expressão aumentada em CaPe, está relacionado com transporte de aminoácidos neutros e glutamato de alta afinidade. O aumento da expressão da proteína codificada por este gene já foi descrito em tumores do plexo coróide (BESCHORNER et al. 2009). Glutamato é um neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, que atua também no desenvolvimento e na regulação da proliferação e migração de neurônios progenitores. Além disso,

SLC1A3/EAAT-1 tem um papel vital no suprimento de glutamato para processos metabólicos como o ciclo glutamato-glutamina. Alterações em *SLC1A3* foram associadas a várias doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, a sinalização de glutamato mediada por estes receptores tem também sido associada a proliferação e crescimento de tumores cerebrais (revisado em BEART e SHEA, 2007). Estudos mais recentes têm mostrado que o neurotransmissor glutamato está expresso em vários outros tecidos regulando diversos processos biológicos (HAAS et al. 2010). Certas características das células embrionárias neurais que incluem a capacidade proliferativa, de migração e invasão são compartilhadas por células tumorais. Baseados neste pressuposto, RZESKI et al (2001) avaliaram a resposta de várias linhagens tumorais de diferentes tecidos de origem à antagonistas de glutamato. Os autores observaram que as linhagens de adenocarcinoma de cólon, astrocitoma, carcinoma de mama e de pulmão foram mais sensíveis ao antagonista dizocilpina (antagonista N-metil-D-aspartato), enquanto que as linhagens de adenocarcinoma de cólon, neuroblastoma apresentaram melhor resposta ao antagonista GYKI52466 (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolo-propionato). Estes antagonistas mostraram atividade anti-proliferativa, diminuindo a divisão celular e aumentando a morte celular. Adicionalmente, os antagonistas diminuíram a motilidade das células tumorais, indicando o potencial uso destes antagonistas no tratamento de tumores. Sendo assim, é possível hipotetizar que o aumento de expressão de *SLC1A3* detectado em CaPe pode levar ao aumento de glutamato nestes tumores, favorecendo a proliferação e eventualmente a capacidade invasiva das células tumorais. Investigações futuras poderão confirmar o papel das vias deste neurotransmissor nos CaPe.

O gene *SLC8A1*, que codifica um transportador de íons responsável pela troca de três íons Na^+ extracelular por um Ca^{2+} intracelular, mostrou-se com diminuição da expressão em 74% dos CaPe. As primeiras descrições da função da proteína SLC81, também conhecida por NCX1, mostraram um papel fundamental na remoção do Ca^{2+} citoplasmático. Estes estudos foram realizados no tecido cardíaco, onde essa proteína tem papel fundamental na excitação e contração do músculo cardíaco mediada pelas trocas de Na^+ e Ca^{2+} . Em situações de sobrecarga cardíaca ou num cenário de insuficiência cardíaca grave, ocorre aumento de expressão de *SLC8A1*. Além do coração, *SLC8A1* também é expresso em abundância no cérebro e rins e em níveis menores em vários outros tecidos (revisado em LYTTON 2007). Os íons Ca^{2+} são fundamentais em várias funções celulares como contração, secreção, transcrição e proliferação. Em situações de hipóxia ou isquemia cerebral, já foi mostrado que os níveis de Ca^{2+} aumentam levando à morte celular e apoptose dependente de Ca^{2+} , sendo que *SLC8A1* parece estar envolvido neste processo mediando o influxo de Ca^{2+} (SHONO et al 2010). Sendo assim, é possível que a diminuição de expressão de *SLC8A1* nos CaPe seja um mecanismo de evasão da apoptose induzida pelo ambiente de hipóxia do tumor, por diminuição das concentrações de Ca^{2+} no interior das células tumorais.

O gene *SLC25A25*, que apresentou diminuição de expressão em 83% dos CaPe, codifica a proteína APC3 (carreadora de ATP-Mg/Pi isoforma 3), que está envolvida no transporte mitocondrial de nucleotídeos de adenina (FIERMONTE et al. 2004). Não há relatos em literatura do envolvimento deste gene em doenças humanas.

Por outro lado, foi observado um aumento de expressão de cerca de quatro vezes para o gene *SLC27A4* em 71% dos CaPe. O gene *SLC27A4/FATP* está relacionado com o transporte de ácidos graxos de cadeia longa. O aumento de expressão deste gene foi relatado em linhagens de hepatocarcinoma (BLASK et al 1999). Em situação de deprivação de nutrientes, há aumento da expressão deste gene em modelos *in vitro* com linhagens de adipócitos (HUI et al. 1998). Em conjunto estes dados sugerem que este gene pode estar envolvido na resposta das células às condições de deprivação de nutrientes do ambiente, o que é um fenômeno observado em tumores durante seu crescimento e progressão, sugerindo assim que este gene deve ter um papel importante na absorção de ácidos graxos pelos tumores, contribuindo para a proliferação celular anormal.

O conjunto dos resultados que incluem os dados prévios de análise de transcritos mostrando alteração em 36 genes da família *SLC* e os genes validados no presente estudo sugere que estes genes são modulados provavelmente em resposta à demanda de nutrientes e íons relacionada à intensa atividade proliferativa do tumor bem como em resposta ao microambiente tumoral, como por exemplo, desenvolvendo mecanismos de evasão da apoptose induzida por hipóxia. Drogas que atuem nestes receptores poderiam ser utilizadas de modo a subverter os mecanismos pró-sobrevivência desenvolvidos pelas células tumorais.

Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão dos genes *SLCs* são pouco conhecidos, principalmente em tumores. Considerando que estes genes se mostraram diferencialmente expressos nos CaPe e que não mostraram alterações genômicas detectadas pela análise de aCGH, a hipótese inicial deste estudo foi de que miRNAs poderiam estar envolvidos na regulação destes genes. Sendo assim, por

meio de análise *in silico* foram selecionados seis miRNAs que poderiam regular os seis genes *SLCs* estudados. Os miRNAs listados na análise *in silico* estavam mapeados em regiões de ganhos ou perdas detectados por aCGH e poderiam levar à expressão alterada destes miRNAs e consequentemente dos genes por ele regulados.

As análises mostraram que o miR-23b, miR-26b, miR-27b e miR-133b estavam significativamente menos expressos nas amostras de CaPe em comparação aos tecidos normais, enquanto miR-223 mostrou aumento de expressão nos tumores. Estes dados sugerem que estes miRNAs devem ter um papel importante na regulação de genes envolvidos na carcinogênese peniana. Para o nosso conhecimento não há relatos em literatura de alterações envolvendo miRNAs em carcinomas de pênis.

Dois genes da família *SLCs* apresentaram correlação negativa significativa com os dois miRNAs reguladores preditos pela análise *in silico*, sugerindo então que pelo menos dois dos seis genes *SLCs* avaliados no presente estudo parecem ser regulados por miRNAs.

