

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA MOLINARI ROBERTO

Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma

Ribeirão Preto – SP

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA MOLINARI ROBERTO

Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Orientador: María Sol Brassesco Annichini

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Roberto, Gabriela Molinari

Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma. Ribeirão Preto, 2017.

63 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

Orientador: Brassesco, María Sol.

1. miR-10b. 2. HOXD10. 3. Osteossarcoma. 4. Metástase.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2015/00524-5 e processo nº 2014/03877-3);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FAEPA;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Gabriela Molinari Roberto

Título: Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais por todo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus* por sua presença constante, sempre me iluminando nos momentos de indecisão e desânimo.

À minha orientadora *Profª Dra María Sol Brassesco Annichini*, grande responsável por todo meu crescimento profissional desde a iniciação científica. Obrigada por sempre me incentivar a fazer mais e acreditar no meu potencial.

Ao *Profº Dr Luiz Gonzaga Tone* pela oportunidade de participar da sua equipe provendo da infraestrutura para o desenvolvimento dos meus projetos.

Ao *Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo*, pelo apoio prestado ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, onde realizei grande parte dos meus experimentos.

À *Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)* e ao *Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)* pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro.

À *Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FAEPA* pelo apoio financeiro;

Ao serviço de *Ortopedia Oncológica HC-FMRP* do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP, por auxiliar na coleta das amostras tumorais aqui analisadas.

Aos Prof. Dr. *Carlos Alberto Scridelli* e Prof. Dr. *Edgard Engel* por toda ajuda e discussões científicas.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria *Sônia Scandusi* e *Lucimar Fernandes* pelo apoio e convivência.

Às técnicas, *Rosane de Paula Gomes Queiroz*, *Veridiana Kill Suazo* e *Beth Perna* por toda ajuda e paciência durante os experimentos e pelas risadas dentro da salinha da molecular.

As minhas companheiras de dentro e fora do lab., *Lara*, *Lenisa*, *Marcela*, *Pamela*, *Mari*, *Gabi V* e *Karina*, pela amizade e paciência nas minhas crises existenciais. Muito obrigada por encherem de risadas e boas lembranças esses anos do mestrado!

Aos meus amigos do laboratório *Mirella*, *Taci*, *Verena*, *Carol*, *Grazi*, *Kethy*, *Vanessa*, *Augusto*, *Rodrigo*, *Paulo*, *Camilla* e *Silvia* pela amizade e por todo conhecimento compartilhado. Em especial a *Régia*

e *Gustavo*, pelo incentivo e ajuda na reta final dos meus experimentos!

Aos meus queridos pais, *Eliana* e *Giuseppe* que sempre me incentivaram nas minhas decisões e suportarem meus momentos de incerteza com muito amor e paciência. E as minhas irmãs *Daniela*, *Laera Giulia* e *Luiza* por sempre estarem do meu lado.

Aos meus amigos de coração *Thairine*, *Anne*, *Lucas*, *Leonardo* e *Felipe* pela amizade de sempre e apoio nos momentos difíceis. Obrigada por se divertirem com minhas indecisões e acreditarem que no final tudo dará certo.

A minha avó *Laura* e do meu nono *Domenico* por serem a alegria da minha casa e a minha melhor torcida e a todos os meus familiares por todo incentivo e amor.

A todos que de algum modo me apoiaram e contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

ROBERTO, G. M. “Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma”. 2017, 63f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O Osteossarcoma (OS) é o tumor ósseo pediátrico mais comum. O tratamento atual consiste em remoção cirúrgica e quimioterapia multimodal neo- e adjuvante. No entanto, um terço dos pacientes são acometidos por recorrência pós-cirúrgica e metástases distantes sendo que apenas 20% daqueles com metástase sobrevivem após 5 anos. Diversos miRNAs vêm sendo apontados como metastamiRs, dentre eles o miR-10b. Este microRNA encontra-se hiperexpresso em uma série de tumores e associado a pior prognóstico. Estudos prévios têm demonstrado que o miR-10b atua nos processos invasivos principalmente pareando-se de forma incompleta com o RNA mensageiro do gene *HOXD10* e assim inibindo a sua tradução. Este fator de transcrição, assim como todos os membros da família dos genes *HOX*, exerce sua função ativando e reprimindo genes vitais para os processos de crescimento e diferenciação celular (inclusive durante o desenvolvimento do tecido ósseo), sendo também descrito como desregulado em diversos tumores. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência do miR-10b no OS e sua associação com o gene *HOXD10* em relação aos processos de proliferação, invasão e migração celular. Para tanto, foi avaliada a expressão de ambos em amostras tumorais, bem como os efeitos da modulação da expressão de miR-10b na capacidade proliferativa e invasiva de linhagens celulares de OS. Nossos resultados mostraram uma associação inversa entre os níveis de expressão do miR-10b e o grau de malignidade. O aumento de miR-10b *in vitro* levou a supressão da capacidade clonogênica e à redução dos processos de adesão, migração e invasão, sugerindo um papel de supressor tumoral em OS. Não foi encontrada correlação entre a expressão gênica do miR-10b e a do *HOXD10*, e ainda o aumento deste microRNA não alterou a expressão proteica do fator de transcrição. Sendo assim, o mecanismo pelo qual miR-10b contribui para a agressividade do OS permanece indefinido, mas parece ser independente de *HOXD10*. Paralelamente, a expressão do gene *KLF4* (recentemente descrito como alvo direto de miR-10b) e de genes sabidamente associados à invasão (*MMP2* e *ROCK1*) e proliferação (*TP53* e *BCL2*) tampouco foi afetada após transfecção. Por outro lado, apesar de não ter sido confirmado como alvo de miR-10b no nosso estudo, *HOXD10* foi encontrado significativamente hiperexpresso nas amostras de OS. Assim, considerando a importância da desregulação de vias de desenvolvimento no surgimento de tumores pediátricos e a participação do *HOXD10* no desenvolvimento ósseo, o seu papel como oncogene e seu potencial como alvo terapêutico neste tipo tumoral merecem estudos posteriores