O gene *SLC8A1*, que apresentou diminuição de expressão nos CaPe (cerca de 3 vezes menos expresso nos tumores), correlacionou-se negativamente com seu miRNA regulador predito *miR-223* ($P=0,015$, $r=-0,482$), que por sua vez mostrou-se significativamente mais expresso nos tumores que nos controles (cerca de 3,5 vezes mais expresso nos tumores). Ganhos em Xp12 onde este miRNA está mapeado foram observados em dois casos, no entanto, os níveis de transcritos de miR-223 foram detectados em apenas um caso, que mostrou expressão aumentada (expressão relativa de 9,87). Estes dados sugerem que um dos mecanismos de regulação da expressão do gene *SLC8A1* é mediada por miRNA, sendo que miR-223 parece ser um dos miRNAs reguladores deste gene. Para o nosso conhecimento, este é o

primeiro relato em CaPe mostrando um gene alterado e o mecanismo relacionado à essa alteração. Baseados nestes achados, é possível especular que a diminuição da expressão de *SLC8A1* mediada, pelo menos em parte, pela expressão alterada de miR-223 em CaPe, pode ser capaz de induzir a diminuição da concentração celular de cálcio, considerando que o *SLC8A1* é um transportador de cálcio. O mecanismo pelo qual o cálcio contribui para o processo tumoral ainda é pouco conhecido, no entanto, há relatos da associação dos níveis de Ca^{2+} e indução de apoptose em células de cérebro submetidas à hipóxia (SHONO et al 2010). Um trabalho recente com linhagem tumoral de próstata mostrou que o carcinógeno taspigargina induz o transporte do cálcio para o interior das células, promovendo a ativação da apoptose induzida por cálcio e consequentemente levando a morte celular (HUANG et al, 2011.). Sendo assim, é plausível supor que o aumento de expressão de miR-223 leve a diminuição da expressão de *SLC8A1*, e que ambos eventos sejam um mecanismo de evasão da célula tumoral à apoptose em CaPe.

O segundo gene da família *SLC* que parece ser regulado por um miRNA predito na análise *in silico* é o *SLC27A4*, o qual foi detectado com expressão aumentada em CaPe. O miRNA regulador predito, miR-133b, apresentou expressão diminuída em 95% dos tumores e se correlacionou negativamente com os níveis de *SLC27A4* ($P=0,023$, $r=-0,454$). Vale ressaltar que os dados prévios de aCGH haviam mostrado ganhos em 6p12.2 onde está mapeado miR-133b em 3 casos e perdas em 1 caso. Destes, três casos foram avaliados por RT-qPCR e dois deles apresentaram aumento de expressão de miR-133b sendo que um caso apresentou ganho na região onde se mapeia esse miR. É possível que outros mecanismos de regulação da expressão deste miRNA estejam alterados, e que apesar do ganho no

número de cópias do miRNA, os níveis de transcritos estejam diminuídos por mecanismos alternativos de regulação gênica. De qualquer forma, a diminuição da expressão de miR-133b parece levar ao aumento da expressão de *SLC27A4*. É possível que o aumento da expressão de *SLC27A4* possa ser capaz de induzir o aumento da captação de ácidos graxos pelo tumor. Em modelo *in vitro* com linhagens de câncer de próstata foi mostrado que a captação de ácido graxo de cadeia longa é maior do que a captação de glicose por estas células (LIU et al 2010c), sugerindo que os ácidos graxos possam ser fontes importantes para a geração de ATP e acetil-coenzima A nestes tumores (LIU 2006). Sendo assim, é possível que o metabolismo do ácido graxo esteja alterado também nos CaPe, e que *SLC27A4* desempenhe um papel neste processo, facilitando a captação dos ácidos graxos para o interior das células tumorais.

As análises de correlação também evidenciaram genes *SLCs* possivelmente regulados por miRNAs não preditos nas análises *in silico*. Interessantemente, o miR-223 (expressão aumentada em CaPe) possivelmente um regulador do gene *SLC8A1*, parece regular também dois genes da família *SLC25*, *SLC25A4* e *SLC25A25*. Dentre estes genes, observou-se diminuição significativa de *SLC25A25* em 83% dos casos de CaPe. Correlação negativa estatisticamente significativa foi detectada entre *SLC25A25* e miR-223 ($P=0,004$ e $r=-0,555$). Para o nosso conhecimento, não há relatos do papel de *SLC25A25* em tumores, e, portanto, um este gene é um candidato interessante para futuros estudos.

Uma correlação inversa também foi detectada para *SLC1A3* e miR-26b ($P=0,036$, $r=-0,422$), tendo sido observada a diminuição significativa de expressão de miR-26b em CaPe e uma tendência a aumento de expressão do *SLC1A3* nos CaPe.

Assim, é possível que a diminuição de miR-26b nos CaPe poderia levar à falta de regulação de *SLC1A3* por este miRNA; e consequentemente, níveis aumentados de *SLC1A3* poderiam contribuir para o influxo de glutamato nestes tumores, favorecendo a proliferação e invasão.

O conjunto destes resultados indica que alguns genes da família *SLC* são regulados por miRNAs, corroborando a hipótese inicial deste estudo, porém não excluindo que outros mecanismos estejam envolvidos no controle de expressão destes genes. Adicionalmente, cinco dos seis miRNAs avaliados mostraram-se alterados em CaPe e provavelmente regulam outros genes, que não apenas os genes da família *SLC*. Desta forma, o presente estudo abre uma nova fronteira de investigações em CaPe, indicando alterações em miRNAs reguladores de outros genes que podem ter relevância crítica no desenvolvimento ou progressão dos carcinomas de pênis.

Foi detectada a diminuição significativa de expressão do miR-26b nos CaPe. Há relato de diminuição e expressão de miR-26b em hepatocarcinomas em comparação com os tecidos pareados não tumorais (JI et al. 2009). No mesmo trabalho, os autores mostraram que os tumores com expressão reduzida do miR-26 tinham um perfil transcriptômico distinto. A análise de redes de genes revelou que ativação de vias de sinalização entre o fator nuclear $\kappa\beta$ e a interleucina-6 pode desempenhar um papel no desenvolvimento deste tumor. Os pacientes cujos tumores tiveram expressão diminuída de miR-26 tinham redução da sobrevida global, mas uma melhor resposta ao interferon que os pacientes cujos tumores tiveram alta expressão deste miRNA (JI et al. 2009). No estudo anterior do grupo (BUSSO 2011), entre as 10 vias gênicas com maiores scores baseadas nos genes com expressão

diferencial entre tumores positivos e negativos para infecção por HPV, três vias estavam relacionadas a respostas do sistema imune. Essas vias envolveram a via de sinalização do interferon (4 genes alterados), sinalização IL-22 (2 genes alterados) e sinalização do IL-15 (2 genes alterados). A via de sinalização de interferon exerce sua atividade principalmente pela ligação a proteínas da família STAT e consequente ativação de células do sistema imune (Canonical Pathways Report, IPA). Já IL-15 corresponde a uma citocina com efeitos importantes na proliferação, sobrevivência e diferenciação de células T e NK. Essa citocina é capaz de regular várias vias de sinalização, incluindo JAK/STAT, MAPK e NF- κ B, nesse último caso estando relacionada à promoção de inflamação (Canonical Pathways Report, IPA). A IL-22 também corresponde a uma citocina envolvida na inflamação (Canonical Pathways Report, IPA) (BUSSO 2011). Assim, é possível que o conhecimento do papel dos miRNA em regular genes associados a vias particulares possa contribuir para o delineamento de terapias alvo-específicas.