Palavras-chave: miR-10b; *HOXD10*; Osteossarcoma; Metástase

ABSTRACT

ROBERTO, G. M. **“Influence of miR-10b on proliferation and the invasive potential of osteosarcoma”**. 2017, 63f. Master’s degree dissertation - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Osteosarcoma (OS) is the most common pediatric bone tumor. The current treatment consists of surgical removal and neo- and adjuvant multimodal chemotherapy. However, one-third of patients are affected by post-surgical recurrence and distant metastases, with only 20% of metastatic cases surviving after 5 years. Several miRNAs have been designated as metastamiRs, among them miR-10b. This microRNA is overexpressed in a series of tumors and associated with poor prognosis. Previous studies have shown that miR-10b acts on invasive processes mainly by pairing with the messenger RNA of the HOXD10 and thereby inhibiting its translation. This transcription factor, like all members of the HOX family, exerts its function by activating and/or repressing vital genes for cell growth and differentiation (even during the development of bone tissue) and is also described as deregulated in several tumors. In view of this, the aim of this work was to study the influence of miR-10b on OS and its association with the HOXD10 in relation to proliferation, invasion and cell migration. For this, the expression of both genes in tumor samples, as well as the effects of miR-10b expression modulation on the proliferative and invasive capacity of OS cell lines, were evaluated. Our results showed an inverse association between miR-10b expression levels and the degree of malignancy. The increase of miR-10b *in vitro* led to the suppression of clonogenic capacity and reduction of adhesion, migration and invasion, suggesting a role as a tumor suppressor in OS. No correlation was found between gene expression of miR-10b and *HOXD10*, while the increase of the microRNA did not alter the protein expression of the transcription factor. Thus, the mechanism by which miR-10b could contribute to OS aggressiveness remains undefined, though it appears to be independent of HOXD10. In parallel, the expression of *KLF4* (recently described as a direct miR-10b target) and of genes known to be associated with invasion (*MMP2* and *ROCK1*) and proliferation (*TP53* and *BCL2*) was not affected after transfection. On the other hand, although HOXD10 was not confirmed as a miR-10b target in our study, this gene was found to be significantly overexpressed in the OS samples. Thus, considering the importance of the deregulation of developmental pathways on pediatric tumors and *HOXD10* contribution on bone development, its role as an oncogene and its potential as a therapeutic target in this tumor type deserves further studies.

Keywords: miR-10b; HOXD10; Osteosarcoma; Metastasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão relativa do miR-10b em amostras de tecido ósseo não neoplásico, amostras tumorais e em linhagens celulares de OS.....	33
Figura 2. Expressão relativa do miR-10b em amostras tumorais pré-QT e pós-QT de OS.....	34
Figura 3. Expressão relativa do <i>HOXD10</i> em amostras de tecido ósseo não neoplásico, amostras tumorais e em linhagens celulares de OS.....	34
Figura 4. Expressão relativa do <i>HOXD10</i> em amostras de acordo ao status de tratamento.....	35
Figura 5. Análise da expressão de <i>HOXD10</i> em relação à expressão de miR-10b nas amostras de OS.....	35
Figura 6. A expressão de miR-10b está relacionada com o grau de malignidade em OS.....	36
Figura 7. Expressão de miR-10b e <i>HOXD10</i> não apresentou relação com a sobrevida global ou livre de eventos em pacientes com OS.....	37
Figura 8. Aumento de miR-10b nas linhagens de OS, 48h após a transfecção com mimetizadores específicos (Ambion®).....	38
Figura 9. Aumento de miR-10b levou a redução na capacidade clonogênica de linhagens de OS.....	38
Figura 10. Aumento de miR-10b afetou ligeiramente a capacidade de adesão de células de OS.....	39
Figura 11. Aumento do miR-10b reduziu a capacidade migratória avaliada pelo ensaio de wound healing em todas as linhagens de OS (A). Aumento de miR-10b afetou migração de células de forma distinta entre as linhagens em resposta a quimioatraentes mensuradas em ensaio na câmara de Boyden (B).....	40
Figura 12. Aumento de miR-10b levou a redução na capacidade invasiva de linhagens de OS.....	40
Figura 13. Aumento de miR-10b resultou em diminuição significativa na expressão gênica de <i>HOXD10</i> na linhagem HOS (A), porém não alterou sua expressão protéica em todas as linhagens (B).....	41
Figura 14. Aumento de miR-10b não alterou de forma significativa a expressão de genes relacionados a proliferação e invasão na linhagem SAOS-2 (A) e de <i>KLF4</i> nas três linhagens avaliadas (B).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Análise da associação clínica da expressão do miR-10b e <i>HOXD10</i> com características clínicas em pacientes com OS.....	36
---	----

LISTA DE SIGLAS

5-FU	Quimioterápico Fluorouracil
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2L11	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BGLAP	Osteocalcina (ou <i>bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein</i>)
BSA	Albumina sérica bovina
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CADM1	<i>Cell adhesion molecule 1</i>
CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GTPases	Guanosina trifosfatases
GUS	<i>β-Glucuronidase</i>
HAM-F10	Solução nutritiva para o cultivo celular
HC	Hospital das Clínicas
HOS	Linhagem celular de Osteossarcoma
HOX	<i>Homeobox</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
McCoy's	Solução nutritiva para o cultivo celular
MEC	Matriz extracelular
MG63	Linhagem celular de Osteossarcoma
miRNA	microRNA
MMP	Matriz metaloproteinase
MRC-5	Linhagem celular de fibroblasto normal
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MT1-MMP	<i>Membrane type 1-matrix metalloproteinase</i>
ncRNA	RNA não codificante
OS	Osteossarcoma
PBS	Tampão salina fosfato
PDGFB	Fator de crescimento beta polipeptídico derivado de plaqueta.
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PTHLH	Hormônio de paratireiíde
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RhoA/C	<i>Ras homolog family member A/C</i>
RIPA	Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
RISC	Complexo de indução do silenciamento do RNA

RNA	Ácido ribonucléico
<i>ROCK1</i>	<i>Rho-associated coiled-coil protein kinase 1</i>
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real
SAOS-2	Linhagem celular de Osteossarcoma
SBF	Soro bovino fetal
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STR	Short Tandem Repeat DNA profiling
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline - Tween</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
uPa	<i>Plasminogen activator urokinase</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

cm ²	Centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
h	Horas
mg	Miligrama
ug	Micrograma
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.1. Objetivos Específicos.....	25
3. Materiais e Métodos.....	26
3.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura	27
3.2. Amostras de pacientes.....	27
3.3. Extração de RNA e RT-qPCR.....	28
3.4. Transfecção com pré-miR-10b para ensaios <i>in vitro</i>	29
3.5. Ensaio clonogênico.....	29
3.6. Ensaio de migração por <i>wound healing</i>	29
3.7. Ensaio de Invasão em matrigel.....	30
3.8. Ensaio de migração por quimioatraentes.....	30
3.9. Ensaio de adesão celular.....	30
3.10. Extração de proteínas e <i>Western Blot</i>	31
3.11. Análise Estatística.....	31
4. Resultados.....	32
4.1. Dinâmica de expressão do miR-10b.....	33
4.2. Dinâmica de expressão do <i>HOXD10</i>	34
4.3. Estudo de correlação entre miR-10b e <i>HOXD10</i>	35
4.4. Associação entre níveis de expressão de miR-10b e <i>HOXD10</i> e características clínicas dos pacientes.....	35
4.5. Efeito <i>in vitro</i> da modulação de miR-10b em OS.....	37
4.6. Aumento nos níveis de miR-10b interfere na capacidade clonogênica <i>in vitro</i> ..	38
4.7. Aumento de miR-10b afeta ligeiramente a capacidade de adesão de células de OS.....	38
4.8. Aumento do miR-10b afeta a capacidade migratória em OS.....	39
4.9. Aumento nos níveis de miR-10b leva a redução na capacidade invasiva de células de OS.....	40
4.10. Aumento do miR-10b não afeta os níveis de expressão de <i>HOXD10</i>	40
4.11. Aumento do miR-10b não afeta os níveis de expressão de genes relacionados a proliferação e invasão.....	41
5. Discussão.....	42
6. Conclusões.....	49
6.1. Conclusão Geral.....	50
6.2. Conclusões Pontuais.....	50
7. Referências Bibliográficas.....	51
8. Apêndices.....	59
8.1. Apêndice A : Perfis de STR apresentados pela ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>) e encontrados na análise das linhagens utilizadas no presente trabalho.....	60
8.2. Apêndice B. Dados clínicos referentes as amostras de Osteossarcoma utilizadas no estudo da expressão de miR-10b e <i>HOXD10</i>	61

9. Anexos.....	62
9.1. Anexo A. Aprovação do comite de ética para desenvolvimento da pesquisa.....	63

Introdução

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, o osteossarcoma (OS) é considerado o tumor ósseo mais frequente em crianças e adolescentes (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2005). Ele representa 0,2% dos tumores malignos (PICCI, 2007) e ocupa a oitava posição entre os cânceres pediátricos (cerca de 2,4%) (OTTAVIANI & JAFFE, 2009). A taxa de incidência estimada é de 4 casos a cada um milhão de pessoas por ano (MIRABELLO et al., 2009a) e 75% dos casos diagnosticados acontecem em pacientes entre 15 e 25 anos de idade, sendo o pico de incidência geralmente aos 16 anos (PICCI, 2007), entretanto a doença apresenta outro pico de incidência, ainda que menor, em pacientes acima de 60 anos (MIRABELLO et al., 2009b).

Este tumor é caracterizado por proliferação de células tumorais de origem mesenquimal e formação anômala de substância osteóide e matriz mineralizada (MARINA et al., 2004). Na maioria dos casos, representa um tumor grande, maior que 5 cm, de crescimento radial, geralmente penetrando no córtex, associando-se com tecido mole e pressionando o tecido muscular ao redor (FLETCHER et al., 2002).

O OS pode ocorrer em qualquer tecido ósseo, porém é frequentemente encontrado nas metáfises do fêmur distal e da tíbia e do úmero proximal, ocorrendo em 50% dos casos na região do joelho (BIELACK et al., 2002). A localização do tumor assim como o seu pico de incidência, parece estar associada respectivamente, com regiões e período de crescimento ósseo rápido observados durante a puberdade (MARINA et al., 2004; GILL et al., 2013) porém essa associação ainda carece de confirmação.

Do ponto de vista histológico, a Organização Mundial da Saúde divide o OS convencional/central primário em três subtipos de acordo com o a presença e o tipo de matriz predominante no tumor. Estes subtipos são chamados Osteoblástico, representando o tipo mais comum que corresponde a cerca de 70% dos OS; Condroblástico e Fibroblástico (MARINA et al., 2004; HAYDEN & HOANG, 2006). Além desses, se tem ainda os subgrupos menos comuns, incluindo o OS secundário, pós-irradiação, multifocal, paraosteal e periosteal (BRIDGE et al., 1997).

O OS se caracteriza geneticamente como um tumor heterogêneo e com alta instabilidade cromossômica de forma que, em cerca 70% dos tumores, são encontradas anormalidades envolvendo ganhos, perdas ou rearranjos de cromossomos (FLETCHER et al., 2002; GORLICK & KHANNA, 2010). No entanto, diferentemente da maioria dos tumores pediátricos, cujo surgimento tem relação com alterações nas vias de desenvolvimento embrionário (como WNT/ β -catenina, TGF- β (*Transforming Growth Factor*), Sonic-Hedgehog, entre outras), os fatores responsáveis pelo surgimento do OS permanecem ainda desconhecidos, com apenas poucas associações estabelecidas relacionadas a mutações de genes reguladores do ciclo celular. Estudos mostram que pacientes com mutações nos supressores tumorais

TP53 (Síndrome do Li-Fraumeni) e *Rb* (Retinoblastoma) apresentam predisposição ao desenvolvimento de OS (HAYDEN & HOAGAN, 2006).

O tratamento atual estabelecido envolve quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante), remoção cirúrgica do tumor e quimioterapia pós-operatória (adjuvante) (BIELACK et al., 2002; HAYDEN & HOANG, 2006). As sessões quimioterápicas são multimodais com a administração de metotrexato, doxorubicina, cisplatina e mais recentemente, foram adicionados etoposídeo e ifosfamida na combinação (GILL et al., 2013). Em casos de OS localizados, as estratégias de tratamento quimioterápico permitiram um aumento da sobrevida livre de eventos após dois anos para aproximadamente 66%, bem maior que os 17% encontrados em pacientes submetidos apenas ao processo cirúrgico (GELLER & GORLICK, 2010).

Contudo, aproximadamente 20% dos pacientes com OS já apresentam metástases detectáveis no momento do diagnóstico (BIELACK et al., 2002), enquanto um terço daqueles com tumores localizados e submetidos ao tratamento posteriormente experimentam episódios de recorrência local e metástase nos pulmões e em ossos distantes (LIU et al., 2011). Sendo assim, atualmente o grande desafio no tratamento deste tumor são os casos metastáticos cuja chance de sobrevida dos pacientes após cinco anos permanece abaixo do 20% (GORLICK & KHANNA, 2010; BRENNECKE et al., 2013). Portanto, sendo os eventos de metástases, os grandes causadores dos altos índices de mortalidade, a elucidação das vias moleculares envolvidas nos processos invasivos e metastáticos deste tipo tumoral é de extrema importância.

O processo metastático em si envolve o desprendimento de células tumorais da massa primária, sua migração pelo tecido normal até atingir o sistema vascular e por fim seu estabelecimento em um local diferente daquele de origem culminando no surgimento de novos focos tumorais (CHAMBERS et al., 2002). Desta forma, a alteração na adesão celular, o remodelamento da matriz extracelular (MEC) e a dinâmica de controle da morfologia celular são muito importantes para os processos migratórios e invasivos (KUMAR et al., 2012).

Ao longo dos anos, o estudo desses eventos tem mostrado que sua regulação depende tanto de elementos genéticos quanto epigenéticos. Dentre as proteínas envolvidas na sinalização e na promoção de processos metastáticos podemos incluir moléculas relacionadas aos processos de adesão celular que participam da interação célula-célula e célula-matriz como integrinas e caderinas (CANEL et al., 2013); moléculas proteolíticas como as MMPs, responsáveis pela degradação da MEC (STAMENKOVIC, 2000); fatores envolvidos em processos angiogênicos como VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e interleucinas (DESAI et al., 2013); além de proteínas responsáveis pelo controle do citoesqueleto como ROCK1 e ROCK2 (*Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 e 2*) (MORGAN-FISHER et al., 2013).