Dois outros miRNAs alterados em CaPe, miR-23b e miR-27b, formam um *cluster* de miRNA mapeados em 9q22.32, sendo que ambos tinham expressão diminuída nos tumores, com alto grau de correlação entre eles ($P < 0,0001$, $r = 0,8818$). Em especial, miR-23b foi recentemente relatado como um dos miRNAs alterados (expressão diminuída) em decorrência da infecção pelo HPV em carcinomas cervicais, mediado principalmente pelas oncoproteínas virais E6 e E7 (ZHENG e WANG 2011). No presente estudo, não foi observada diferença nos níveis de expressão de miR-27b nos CaPe de acordo com a positividade pelo HPV, embora o pequeno número de amostras negativas para o vírus possa dificultar a identificação de uma associação significativa entre a infecção pelo vírus e os níveis

deste miRNA. O aumento da casuística poderá esclarecer melhor se esta associação ocorre nos tumores CaPe infectados pelo HPV. Outro resultado interessante é que o miR-23b e o miR-27b mostraram associação com invasão perineural nos CaPe ($P=0,039$ e $P=0,032$, respectivamente), sendo que níveis mais baixos destes miRNAs se associaram com a presença de invasão. Dados da literatura em condrócitos mostram que miR-27b regula a metaloproteinase 13 (MMP-13) (AKAHTAR et al. 2010). A expressão aumentada de *MMP-13* pelas células tumorais já foi associada à invasão de linfonodos e pior prognóstico nos carcinomas de mama invasivos (ZHANG et al. 2008). No estudo prévio do grupo, não foi detectada a expressão diferencial da *MMP-13*, embora outras MMPs tenham sido observadas como diferencialmente expressas como a *MMP-1* e *MMP-9* (BUSSO 2011). A continuidade do presente estudo poderá avaliar outros genes candidatos à regulação por miR-23b e/ou miR-27b e que se mostraram diferencialmente expressos nos CaPe nas análises de *microarray*. Como exemplo, a investigação da correlação entre miR-23b e *PLAU* (*plasminogen activator, urokinase*). A análise *in silico* mostrou que miR-23b pode regular *PLAU* um gene que codifica uma serina protease envolvida na degradação da matriz extracelular e que medeia a proliferação e migração celular. Dados de expressão gênica global nos CaPe identificaram o gene *PLAU* como diferencialmente expresso, apresentando aumento de expressão nos tumores (BUSSO 2011). Recentemente, JUNCKER-JENSEN e LUND (2011) mostraram uma sobreposição das ações de *MMP-13* e *PLAU* no reparo tecidual em modelo com animais deficientes para estes genes. Os animais deficientes para os dois genes apresentaram um atraso na resposta tecidual comparado aos animais deficientes para cada gene individual. Os autores sugeriram que estratégias terapêuticas direcionadas

às proteínas codificadas por estes genes devem ser consideradas inclusive em tumores invasivos, onde a degradação proteolítica é um evento crucial (JUNCKER-JENSEN e LUND 2011). Em resumo, estes resultados mostraram que miR-23b e miR-27b e/ou os genes por eles regulados, podem ser marcadores prognósticos nos CaPe, e ainda com potencial como alvos terapêuticos nestes tumores.

Com relação à miR-133b, a diminuição significativa da expressão do transcrito em aproximadamente 40 vezes foi observada na grande maioria dos CaPe (20/21 amostras) em comparação com tecidos normais. A diminuição da expressão de miR-133b em aproximadamente 30 vezes foi relatada em carcinomas de pulmão (CRAWFORD et al. 2009). Foram identificadas duas moléculas pró-sobrevida da família *BCL-2* (*MCL-1* e *BCL2L2* (*BCLw*)), como alvos previstos do miR-133b. Por último, a expressão aumentada do miR-133b induziu a apoptose após a exposição à gencitabina (indutor da apoptose *BCL-2* dependente) nestas células tumorais. Essa foi a primeira observação da redução da expressão do miR-133b no carcinoma de pulmão que tem como alvos membros da família *BCL-2* (CRAWFORD et al. 2009). O estudo prévio do grupo também encontrou expressão diminuída dos genes *BCL-2* na análise de expressão gênica global (BUSSO 2011). Assim semelhante aos estudos em carcinoma de pulmão, o presente estudo dá evidências de alvos terapêuticos para o carcinoma de pênis. O presente estudo também mostrou uma associação marginal dos níveis diminuídos de miR-133b em tumores com estádios II e III em comparação com estadio I ($P=0,052$), sugerindo que este miRNA poderia ser um marcador de tumores com fenótipos mais agressivos. De maneira semelhante, níveis mais baixos de miR-133b foram previamente associados a pior sobrevida em pacientes com carcinoma colorretal (AKÇAKAYA et al. 2011).

Semelhante aos achados do presente estudo, o aumento da expressão de miR-223 já foi demonstrado em tumores sólidos como cólon, pâncreas, próstata e estômago (VOLINIA et al. 2006). XU et al (2011) mostraram que os níveis séricos dos miR-21, miR-122 e miR-223 estavam elevados em pacientes com carcinoma hepatocelular (HCC) ou em hepatite crônica. Recentemente, LI et al (2011) relataram o aumento da expressão do miR-223 em carcinoma gástrico metastático; os autores demonstraram que esse evento era capaz de estimular proliferação e a invasão das células tumorais. Por outro lado, EYHOLZER et al (2010) observaram que miR-223 está suprimido em células de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). O miR-223 é um importante regulador da diferenciação de eritrócito na medula óssea. Quando expresso, bloqueia a expressão de LMO, uma proteína crucial para a transformação das células tronco CD34+ em eritrócitos (FELLI et al. 2009). O aumento da expressão de miR-223 em cardiomiócitos induziu o aumento da expressão da proteína GLUT4 e aumento da captação de glicose. Esta relação foi confirmada *in vivo*, utilizando um inibidor sintético do miR-223, que levou à diminuição da expressão da GLUT4, e consequente diminuição da captação de glicose (LU et al. 2010).

Em conclusão, pela primeira vez demonstrou-se a associação da expressão de miRNAs e genes da família *SLC* em CaPe. O significado dessa associação não pode ser deduzida dos experimentos realizados no presente estudo, porém sugerem a participação destes genes e miRNAs na carcinogênese peniana. Um grande desafio nessa área é, sem dúvida, a identificação dos genes alvo ou de vias de sinalização das quais eles participam. Apesar do desenvolvimento de algoritmos de predição, a tarefa é complexa principalmente porque um único miRNA pode regular centenas de genes

alvo. Além disso, o seu efeito pode variar no tempo e no espaço, ou ser restrito a grupos de células em um tecido, seja ele normal ou tumoral. A importância de vencer esses desafios está no potencial dos miRNAs como biomarcadores no câncer e outras doenças, além de serem alvos potenciais para novas terapias.

6 CONCLUSÕES

- Quatro dos seis genes *SLCs* avaliados (67%) confirmaram os resultados prévios da análise de expressão gênica global. Os genes *SLC8A1* e *SLC25A25* apresentaram expressão diminuída significativa nos CaPe em comparação com os tecidos normais, enquanto que *SLC27A4* e *SLC1A3* apresentavam expressão aumentada nos tumores. O gene *SLC1A3* mostrou associação marginal, sugerindo que estes genes devem ter um papel importante na carcinogênese peniana. A função de transporte de nutrientes ou outras moléculas sugere que estes genes poderiam ser modulados em resposta à demanda de nutrientes e íons relacionada à intensa atividade proliferativa do tumor bem como em resposta ao microambiente tumoral;
- Cinco dos seis miRNAs avaliados se mostraram diferencialmente expressos entre tumores e controles; sendo que *miR-23b*, *miR-26b*, *miR-27b* e *miR-133b* estavam significativamente menos expressos nos CaPe, enquanto *miR-223* se encontrava mais expresso;
- A análise de correlação entre os níveis dos miRNAs os genes *SLCs* mostrou que dois genes *SLCs* apresentaram correlação negativa significativa com os dois miRNAs reguladores preditos pela análise *in silico*. Foi observada uma correlação negativa significativa entre *SLC8A1* e *miR-223* e *SLC27A4* e *miR-133b*. Foram detectados outros genes *SLCs* possivelmente regulados por miRNAs não preditos nas análises *in silico*, como a regulação de *SLC25A4* e *SLC25A25* (expressão diminuída nos tumores) por *miR-223* (expressão aumentada em CaPe). Foi detectada uma correlação inversa entre o *SLC1A3* e

miR-26b, com diminuição significativa de expressão de miR-26b em CaPe e uma tendência a aumento de *SLC1A3* nos CaPe. Estes resultados sugerem que alguns genes da família *SLC* são regulados por miRNAs;

- Cinco dos seis miRNAs avaliados neste estudo mostraram-se alterados nos CaPe e provavelmente regulam outros genes, que não apenas os genes da família *SLC*, podendo desempenhar um papel importante na carcinogênese peniana;
- Foi verificada associação significativa entre menores níveis de *miR-22*, *miR-23b* e *miR-27b* e invasão perineural e tendência a associação entre os níveis mais baixos de miR-133b e graus histológicos II e III. Os dados sugerem que estes miRNAs e/ou os genes por eles regulados podem ser potenciais marcadores prognósticos nos CaPe.

7 REFERÊNCIAS

Abruzzo LV, Lee KY, Fuller A, Silverman A, Keating MJ, Medeiros LJ, Coombes KR. Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data. **Biotechniques** 2005; 38:785-92.

Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan AN, Voss FR, Haqqi TM. MicroRNA-27b Regulates the Expression of Matrix Metalloproteinase 13 in Human Osteoarthritis Chondrocytes. **Arthritis Rheum** 2010; 62:1361-71.

Akçakaya P, Ekelund S, Kolosenko I, et al. miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer. **Int J Oncol** 2011; 39:311-8.

Alves G, Heller A, Fieldler W, et al. Genetic Imbalances in 26 Cases of Penile Squamous Cell Carcinoma. **Genes, Chromosomes Cancer** 2001; 31:48-53.

Andersson P, Kolaric A, Windahl T, et al. PIK3CA, HRAS and KRAS Gene Mutations in Human Penile Cancer. **J Urol** 2008; 179:2030-4.

Arikawa E, Sun Y, Wang J, Zhou Q, et al. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. **BMC Genomics**. 2008; 11:9:328.

Bar N, Dikstein R. miR-22 Forms a Regulatory Loop in PTEN/AKT Pathway and Modulates Signaling Kinetics. **PLoS ONE** 2010; 5:e10859.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics biogenesis, mechanism and function. **Cell** 2004; 166:281-379.

Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. **J Cell Biol** 1999; 147:1493-502.

Beart PM, O'Shea RD. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **Br J Pharmacol** 2007; 150:5-17.

Beggs JH, Spratt JS Jr. Epidermoid carcinoma of the penis. **J Urol** 1964, 91:166-72.

Ben-Av P, Crofford L, Wilder R, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1; a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. **FEBS Lett** 1995; 372:83-7.

Bergeron MJ, Simonin A, Burzle M, Hediger MA. Inherited epithelial transporter disorders-an overview. **J Inherit Metab Dis** 2008; Apr 14. [Epub ahead of print].

Berezikov E, Chung WJ, Willis J, et al . Mammalian mirtron genes. **Mol Cell** 2007; 28: 328–336.

Beschorner R, Pantazis G, Jeibmann A, Boy J, Meyermann R, Mittelbronn M, Schittenhelm J. Expression of EAAT-1 distinguishes choroid plexus tumors from normal and reactive choroid plexus epithelium. **Acta Neuropathol** 2009; 117:667-75.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001; 91:2315-21.

Bhagat SK, Gopalakrishnan G, Kekre NS, et al. Factors predicting inguinal node metastasis in squamous cell cancer of penis. **World J Urol** 2010; 28:93-8.

Bihrer V, Friedrich-Rust M, Kronenberger B, et al. Serum miR-122 as a Biomarker of Necroinflammation in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Am J Gastroenterol** 2011; May 24. [Epub ahead of print]

Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT, Holowachuk EW, Ruhoff MS, Kopff HS. Melatonin inhibition of cancer growth in vivo involves suppression of tumor fatty acid metabolism via melatonin receptormediated signal transduction events. **Cancer Res** 1999; 59:4693-701.

Brenner C, Subramaniam K, Pertuiset C, Pervaiz S. Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer. **Oncogene** 2011; 30:883-95.

Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex and cancer cell death. **Oncogene** 2006; 25:4744-56.

Brinton LA, Juan-Yao L, Shou-De R, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Burchard J, Zhang C, Liu AM, et al. microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. **Mol Syst Biol** 2010; 6:402.

Busso AF. **Variação no número de cópias genômicas e expressão gênica em larga escala em carcinomas de pênis**. São Paulo; 2011. [Dissertação Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem** 2009; 55:611-22.

Calin G, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med** 2005; 353:1793-801.

Calin G, Sevignani C, Dumitru C, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:2999-3004.

Campos R, Lopes A, Guimarães G, et al. E-cadherin, MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers in penile câncer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Cannell I, Bushell M. Regulation of Myc by miR-34c: a mechanism to prevent genomic instability? **Cell Cycle** 2010; 9:2726-30.

Carmell M, Xuan Z, Zhang M, et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes Dev** 2002; 16:2733-42.

Chan E, Prado D, Weidhaas J, et al. Cancer microRNAs: From subtype profiling to predictors of response to therapy. **Trends Mol Med**. Feb 24, 2011. [Epub ahead of print]

Chaux A, Soares F, Rodríguez I, et al. Papillary squamous cell carcinoma, not otherwise specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **Am J Surg Pathol** 2010a; 34:223-30.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, et al. Warty basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm: report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010b; 23:896-904.

Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, Ayala G, Cubilla AL. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. **Urology** 2010c; 76(2 Suppl 1):S7-S14.

Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, et al . A dicer independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature** 2010; 465: 584–589.

Chen D, Pan X, Xiao P, et al. Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmogenomics, toxicogenomics and small RNA expression analysis. **J Cell Physiol** 2011 [Epub ahead of print]

Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J. Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:195-200.

Chin L, Ratner E, Leng S, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the kras 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. **Cancer Res** 2008; 68:8535-40.

Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, et al. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:437-43.

Cimmino A, Calin G, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 10:13944-9.

Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, et al. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. **BMC Cancer** 2008; 8:350.

Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. **BMC Mol Biol** 2008; 9:46.

Crawford M, Batte K, Yu L, et al. microRNA 133B targets prosurvival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 388:483-9.

Cubilla A, Reuter V, Gregoire L, et al. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus- related penile neoplasm: a report of 20 cases. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:755-61.

Cubilla A, Velazquez E, Young R, et al. Epithelial lesions associated with invasive penile squamous cell carcinoma: a pathologic study of 288 cases. **Int J Surg Pathol** 2004; 12:351-64.

Cubilla A. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **World J Urol** 2009; 2:169-77.

Cunha IW, Guimaraes GC, Soares F, et al. Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic and outcome study of 7 patients. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:551-5.

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **Int J Cancer** 2005; 116:606-16.

Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, et al. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. **Cancer Res** 2008; 68:8249-59.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, et al. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR - how well do they correlate? **BMC Genomics** 2005; 6:59.

Dannenberg A, Altorki N, Boyle J, et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncol** 2001; 2:544-51.

Daud II, Scott ME. Validation of reference genes in cervical cell samples from human papillomavirus-infected and -uninfected women for quantitative reverse transcription-PCR assays. **Clin Vaccine Immunol** 2008;15:1369-73.