Recentemente, em adição as alterações em genes codificadores de proteínas associadas a progressão tumoral, uma outra classe de genes responsáveis pela transcrição de pequenas moléculas de RNA reguladoras conhecidas por microRNAs (miRNAs) vem sendo relacionada ao processo de invasão e metástase (XIA & HU, 2010).

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes de aproximadamente 18 a 24 nucleotídeos que atuam como reguladores negativos pós-transcricionais, clivando ou impedindo a tradução de RNA mensageiros (RNAm) alvos através de sua associação com o complexo proteico RISC (Complexo de Indução do Silenciamento do RNA) (BARTEL, 2004). Eles estão localizados em regiões intergênicas ou intrônicas de DNA codificantes de proteínas e transcritos inicialmente pela RNA polimerase II ou III em um miRNA primário (pri-miRNA) em forma de grampo (*hairpin*). O pri-miRNA é clivado próximo a base do *looping* dentro do núcleo pela RNA endonuclease Drosha-DGCR8 na molécula do miRNA precursor (pre-miRNA) constituída de cerca de 70 pares de bases. Esta molécula é trasladada para o citoplasma através da exportina-5. Uma vez no citosol, o pre-miRNA é processado pela enzima Dicer que retira o *looping* resultando no miRNA-duplex. Uma das fitas deste miRNA-duplex é liberada constituindo assim o miRNA maduro e associa-se com o complexo RISC direcionando-o ao RNAm alvo e, assim, impedindo a sua tradução em proteína (MACFARLANE & MURPHY, 2010). Dentro do genoma humano, existem milhares de miRNAs que podem atuar sob centenas de RNAm; desta forma, este grupo de pequenos RNA não codificantes (ncRNA) são essenciais para uma série de processos biológicos incluindo diferenciação celular, proliferação e apoptose (KONG et al., 2012; ZHANG et al., 2007).

Expressões aberrantes de miRNAs vêm sendo intensamente relatadas na literatura em diversos tipos tumorais (LU et al., 2005). Inicialmente, um dos primeiros perfis de expressão de miRNAs identificou 29 miRNAs desregulados em tumores primários de mama quando comparados ao tecido normal adjacente (IORIO et al., 2005). Os miRNAs que apresentam expressão aumentada em tumores podem ser considerados como oncogenes, ou oncomirs, à medida que promovem o desenvolvimento tumoral através da inibição de genes supressores tumorais, por exemplo. De modo inverso, aqueles miRNAs encontrados hipoeexpressos em células tumorais são classificados como supressores tumorais, pois atuam regulando negativamente a expressão de oncogenes (ZHANG et al., 2007).

A primeira evidência de envolvimento de miRNAs com a progressão tumoral foram descritas por MA e colaboradores em 2007. Este grupo demonstrou que o miR-10b era responsável por iniciar a invasão e metástase em câncer de mama, categorizando-o como um metastamiR. Para tanto, os autores relataram que o miR-10b era encontrado significativamente hiperexpresso apenas em células de câncer metastático. Paralelamente, estudos envolvendo perda e ganho de função mostraram que o miR-10b regula

positivamente os processos de migração e invasão *in vitro* e atua iniciando processos invasivos e promovendo metástases distantes *in vivo* (MA et al., 2007). Ainda, o tratamento com antagomiR-10b em camundongos não levou a reduções no crescimento do tumor mamário mas diminuiu significativamente a formação de metástases pulmonares (MA et al., 2010).

Níveis elevados de expressão do miR-10b já foram associados a outros tipos tumorais com alto potencial invasivo e pior prognóstico como glioblastoma (GABRIELY et al., 2011; LIN et al., 2012), câncer de próstata (FENDLER et al., 2011); câncer de ovário (NAKAYAMA et al., 2013); carcinoma de tireóide folicular (JIKUZONO et al., 2013); carcinoma hepatocelular (LI et al., 2012., ZHU et al., 2016); câncer de pâncreas (NAKATA et al., 2011), câncer colorretal (JIANG et al., 2016; ABDELMAKSOU-DAMMAK et al., 2017) e carcinoma de nasofaringe (SUN et al., 2013).

O locus do miR-10b está localizado no cromossomo 2 dentro do *cluster* dos genes HOXD (*Homeobox D*), em uma região intergênica entre *HOXD4* e *HOXD8* (BIAGIONI et al., 2013). Um dos fatores que explicam a expressão deste miRNA em tumores metastáticos é a sua regulação pelo fator de transcrição Twist, conhecido regulador da transição epitélio-mesenquimal (TEM), processo importante para o desprendimento da célula invasora da massa tumoral primária. Este fator se liga às sequências *E-box* presentes na região promotora do miR-10b induzindo sua expressão (MA et al., 2007).

Dentre as formas de atuação do miR-10b, a mais citada refere-se a sua associação com os processos invasivos pareando-se de forma incompleta com o RNAm do gene *HOXD10* e assim inibindo a sua tradução (MA et al., 2007). Estudos apontam que o *HOXD10* funciona como um inibidor geral de invasão celular regulando negativamente genes que promovem invasão, migração e progressão tumoral como uPAR (*Urokinase plasminogen activator surface receptor*), MMP14 (*matrix metalloproteinases 14*), MT1-MMP (*membrane type 1-matrix metalloproteinase*) e MMP3 (*matrix metalloproteinases 3*), promotores do remodelamento da MEC (MA et al., 2007; MYERS et al., 2002; BIAGIONI et al., 2013; NAKAYAMA et al., 2013; LI et al., 2012); *CADM1* (*Cell adhesion molecule 1*), relacionado a adesão celular (LI et al., 2012) e as GTPases RhoA e RhoC (*Ras homolog family member A e C*), envolvidas no controle do citoesqueleto (MA et al., 2007; IBRAHIM et al., 2012).

O *HOXD10* pertence a grande família HOX, cujos membros são considerados importantes reguladores celulares, responsáveis pela modulação de diversos genes vitais que atuam nos processos de crescimento e diferenciação celular. Esses genes codificam fatores de transcrição envolvidos principalmente no desenvolvimento embrionário e são responsáveis por manter a pluripotência celular, determinar o destino da célula e promover sua diferenciação em organismos multicelulares de forma controlada (SEIFERT et al., 2015). Além disto, eles também são responsáveis por regular determinados

comportamentos celulares requeridos durante a morfogênese, como a migração (HOMBRIA et al., 2003). No câncer, primeiramente pensou-se que essas proteínas atuavam como fatores de transcrição promotores da carcinogênese uma vez que eram encontradas hiperexpressas nas células cancerosas desregulando diversas vias de sinalização. Entretanto, estudos subsequentes mostraram que os genes HOX podem atuar não somente como ativadores, mas também como repressores transcricionais no câncer. Assim, tanto o aumento quanto a diminuição na expressão de membros dessa família parecem ser críticos para a promoção do tumor (BHATLEKAR et al., 2014).