De Villiers E, Fauquet C, Broker T, et al. Classification of papillomaviruses. **Virology** 2004; 324:17-27.

Di Leva G, Croce C. Roles of small RNAs in tumor formation. **Trends Mol Med** 2010; 16:257-67.

Dillner J, Von K, Horenblas S, et al. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2000; 205:189-93.

Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. **Cell** 2010; 140:652-65.

Esquela-Kerscher A, Slack F. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. **Nature Rev Cancer** 2006; 6:259-69.

Eyholzer M, Schmid S, Schardt JA, et al. Complexity of miR-223 regulation by CEBPA in human AML. **Leuk Res** 2010; 34:672-6.

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annu Rev Biochem** 2010; 79:351-79.

Faria S, Martins A, Velludo M, et al. Imunoexpressão do Ki-67 no carcinoma do pênis. **Acta Cir Bras** 2000; 15: 31-33.

Farazi TA, Spitzer JJ, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. **J Pathol** 2011; 223: 102–115

Favorito L, Nardi A, Ronalsa M, et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **International Braz J Urol** 2008; 34:587:593.

Felli N, Pedini F, Romania P, et al. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. **Haematologica** 2009; 94:479-86.

Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, et al. Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. **J Pathol** 2003; 201:109-18.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Predictive pathological factors of lymph nodes involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. **Int Urol Nephrol** 2002; 34:245-50.

Ficarra V, Novara G, Boscolo-Berto R, Artibani W, Kattan MW. How accurate are present risk group assignment tools in penile cancer? **World J Urol** 2009; 27:155-60.

Ficarra V, Zattoni F, Cunico SC, et al. Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Gruppo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data. **Cancer** 2005; 103:2507-16.

Fiermonte G, De Leonardis F, Todisco S, Palmieri L, Lasorsa FM, Palmieri F. Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. **J Biol Chem** 2004; 279:30722-30.

Fuziwara CS. **Influência do MicroRNA let-7 e miR-17-92 como oncomiRs no câncer**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Universidade de São Paulo]

Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase and glutamine metabolism. **Nature** 2009; 458:762-5

Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nat Rev Drug Discov** 2010; 9:775-89.

Goel T, Singh B. Carcinoma-penis in muslims. **Ind Med Gaz** 1977; 57:202-4.

Golijanin D, Tan JY, Kazior A, et al. Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Goodman MT, Hernandez BY, Shvestov YB. Demographic and pathologic differences in the incidence of invasive penile cancer in the United States, 1995-2003. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007; 16:1833-9.

Gottlieb E, Tomlinson I. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. **Nat Rev Cancer** 2005; 5: 857-66.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res** 2006; 1:140-4

Grossman H. Premalignant and early carcinomas of the penis and scrotum. **Urol Clin North Am** 1992; 19:221-6.

Grosshans H, Filipowicz W. Proteomics joins the search for microRNA targets. **Cell** 2008; 134:560-2.

Guerrero D, Guarch R, Ojer A, et al. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. **BJU Int** 2008; 102:747-55.

Guimarães G, Cunha IW, Soares FA, et al. Clinicopathological features, nodal metastasis and outcome according to WHO classification of penile squamous cell carcinoma: a report of 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RSM, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastasis. **Urology** 2006; 68:148-53.

Guimarães G, Leal M, Campos R, et al. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile Squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-42.

Harish K, Ravi R. The role of tobacco in penile carcinoma. **Br J Urol** 1995; 75:375-7.

Haas HS, Linecker A, Pfragner R, Sadjak A. Peripheral glutamate signaling in head and neck areas. **Head Neck** 2010; 32:1554-72.

He L, Vasiliou K, and Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene Superfamily. **Hum Genomics** 2009; 3:195-206.

Hediger M, Romero F, Peng B, et al. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. **Pflugers Arch Eur J Physiol** 2004; 447:465-8.

Hembruff SL, Villeneuve DJ, Parissenti AM. The optimization of quantitative reverse transcription PCR for verification of cDNA microarray data. **Anal Biochem** 2005; 345:237-49.

Heyns CF, Fleshner N, Sangar V, Schlenker B, Yuvaraja TB, van Poppel H. Management of the lymph nodes in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S43-57.

Horenblas S. Lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. Part 1: diagnosis of lymph node metastasis. **BJU Int** 2001; 88:467-72.

Horenblas S, Van Tinteren H, Delemarre J, et al. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

Hu G, Chen D, Li X, Yang K, Wang H, Wu W. miR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Biol Ther** 2010; 10:190-7.

Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non small cell lung cancer survival. **J Clin Invest** 2008; 118:2600-8.

Huang JK, Chou CT, Chang HT, et al. Effect of thapsigargin on Ca(2+) fluxes and viability in human prostate cancer cells. **J Recept Signal Transduct Res** 2011; 31:247-55.

Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. **Cancer Metastasis Rev** 2007; 26:183-201.

Hui TY, Frohnert BI, Smith AJ, Schaffer JE, Bernlohr DA. Characterization of the murine fatty acid transport protein gene and its insulin response sequence. **J Biol Chem** 1998; 273:27420-9.

Humbey O, Cairey-Remonnay S, Guerrini J, et al. Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. **Eur J Cancer** 2003; 39:684-90.

Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nat Rev Genet** 2011; 12:99-110.

Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. **J Urol** 1993; 149:59-63.

Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. **FASEB J** 2009; 23:806-12.

Jackson SM: The treatment of carcinoma of the penis. **Br J Surg** 1966; 53:33-35.

Jang J, Choi Y, Jeon Y, Aung K, Kim C. Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo. **BMC Cancer** 2008; 8:160.

Jazdzewski K, Murray E, Franssila K, et al. A common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:7269-74.

Ji J, Shi J, Budhu A, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. **N Engl J Med** 2009; 361:1437-47.

Ji Y, He Y, Liu L, Zhong X. miRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells. **FEBS Letters** 584 2010; 961-7.

Johansson S, Fuchs A, Okvist A, Karimi M, Harper C, Garrick T, Sheedy D, Hurd Y, Bakalkin G, Ekström TJ. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. **Brain Res** 2007; 1132:20-8.

Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. **BMC Mol Biol** 2007; 8:47.

Juncker-Jensen A, Lund LR. Phenotypic overlap between MMP-13 and the plasminogen activation system during wound healing in mice. **PLoS One** 2011 Feb 4;6(2):e16954.

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. **Diagn Mol Pathol** 2001; 10:46-54.

Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ . *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390:247-51.

Kim, VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:376-85.

Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, et al. Isolation, characterization and differential gene expression of multispecific organic anion transporter 2 in mice. *Mol Pharmacol* 2002; 62:7-14.

Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, et al. Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int J Legal Med* 2010; 124:371-80.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11:597-610.

Kroon B, Leijte A, Van Boven H, et al. Microarray gene-expression profiling to predict lymph node metastasis in penile carcinoma. *BJU Int* 2008; 102:510-5.

Lai EC. microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Curr Biol* 2003; 13:R925–R36.

Landgraf PA. Mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell Cambridge* 2007; 129:1401-14.

Lee JW, Chen Q, Knowles DM, Cesarman E, Wang YL. beta-Glucuronidase is an optimal normalization control gene for molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia. *J Mol Diagn* 2006; 8:385-9.

Li T, Cao H, Zhuang J, et al. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. **Clinica Chimica Acta** 2010; 412:66-70

Li W, Duan R, Kooy F, et al. Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. **J Med Genet** 2009; 46:358-60.