Estudos recentes sugerem ainda que a maioria dos genes HOX encontrados hiperregulados em um câncer em determinada região do corpo, normalmente são expressos durante o desenvolvimento do órgão afetado. Enquanto que aqueles genes que são normalmente expressos no órgão adulto, responsáveis por manter sua homeostase, encontram-se hipoexpressos no tumor (ABATE-SHEN, 2002).

Tratando-se do desenvolvimento do tecido ósseo, tipo histológico acometido pelo OS, a formação dos ossos longos ocorre por ossificação endocondral, um tipo de ossificação que envolve a formação de cartilagem que eventualmente é substituída por osso. Assim, em um primeiro momento as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos, cuja maturação é um processo organizado que compreende proliferação e hipertrofia inicialmente ocorrendo em um elemento central e expandindo-se para as extremidades, sendo essenciais para o crescimento longitudinal dos ossos (DE CROMBRUGGHE et al., 2001). Uma vez que os condrócitos entram na fase da hipertrofia, tem-se início da diferenciação do pericondrio em osteoblastos que produzem a MEC mineralizada e secretam fatores para a formação completa do tecido ósseo (KARSENTY et al., 2009).

Neste contexto, estudos de perda e ganho de função mostraram que genes dos clusters HOXA e HOXD são essenciais para a formação e desenvolvimento dos membros (ZAKANY & DUBOULE, 2007) e participam da ossificação endocondral. A expressão forçada destes genes afeta de forma severa a diferenciação da cartilagem (YOKOUCHI et al., 1995; GOFF & TABIN, 1997; MASSIP et al., 2007), enquanto sua ausência leva a um perturbação e atraso na ossificação (DAVIS & CAPECCHI, 1994; ZAKANY & DUBOULE, 1996; DAVIS & CAPECCHI, 1996; WELLIK & CAPECCHI, 2003; BOULET & CAPECCHI 2004; GROSS et al., 2013). Além disso, mostrou-se que a regeneração óssea também está associada a ativação de diversos genes HOXA e HOXD (GERSCH et al., 2005).

Ainda que os mecanismo pelos quais os produtos dos genes HOX desempenham suas funções na osteogênese não estejam completamente elucidados, VON HEYKING e colaboradores (2016) mostraram que em Sarcoma de Ewing, os genes HOXD aumentam os níveis de genes específicos de osteoblastos e osteoclastos como a osteocalcina (BGLAP) e o fator de crescimento beta polipeptídico derivado de plaqueta

(PDGFB), e ainda podem regular o desenvolvimento ósseo endocondral via indução do hormônio semelhante ao hormônio de paratireiíde (PTH_{LH}).

Em relação ao gene *HOXD10*, especificamente, alterações neste gene resultaram em defeitos na adução de membros e no caminhar de camundongos afetando os membros posteriores. Tais mutantes apresentaram alterações tanto no esqueleto axial como no apendicular, mas principalmente na região do joelho, o que é consistente com a alta expressão deste gene no desenvolvimento desta região (CARPENTER, 1997). Além disso, a microdeleção no cluster HOXD removendo os genes de HOXD9 a HOXD13 resultou em um fenótipo de simpodactilia (dedos suprenumerários e união destes entre si) (DLUGASZEWSKA et al., 2006).

Neste contexto, o presente trabalho visou a análise do perfil de expressão do miR-10b (consistentemente relacionado a uma variedade de tumores metastáticos) em OS, bem como o estudo de sua associação com o gene *HOXD10*, de modo a ampliar o conhecimentos sobre a regulação dos processos invasivos em busca de novas abordagens de combate à metástase, a principal causa de mortalidade em vários tipos tumorais incluindo o OS.

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o papel do miR-10b e sua associação com o gene *HOXD10* em relação aos processos de proliferação, invasão e migração celular em OS.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão do miR-10b e do seu alvo, o gene *HOXD10*, por RT-qPCR em amostras tumorais e linhagens celulares de OS;
- Analisar a associação entre os níveis de expressão de miR-10b e *HOXD10* encontrados nas amostras tumorais ao diagnóstico e a evolução clínica dos pacientes;
- Investigar as correlações entre a expressão gênica do miR-10b e do gene *HOXD10*.
- Verificar os efeitos da modulação do miR-10b em linhagens de OS em relação aos processos proliferativos, invasivos e migratórios;
- Avaliar níveis de expressão de *HOXD10* após modulação de miR-10b por Western Blot;

*Materiais e
Métodos*

3.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Para o presente estudo as linhagens celulares de osteossarcoma utilizadas foram HOS, MG63 (gentilmente cedidas por Jeremy Squire – Queen’s University– Canada/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP) e SAOS-2 (gentilmente cedida pelo Prof. Oswaldo Keith Okamoto do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo). Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de 75cm², incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Foi utilizado meio de cultivo apropriado a cada linhagem (HAM-F10 ou McCoy’s) complementados com 100mg/L de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SBF) (pH de 7,2-7,4). Prévio aos experimentos a autenticidade das linhagens celulares foi confirmada por FRLP (*fragment restriction length polymorphism*) no laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aginaldo Luiz Simões (Apêndice A).

3.2. Amostras de pacientes

As amostras de OS (n=41) e de tecido ósseo não neoplásico (n=12) foram coletadas pelo serviço de Ortopedia Oncológica do Hospital das Clínicas (HC) do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP. Imediatamente após a cirurgia, as amostras de tumor foram congeladas a -80°C e estocadas no Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CAAE 45567715.9.0000.5440) da FMRP-USP (Anexo A). Todas as amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento pelos pacientes ou seus responsáveis entre maio/2005 a setembro/2015 sendo a coleta de dados clínicos finalizada em junho de 2016.

Das amostras de OS, 25 eram pré-quimioterápicas (pré-QT) e 16 pós-quimioterápicas (pós-QT). Somente as amostras pré-QT foram utilizadas na busca de associações com a evolução clínica dos pacientes (Apêndice B). Dentre esse grupo, todas as amostras neoplásicas eram provenientes de pacientes com idades entre 10 e 26 anos, sendo a idade média de 15 anos, configurando assim um grupo de incidência infanto-juvenil. Dentre eles, 14 amostras eram provenientes de pacientes do sexo feminino (56%) enquanto 11 amostras eram provenientes de pacientes do sexo masculino (44%). As doze amostras de tecido ósseo não neoplásico utilizadas foram provenientes de pacientes com idades semelhantes às amostras neoplásicas coletadas, variando de 7 a 27 anos com média de 16 anos.

Nas análises das associações clínicas foram considerados os seguintes aspectos: grau de malignidade, ocorrência de metástase, óbito, presença de recidiva e resposta huvo. Esta última corresponde ao grau de necrose encontrado na peça tumoral após o tratamento neoadjuvante. Esta é

classificada em graus de I a IV sendo os dois primeiros considerados maus respondedores a quimioterapia pré-cirúrgica (necrose tumoral abaixo de 90%) e os dois últimos classificados como bons respondedores (necrose tumoral acima de 90%) (FEDERMAN et al., 2009). O grau de malignidade tumoral também é classificado de I a IV, sendo os dois primeiros considerados tumores de baixo grau, apresentando baixo nível de atipia nuclear, MEC abundante e concentração celular baixa ou moderada, enquanto que III e IV são tidos como tumores de alto grau, por apresentar alta concentração celular, irregularidades nos contornos nucleares e MEC anormal, imatura e desorganizada. Em geral, as células são pleiomorfas ou anaplásticas e com alta atividade mitótica (DAMJANOV, 2013). As demais características clínicas consideradas foram classificadas quanto a ausência e presença.

3.3. Extração de RNA e RT-qPCR

O RNAm foi extraído dos cultivos celulares, das amostras tumorais e das amostras de tecido ósseo não neoplásico por meio do Trizol Reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado e armazenado em freezer – 80°C até a sua utilização.

A partir do RNAm extraído, foi sintetizado o cDNA por meio do kit *High capacity* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se sondas RT específicas para avaliação da expressão do miR-10b (ID 002218). A RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real) foi realizada utilizando o aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os primers e as sondas TaqMan® [*HOXD10* (Hs00157974_m1), *MMP2* (Hs01548727_m1), *ROCK1* (Hs01127699_m1), *BCL2* (Hs00608023_m1), *TP53* (Hs01034249_m1), *GUS* (4326320E) e *GAPDH* (4326317E)] foram adquiridas pelo sistema by-demand da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). O volume final para cada reação de PCR foi de 10µL, sendo utilizados 5,0 µL do Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4304437), 0,5 µL de sonda e 4,5 µL de cDNA (2-8ng). Para expressão do gene *KLF4*, os primers utilizados foram 5'ACCCACACAGGTGAGAAACC 3' e 5'ATGTGTAAGGCGAGGTGGTGGTC 3' para *KLF4* e 5'CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA 3' e 5' GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT 3' para o endógeno *GUS*. O volume final de cada reação foi de 20uL, sendo utilizados 10uL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4309155), 0,8uL de cada primer e 20ng de cDNA.

Como controles endógenos foram utilizados RNU6B (ID 001093) e RNU48 (ID 001006) na expressão do miRNA e *GUS* e/ou *GAPDH* no caso dos genes. A amostra calibradora foi proveniente da linhagem de fibroblasto normal MRC-5 para o miR-10b e da linhagem de osteossarcoma HOS para o *HOXD10*. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3.4. Transfecção com pré-miR-10b para ensaios *in vitro*

No intuito de alterar artificialmente o nível de miR-10b foi utilizado o mimetizador MC11108 (Cat#4464066) da Ambion miRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a transfecção, 9 µL de Lipofectamine® RNAiMax (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) foram diluídos em 150 µL de Opti-MEM. A seguir, 30pmol do oligômero foram incubados com a solução contendo a lipofectamina/Opti-MEM mais 150 µL de Opti-MEM por 20 minutos. Posteriormente, toda a solução foi acrescentada a 500 mil células plaqueadas em um poço da placa de seis com 2 mL de meio de cultivo e mantida por 24 horas nessas condições. Após este tempo o *pellet* de células foi coletado para extração de RNA e o meio com os agentes da transfecção foi substituído por meio de cultivo novo. A eficiência de transfecção foi monitorada por qRT-PCR após 24, 48 e 72h. Como controle negativo, foi utilizado um mimetizador *scramble* (Cat # 4464076) também da Ambion miRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.5. Ensaio clonogênico

O ensaio de capacidade clonogênica foi realizado de acordo com FRANKEN et al. (2006). Após 24h da transfecção, as células foram ressuspensas em uma concentração de 500 células e semeadas em placas de 6 poços. A cultura de células foi mantida por cerca de 7 dias e então fixadas com metanol e coradas com Giemsa 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Apenas colônias com mais de 50 células foram contadas. Os ensaios foram realizados em triplicada, em três testes independentes.

3.6. Ensaio de migração por *wound healing*

Os ensaios de migração *in vitro* foram realizados de acordo com LIANG et al. (2007) com pequenas alterações. As células transfectadas foram mantidas em condições de cultivo até confluência em placa de 24 poços sendo então realizado um risco central em cada poço através da retirada mecânica das células desta região com o auxílio de uma ponteira de 200µl. Assim que realizado este procedimento, isto é, no tempo zero, o risco central foi fotografado e as células mantidas na ausência de SBF por 24h, quando foram novamente fotografadas. Para calcular a área livre de células foi utilizado o software Motic Images Plus v2.0 (Motic China Group Co., Ltd). A taxa de migração foi calculada como a distância em nanômetros migrada ao longo do tempo.

3.7. Ensaio de invasão em matrigel

Para invasão celular foram utilizados insertos com poros de 8 μm cobertos por matrigel® em placas de 24 poços (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Após 24h de transfecção, as células foram ressuspensas em meio sem SBF e aplicadas sobre o matrigel em uma concentração de $300\text{-}500 \times 10^3$ células/inserto. Na câmara inferior foram adicionados 500 μL de meio suplementado com 10% SBF. Após 24h de incubação, as células que não transpassaram a camada de matrigel foram removidas com o uso de *swab*. As células que invadiram foram fixadas com metanol absoluto por 15 min e coradas com uma solução de Giemsa 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As membranas do inserto foram então removidas, colocadas em lâminas com Entellan (Merk®) e fotografadas ao microscópio de luz clara (magnificação de 40x) sendo contadas com o auxílio *plugin Cell Counter* do software Image-J v1.47t (NIH, USA). Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.8. Ensaio de migração por quimioatraentes

Este ensaio de migração foi realizado em uma câmara de Boyden de 48 poços e membrana de polycarbonato (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, EUA) com poro de 8 μm revestidas com fibronectina. As células (25×10^3) após 24h de transfecção foram adicionadas à câmara superior juntamente com meio de cultivo livre de SBF; e como quimioatrativo, meio com e sem SBF foi adicionado na câmara inferior. Após 24h de incubação a 37°C, as células na superfície superior da membrana foram removidas e as células na superfície inferior fixadas com metanol absoluto e coradas com uma solução de Giemsa 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Das membranas fixadas foram capturadas quatro imagens por poço em microscópio de luz clara (magnificação de 20x), sendo contadas com o auxílio do software Image-J v1.47t (NIH, USA). Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.9. Ensaio de adesão celular

Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços. Os poços foram previamente recobertos com gelatina 2% (G-7765, Sigma-Aldrich) por 3 horas. As células transfectadas foram plaqueadas com densidade de 1×10^3 células por poço e removidas delicadamente após 90 minutos. As células aderidas foram fixadas com metanol e coradas com uma solução de Giemsa 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cinco campos aleatórios foram fotografados em um microscópio de luz invertido (magnificência de 10X) e contadas com o auxílio do software Image-J v1.47t (NIH, USA). Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.10. Extração de proteínas e *Western Blot*

Após 48h de transfecção foi realizada a extração de proteínas totais das linhagens celulares. A extração foi realizada utilizando-se o tampão de lise RIPA® (Sigma Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) juntamente com inibidores de protease e fosfatase, seguindo-se as recomendações do fabricante. Posteriormente, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica (BSA, 0,1 mg/mL) como padrão. Os valores de absorvância foram obtidos através da leitura em espectrofotômetro (leitor de micro placas) utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm, no leitor iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA).