Li X, Zhang Y, Zhang H, et al. miRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. **Mol Cancer Res** 2011; [Epub ahead of print]

Licklider S. Jewish penile carcinoma. **J Urol** 1961; 86:98.

Lionetti M, Agnelli L, Mosca L, et al. Integrative high-resolution microarray analysis of human myeloma cell lines reveals deregulated miRNA expression associated with allelic imbalances and gene expression profiles. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:521-31.

Liu, Li G, Wei S, Niu J, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer** 2010a; 116:20, 4753-60.

Liu W, Zabirnyk O, Wang H, et al. miR-23b targets proline oxidase, a novel tumor suppressor protein in renal cancer. **Oncogene** 2010b; 29:4914-24.

Liu Y, Zuckier LS, Ghesani NV. Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. **Anticancer Res** 2010c; 30:369-74.

Liu Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis** 2006; 9:230-4.

Lont AP, Gallee MPW, Meinhardt W, van Tinteren H, Horenblas S. Penis conserving treatment for t1 and t2 penile carcinoma: clinical implications of a local recurrence. **J Urol** 2006; 176:575-80.

Lopes A, Bezerra A, Pinto CAL, et al. P53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **J Urol** 2002; 168:81-6.

Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, et al. Prognostic factors in carcinoma of penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996a; 156:1637-42.

Lopes A, Rossi BM, Fonseca FP, Morini S. Unreliability of modified inguinal lymphadenectomy for clinical staging of penile carcinoma. **Cancer** 1996b; 77:2099-2.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Câncer de pênis. **Ambito Hospitalar** 1994; 58:5-13.

Lu H, Buchan RJ, Cook SA. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. **Cardiovasc Res** 2010; 86(3):410-20

Lu L, Mei DF, Gu AG, et al. Exercise training normalizer altered calcium proteins turing development of heart failure. **J Applied Physiol** 2002; 92:1524-30.

Lund, E, Guttinger, S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. **Science** 2004; 303:95-8.

Lyng MB, Laenkholtm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. **BMC Cancer** 2008; 8:20.

Lytton J. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. **Biochem J** 2007; 406:365-82.

Mace LC, Palmer BM, Brown DA, et al. Influence of age and run training on cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange. **J Applied Physiol** 2003; 95:1994-2003.

Maden C, Sherman K, Beckmann A, et al. History of circumcision, medical conditions, sexual activity and risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85: 19-24.

Maddineni SB, Lau MM, Snagar VK. Identifying the needs of penile cancer sufferers: A systematic review of the quality of life, psychosexual and psychosocial literature in penile cancer. **BMC Urol** 2009; 9:8.

Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 39:81-6.

Martins A, Faria S, Cologna A, et al. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 167: 89-93.

McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. **BMC Mol Biol** 2007; 8:107.

Meijer RP, Boon TA, Van Venrooij GEPM, Wijburg CJ. Long-term follow-up after laser therapy for penile carcinoma. **Urology** 2007; 69:759-62.

Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. **FEBS Lett** 2010; [Epub ahead of print].

Meola N, Gennarino V, Banfi S. MicroRNAs and Genetic Diseases. **PathoGenetics** 2009; 2:7.

Micali G, Nasça MR, Innocenzi D, et al. Penile Cancer. **J Am Acad Dermatol** 2006; 54:369-91.

Michael M, O'Connor S, Van Holst PN, Young G, James R. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. **Mol Cancer Res** 2003; 1:882-91.

Minhas S, Manseck A, Watya S, Hegarty PK. Penile cancer--prevention and premalignant conditions. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S24-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa /2010 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Mirales-Guri C, Bruni L, Cubilla A, et al. HPV prevalence and type distribution in penile carcinoma. **J Clin Pathol** 2009; 62:870-8.

Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. **Lancet Oncol** 2004; 5:240-7.

Mohs FE, Snow SN, Larson PO. Mohs micrographic surgery for penile tumors. **Urol Clin North Am** 1992; 19:291-304.

Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. **Gynecol Oncol** 2007; 107(2 Suppl 1):S6-13.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques** 1998; 24:954-8.

Morse DL, Carroll D, Weberg L, et al. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-

time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Anal Biochem** 2005; 342:69-77.

Mosconi A, Roila F, Gatta G, et al. Cancer of the penis. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 53:165-77.

Mu P, Han YC, Betel D, Yao E. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. **Genes Dev** 2009; 23:2806-11.

Nguewa PA, Agorreta J, Blanco D, et al. Identification of Importin 8 (IPO8) as the most accurate reference gene for the clinicopathological analysis of lung specimens. **BMC Mol Biol** 2008; 9:103.

Nicoloso M, Sun H, Spizzo R, et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. **Cancer Res** 2010; 70:2789-98.

Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, et al. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. **J Urol** 2008; 180:1354-9.

Ouban A, Dellis J, Salup R, Morgan M. Immunohistochemical expression of MDM2 and P53 in penil verrucous carcinoma. **Ann Clin Lab Sci** 2003; 33:101-6.

Panda K, Nayak CR. Clinicopathological studies on cancer penis. **J Indian Med Assoc** 1980; 75:25-8.

Pandey D, Mahajan V, Kannan RR. Prognostic factors in node-positive carcinoma of the penis. **J Surg Oncol** 2006; 93:133-8.

Pandey DP, Picard D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor α mRNA. **Mol Cel Biol** 2009; 3783-90.

Pelletier C, Weidhaas JB. MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers of cancer risk. **Expert Rev Mol Diagnostics** 2010; 6:817-29.

Peng S, Kuang Z, Sheng C, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. **Dig Dis Sci** 2010; 55: 2288–2293.

Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. **Cancer Res** 2008; 68:8191-4.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pietsch E, Humbey O, Murphy M. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene** 2006; 25:1602-11.

Pillai R, Bhattacharyya SN, Artus CG, et al. Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. **Science** 2005; 309:1573-6.

Poetsch M, Schuart BJ, Schwesinger G, Kleist B, Protzel C. Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas. **Mod Pathol** 2007; 20:1069-77.

Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, et al. Identification of the miR-106bB25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. **Sci Signal** 2010; 3: ra29

Pompeo ACL, Koff W, Damião R, et al. **Carcinoma do pênis - Parte II**. Projeto Diretrizes – Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2006. p.1-9. Disponível em: <URL:http://www.projetodiretrizes.org.br/6_volume/13_CarcinomaPenis_ParteII.pdf> [20 05 2010].

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnol** 2003; 3:18.

Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S2-6.

Protzel C, Kakies C, Kleist B, et al. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. **Virchows Arch** 2008; 452:369-75.

Puras A, Gonzales-Flores B, Rodrigues R. Treatment of carcinoma of the penis. **Proc Kimbrough Urol Semin** 1978; 12:143-52.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science** 2001; 294:853-8.

Raju GC, Naraynsingh V, Venu PS. Carcinoma of the penis in the West Indies: a trinidad study. **Trop Geogr Med** 1985; 37:334-6.

Raveche E, Salerno E, Scaglione B. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. **Blood** 2007; 109:5079-86.

Ravi R. Morbidity following groin dissection for penile carcinoma. **Br J Urol** 1993; 72:941-5.

Ratner E, Lu L, Boeke M, et al. A KRAS-variant in ovarian cancer acts as a genetic marker of cancer risk. **Cancer Res** 2010; 70:6509-15.

Romanowski T, Sikorska K, Bielawski KP. GUS and PMM1 as suitable reference genes for gene expression analysis in the liver tissue of patients with chronic hepatitis. **Med Sci Monit** 2008;14:BR147-52.