Para a análise proteica, cada fração (40 µg) foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (LAEMMLI, 1970), utilizando-se o sistema Mini Protean II Dual Slab Cell (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e subsequentemente passaram pelo processo de imunodeteção. Para tanto, as membranas foram bloqueadas em leite em pó desnatado 5% (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA #170-6404) diluído em TBS-T (0,1%) por duas horas. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários das proteínas de estudo. Os anticorpos primários (Abcam Cambridge, UK) de HOXD10 (ab172865) e GAPDH (128915) foram diluídos a 1:100 e 1:10000 respectivamente em leite em pó desnatado 5% em TBS-T, de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram então lavadas 3 vezes (10 minutos cada) com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado a uma enzima *horseradish peroxidase* (ab6721 - diluição 1:10000 em leite em pó desnatado 5%) por uma hora, seguindo-se mais um ciclo de lavagem. A revelação foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente ECLTM (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire,UK).

3.11. Análise Estatística

Para análise da dinâmica de expressão gênica e da relação destas expressões e os dados clínicos dos pacientes foi realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney e para análise da curva de sobrevivência o teste de Log-Rank representado sob curvas de Kaplan-Meier. Para análise dos ensaios funcionais foram utilizados os testes T-Student ou one-way ANOVA, utilizando como pós-teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SPSS (SPSS Inc. Chicago, USA), considerando-se o nível de significância de $\alpha=0,05$.

Resultados

4.1. Dinâmica de expressão do miR-10b

Quando comparados a expressão do miR-10b em amostras tumorais em relação as amostras de tecido ósseo não neoplásico foi possível observar que a mediana na expressão deste miRNA nos tumores foi inferior a mediana no grupo controle, no entanto essa redução não foi significativa ($p=0,107$). Da mesma forma, o miR-10b nas linhagens celulares de OS também estava hipoexpresso em relação as amostras não neoplásicas porém não houve diferença significativa na expressão deste miRNA ($p = 0,11$) provavelmente devido ao baixo n amostral e a grande variação observada na expressão do miR-10b no grupo controle (Figura 1A). Individualmente, todas as linhagens apresentaram valores de expressão de miR-10b inferiores à média de expressão encontrada no tecido não neoplásico (Figura 1B). Não foi encontrada diferença estatística entre as amostras pré- e pós-quimioterápicas ($p=0,76$) (Figura 2A), no entanto não se tratavam de amostras pareadas para a correta comparação. Apenas os pacientes 3 e 8 tiveram amostras pré- e pós-quimioterapia avaliadas porém enquanto no primeiro caso foi evidenciado uma redução na expressão do miRNA, no segundo caso observou-se um aumento (Figura 2B).

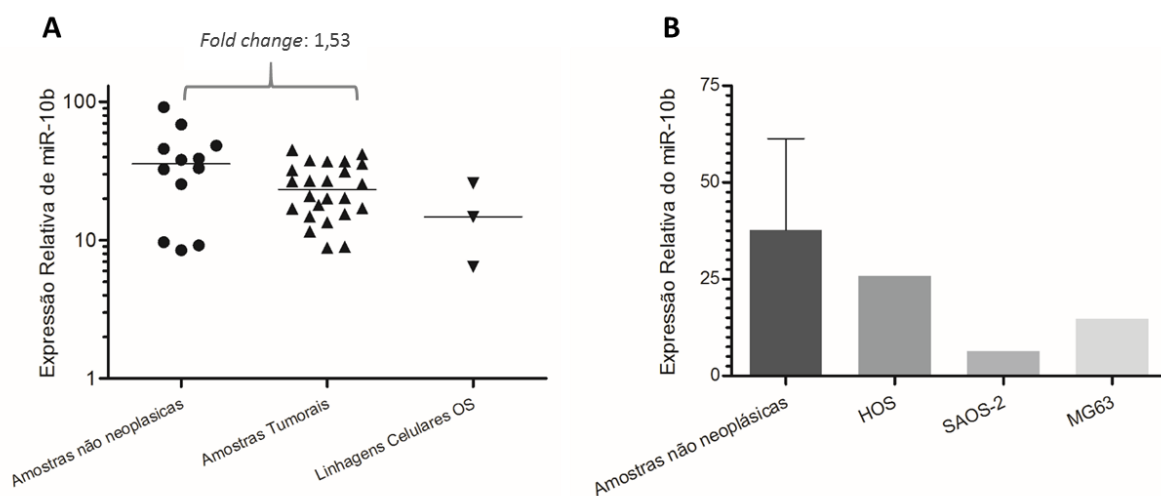


Figura 1. Expressão relativa do miR-10b em amostras de tecido ósseo não neoplásico, amostras tumorais e em linhagens celulares de OS. Não houve alteração significativa na expressão do miR-10b entre os grupos, no entanto observou-se uma redução na expressão mediana das amostras tumorais em relação ao tecido ósseo não neoplásico (*Fold change: 1,53*) (A). Todas as linhagens apresentaram níveis de expressão do miR-10b inferiores a expressão média encontrada no tecido não neoplásico (B).

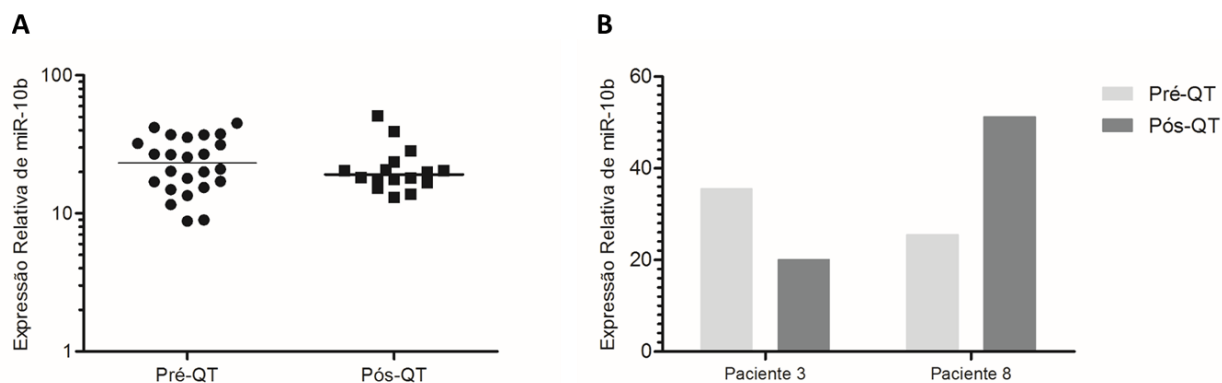


Figura 2. Expressão relativa do miR-10b em amostras tumorais pré-QT e pós-QT de OS. Não foi encontrada diferença na expressão entre amostras pré-QT e pós-QT (A), no entanto somente dois pacientes apresentaram amostras pareadas e tiveram comportamentos distintos (B).