Rubin M, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **Am J Pathol** 2001; 159:1211-8.

Ryan B., Robles A., Harris C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:523.

Rzeski W, Turski L, Ikonomidou C. Glutamate antagonists limit tumor growth. **Proc Natl Acad Sci** 2001; 98:6372-7.

Saeed S, Connie A, Khalil F, et al. Immunohistochemical Expression of Bax and Bcl-2 in Penile Carcinoma. **Ann Clin Lab Sci** 2005; 35:91-6.

Salvioni R, Necchi A, Piva L, Colecchia M, Nicolai N. Penile cancer. **Urol Oncol** 2009; 27:677-85.

Schellhammer P, Jordan G, Robey E. Premalignant lesions and nonsquamous malignancy of the penis and carcinoma of the scrotum. **Urol Clin North Am** 1992; 19:131-42.

[SEER] Surveillance Research Program of the National Cancer Institute. **Cancer statistics review 1975-2007**. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/index.html> [2011 mar 12]

Shabad AL. Some aspects of etiology and prevention of penile cancer. **J Urol** 1964; 92:696-702.

Shen J, Ambrosone C, Dicioccio R. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. **Carcinogenesis** 2008; 29:1963-6.

Shen J, Ambrosone C, Zhao H. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. **Int J Cancer** 2009; 124:1178-82.

Shen J, DiCioccio R, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. Novel genetic variants in miR-191 gene and familial ovarian cancer. **BMC Cancer** 2010; 10:47.

Shi L, Campbell G, Jones, WD. The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. **Nat Biotechnol** 2010; 28: 827-838.

Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. **Nat Biotechnol** 2006; 24:1151-61.

Shono Y, Kamouchi M, Kitazono T. Change in intracellular pH causes the toxic Ca²⁺ entry via NCX1 in neuron- and glia-derived cells. **Cell Mol Neurobiol** 2010; 30:453-60.

Shukla S, Bharti A, Mahata S. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **Indian J Med Res** 2009; 130:222-33.

Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. **J Urol** 2001; 165:1138-42.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metaloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Sobel H, Plaut A. The assimilation of cholesterol by Mycobacterium smegmatis. **J Bact** 1949; 57:377-82.

Sobin LH, Wittekind C. **TNM classificação de tumors malignos**. 6th ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Pênis; p.187-9.

Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009. Penis; p.239-42.

Solsona E, Algaba F, Horenblas S, Pizzocaro G, Windahl T; European Association of Urology. EAU Guidelines on penile cancer. **Eur Urol** 2004; 46:1-8.

Sonkoly E, Pivarcsi A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. **J Cell Mol Med** 2009; 13:24-38.

Soufir N, Queille S, Libouet M, et al. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour supressors genes in external genital carcinomas and their precursors. **Br J Dermatol** 2007; 156:448-53.

Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature** 1998; 393:229-34.

Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. **Nature** 2009; 460:529-33.

Sweet R, Paul A, Zastre J. Hypoxia induced upregulation and function of the thiamine transporter, SLC19A3 in a breast cancer cell line. **Cancer Biol Ther** 2010; 10:1101-11.

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, et al.Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. **J Pharmacol Exp Ther** 2002; 302, 666-71.

Tewari M, Kumar M, Shukla HS. Nd: YAG laser treatment of early stage carcinoma of the penis preserves form and function of penis. **Asian J Surg** 2007; 30:126-30.

Tian T, Shu Y, Chen J, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:1183-7.

Tornesello M, Duraturo M, Guida V, et al. Analysis of TP53 codon 72 polymorphism in HPV-positive and HPV-negative penile carcinoma. **Cancer Letters** 2008; 269:159-64.

Tsen H, Morgenstern H, Mack T, et al. Risk factors for penile cancer: results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:267-77.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell** 1998; 93:705-16.

Urban T., Sebro R., Hurowitz E, et al. Functional genomics of membrane transporters in human populations. **Genome Res Feb** 2006;16:223-30.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 2002; 3:34.

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. **Hum Pathol** 1991; 22:908-13.

Velazquez EF, Ayala G, Liu H, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:974-9.

Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, et al. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:442-7.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103:2257-61.

Volinia S, Galasso M, Costinean S. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. **Genome Res** 2010; 20:589-99.

Wieland U, Jurk S, Weissenborn S, et al. Erythroplasia of Queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. **J Invest Dermatol** 2000; 115:396-401.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol** 2009; 11:228-34.

Wojtal KA. Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. **Drug Metab Dispos** 2009; 37:1871-7.

Wu Z, Yu Q. E2F1-mediated apoptosis as a target of cancer therapy. **Curr Mol Pharmacol** 2009; 2:149-60.

Xiong J. An estrogen receptor a suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor a-positive human breast cancer cell lines and clinical samples. **FEBS J** 2010; 277:1684-94

Xu B. A functional polymorphismin pre-miR-146a gene is associated with Prostate Cancer risk and mature miR-146a expression invivo. **Prostate** 2010; 70:467-72.

Xu J. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in Patients With Hepatocellular Carcinoma or Chronic Hepatitis. **Molecular Carcinogenesis** 2011; 50:136-42.

Yanagawa N, Osakabe M, Hayashi M, et al. Detection of HPV-DNA, p53 alterations, and methylation in penile squamous cell carcinoma in Japanese men. **Pathol Int** 2008; 58:477-82.

Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. **Cancer Res** 2008; 68:2530-7.

Yi R, Pasolli HA, Landthaler M, et al. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106: 498–502.

Yi R, Qin Y, Macara I, Cullen B. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev** 2003; 17: 3011-6.

Zamora M, Merono C, Vinas O, Mampel T. Recruitment of NF-kappaB into mitochondria is involved in adenine nucleotide translocase 1 (ANT1)-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2004; 279:38415-23.

Zarrilli R, Oates EL, McBride OW, et al. Sequence and chromosomal assignment of a novel cDNA identified by immunoscreening of a thyroid expression library: similarity to a family of mitochondrial solute carrier proteins. **Mol Endocrinol** 1989; 3:1498-505.

Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. **BMC Cancer** 2008 Mar 28;8:83.

Zhang, Yang Y, Yang T, et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity. **Br J Cancer** 2010; 103, 1215-20

Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. **Biochim Biophys Acta** 2011. [Epub ahead of print]

Zhu Y, Zhou X, Yao X, et al. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. **BJU Int** 2007; 100:204-8.

Zhur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology** 2009; 384:260-5.

Anexo 1 - Valores da relação de absorbância 260/280, 260/230, integridade do RNA e valores de RIN detectados pelo Bioanalyzer das amostras estudadas.

Amostra	R 260/280	R 260/230	Integridade do RNA	RIN Bioanalyzer
PE1T	2.08	2.20	-	-
PE2T	2.06	2.18	-	-
PE3T	2.03	2.26	-	-
PE4T	2.06	2.24	-	-
PE5T	2.04	2.22	-	-
PE6T	2.07	2.21	-	-
PE8T	2.07	2.23	-	-
PE10T	2.07	2.24	-	-
PE11T	2.07	2.19	-	-
PE12T	2.07	2.22	-	-
PE15T	2.06	2.21	-	-
PE16T	2.08	2.26	-	-
PE17T	2.10	2.21	-	-
PE18T	2.07	2.25	-	-
PE19T	2.03	2.12	-	-
PE21T	2.08	2.24	-	-
PE22T	2.07	2.23	-	-
1388	1,95	2,22	-	-
1389	1,96	2,21	-	-
1391	1.96	2.03	-	-
1392	1.94	1.93	-	-
1394	2.00	2.02	-	-
PE23T	2.08	2.24	-	-
PA17T	1.82	1.83	-	-
PA20T	1.87	2.28	-	-
PE24T	1,85	1,88	-	-
PE26T	1,81	2,36	-	-
1409	1.94	2.13	-	-

Cont/ Anexo 1

PA1T	2.22	1.95	Bom (1:1)	5.00
PA5T	2.26	1.96	Ótimo (2:1)	6.50
PA6T	2.17	2.00	Ótimo (2:1)	6.60
PA7T	2.258	1.99	Bom (1:1)	5.70
PA10T	2.01	2.10	Ótimo (2:1)	7.00
PA11T	2.21	1.98	Ótimo (2:1)	6.30
PA12T	2.17	2.00	Ótimo (2:1)	6.30
PA13T	2.19	2.01	Bom (1:1)	5.40
PA19T	2.12	2.02	Ótimo (2:1)	8.40
PA14T	2.07	1.82	Ótimo (2:1)	4.9
PA22T	2.04	1.60	Ótimo (2:1)	7.30

28 amostras foram analisadas pelo Nanodrop e 11 amostras foram analisados no Bioanalyzer. RIN = número de integridade do RNA.

Anexo 2 - Tabela de valores de expressão relativa normalizada dos RNAm e microRNA estudados.

Amostra	Tecido	Grupo	SLC1A3	SLC8A1	SLC25A4	SLC25A16	SLC25A25	SLC27A4	miR-22	miR-223	miR-23b	miR-26b	miR-27b	miR-133b
PE1T	CaPe	Técnico	0.950	0.449	0.886	0.924	0.096	2.331	-	-	-	-	-	-
PE2T	CaPe	Técnico	2.005	0.431	0.184	1.480	0.466	7.223	1.134	1.543	0.833	0.409	0.480	0.136
PE3T	CaPe	Técnico	10.067	0.452	4.909	1.608	0.297	1.684	-	-	-	-	-	-
PE4T	CaPe	Técnico	1.489	0.294	0.366	0.640	0.128	2.591	1.680	6.063	1.559	0.702	0.982	0.081
PE5T	CaPe	Técnico	1.466	0.535	0.200	2.459	0.061	3.252	-	-	-	-	-	-
PE6T	CaPe	Técnico	3.872	0.140	0.505	1.074	0.128	8.633	12.270	61.231	1.128	0.987	0.539	0.223
PE8T	CaPe	Técnico	1.319	0.141	0.387	1.326	0.225	6.696	0.954	3.378	0.607	0.481	0.590	0.016
PE10T	CaPe	Técnico	1.836	0.213	0.840	1.197	0.095	5.482	-	-	-	-	-	-
PE11T	CaPe	Técnico	2.215	0.145	2.947	2.088	0.352	13.664	-	-	-	-	-	-
PE12T	CaPe	Técnico	3.341	0.191	2.063	1.109	0.205	4.458	-	-	-	-	-	-
PE15T	CaPe	Técnico	2.970	0.445	0.206	0.970	0.097	2.149	0.401	4.680	0.485	0.461	0.364	0.015
PE16T	CaPe	Técnico	0.631	0.234	0.112	0.667	0.068	2.911	3.117	13.030	0.940	0.832	1.248	0.065
PE17T	CaPe	Técnico	5.893	0.741	2.490	1.423	0.266	3.645	0.788	1.130	0.374	0.153	0.257	0.059
PE18T	CaPe	Técnico	0.506	0.301	0.033	0.421	0.055	1.156	0.845	7.566	0.665	0.595	0.367	0.143
PE19T	CaPe	Técnico	3.049	0.757	0.638	1.453	0.287	2.781	0.703	4.142	0.410	0.851	0.293	0.025
PE21T	CaPe	Técnico	1.488	0.073	1.864	0.976	0.139	5.547	-	-	-	-	-	-
PE22T	CaPe	Técnico	3.013	0.105	1.621	1.247	0.328	3.261	-	-	-	-	-	-
1388	CaPe	Técnico	4.503	1.437	4.914	2.739	0.478	12.556	-	-	-	-	-	-
1389	CaPe	Técnico	2.143	0.675	2.986	1.428	0.553	14.039	-	-	-	-	-	-
PA1T	CaPe	Técnico	4.387	2.180	2.544	1.262	0.640	1.204	1.832	15.644	1.050	0.396	0.243	0.871
PA5T	CaPe	Técnico	1.473	0.231	2.297	1.598	0.800	4.416	0.512	2.406	0.182	0.161	0.071	0.007

Cont/ Anexo 2

Amostra	Tecido	Grupo	SLC1A3	SLC8A1	SLC25A4	SLC25A16	SLC25A25	SLC27A4	miR-22	miR-223	miR-23b	miR-26b	miR-27b	miR-133b
PA6T	CaPe	Técnico	2.207	0.387	0.258	0.563	0.223	5.201	0.658	11.260	0.324	0.155	0.136	0.005
PA7T	CaPe	Técnico	9.217	0.760	1.984	1.724	0.453	3.865	2.558	0.925	1.289	0.222	0.428	0.165
PA10T	CaPe	Técnico	2.803	0.320	0.276	2.180	0.705	12.225	0.764	1.983	0.273	0.210	0.137	0.021
PA11T	CaPe	Técnico	3.128	0.250	2.157	1.030	0.523	9.841	0.570	9.873	0.325	0.264	0.151	0.007
PA12T	CaPe	Técnico	2.415	0.266	0.511	1.047	0.381	3.218	0.434	3.761	0.513	0.291	0.160	0.030
PA13T	CaPe	Técnico	0.783	0.149	0.819	0.853	0.113	1.103	0.912	3.692	0.351	0.232	0.145	0.077
PA19T	CaPe	Técnico	2.625	0.459	3.221	0.773	0.171	1.940	0.374	3.118	0.104	0.360	0.047	0.006
1391	controle	Técnico	0.625	0.941	1.165	1.749	0.645	0.863	0.403	0.621	0.607	0.921	0.416	0.271
1392	controle	Técnico	0.090	1.059	2.711	0.988	1.270	0.618	1.990	0.990	2.212	0.950	0.889	2.178
1394	controle	Técnico	1.375	1.141	0.764	0.461	0.730	1.137	1.121	1.316	1.191	1.142	1.343	1.271
PE23T	CaPe	Biológico	0.345	0.170	0.224	1.219	0.186	5.946	-	-	-	-	-	-
PA17T	CaPe	Biológico	5.804	0.121	2.588	1.156	0.191	4.073	-	-	-	-	-	-
PA14T	CaPe	Biológico	3.375	2.539	1.161	4.911	0.456	2.937	-	-	-	-	-	-
PA20T	CaPe	Biológico	9.198	0.661	3.145	0.860	0.405	3.944	0.655	1.257	0.221	0.100	0.042	0.025
PA22T	CaPe	Biológico	7.171	0.355	0.893	1.619	0.550	6.286	-	-	-	-	-	-
PE24T	CaPe	Biológico	2.675	0.165	0.825	1.168	0.169	3.755	0.445	1.814	0.705	0.215	0.489	0.010
PE26T	CaPe	Biológico	1.555	0.372	0.766	1.576	0.287	2.180	0.604	1.501	0.283	0.156	0.093	0.010
1409	controle	Biológico	3.086	0.460	0.835	1.012	12.805	2.806	1.127	1.197	1.205	0.462	1.094	0.821