4.2. Dinâmica de expressão do *HOXD10*

A expressão do gene *HOXD10* apresentou uma grande variação tanto nas amostras neoplásicas quando nas não neoplásicas, apesar disto, de forma inversa ao miR-10b, este gene foi encontrado significativamente aumentado nas amostras de OS em relação as amostras de tecido ósseo não neoplásico ($p=0,00018$). As linhagens celulares apresentaram valores de expressão intermediários, não havendo diferença estatística ($p= 0,085$) quando comparadas com as amostras não neoplásicas (Figura 3).

Da mesma forma que na expressão do miR-10b, não houve alteração significativa ($p= 0,558$) na expressão do gene *HOXD10* em relação ao status do tratamento (pré-QT ou pós-QT) (Figura 4A). Além disso, novamente nos casos de amostras pareadas dos pacientes 3 e 8, tivemos um aumento na expressão do gene na amostra pós-quimioterápica no primeiro caso e uma redução no segundo (Figura 4B).

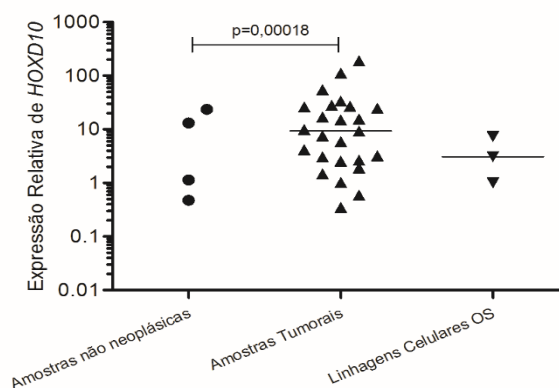


Figura 3. Expressão relativa do *HOXD10* em amostras de tecido ósseo não neoplásico, amostras tumorais e em linhagens celulares de OS. O *HOXD10* foi encontrado hipereexpresso (*Fold change*: 7,5) nas amostras tumorais em relação ao tecido ósseo não neoplásico. O gráfico é apresentado em escala logarítmica, não sendo possível visualizar os valores de expressão iguais a zero nas amostras não neoplásicas, porém eles são incluídos no cálculo da mediana apresentada.

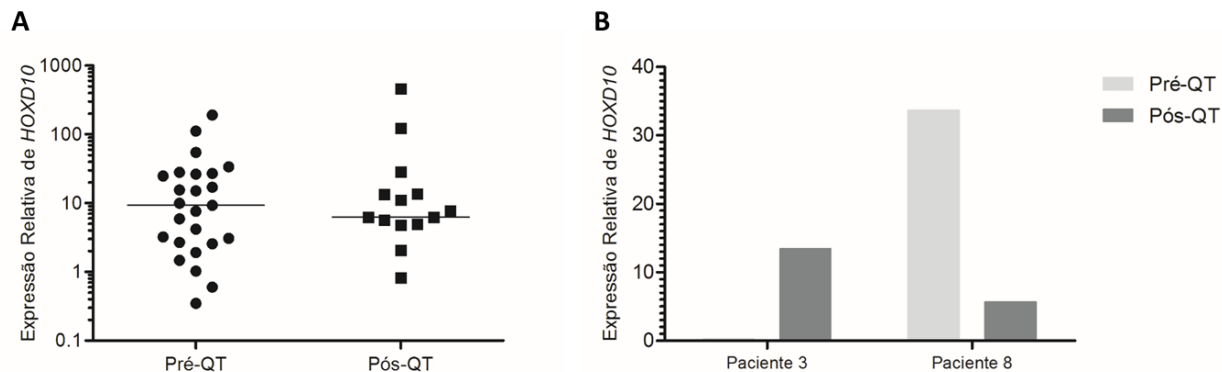


Figura 4. Expressão relativa do HOXD10 em amostras de acordo ao status de tratamento. Não foi encontrada diferença na expressão entre amostras pré-QT e pós-QT (A), no entanto somente dois pacientes apresentaram amostras pareadas porém com comportamentos distintos (B). O gráfico está em escala logarítmica, não sendo possível visualizar os valores de expressão iguais a zero nas amostras não neoplásicas, porém eles foram incluídos no cálculo da média apresentada.

4.3. Estudo de correlação entre miR-10b e *HOXD10*

Através do teste de Spearman, observou-se que não existe correlação significativa entre os níveis de expressão do miR-10b e do gene *HOXD10* nas amostras de OS pré-QT, sendo o coeficiente ρ (rho) = -0,024 e $p = 0,91$ (Figura 5).

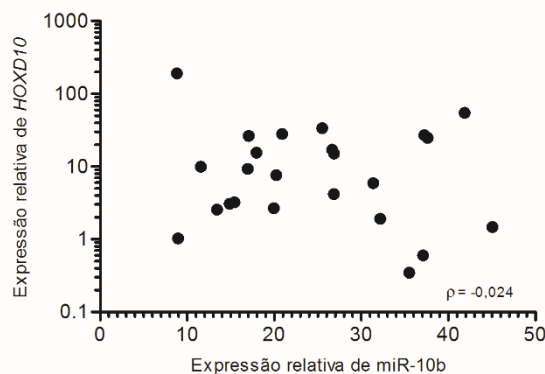


Figura 5. Análise da expressão de HOXD10 em relação à expressão de miR-10b nas amostras de OS. Cada ponto representa uma amostra. O coeficiente de Spearman ρ foi -0,024, não sendo encontrada correlação significativa entre as expressões.

4.4. Associação entre níveis de expressão de miR-10b e *HOXD10* e características clínicas dos pacientes

Através da análise da relação entre a expressão de miR-10b e as características clínicas dos pacientes, foi observado que não há relação entre o grau hivos, presença de metástase ou recidiva e óbito com os níveis de expressão do miRNA (Tabela I). Entretanto, observou-se que pacientes diagnosticados

com OS de alto grau apresentavam níveis de expressão de miR-10b significativamente mais baixos ($p=0,023$; $fold\ change = 1,72$) do que aqueles com OS de baixo grau (Figura 6).

TABELA I. Análise da associação clínica da expressão do miR-10b e *HOXD10* com características clínicas em pacientes com OS.

Nível de Expressão		miR-10b		<i>HOXD10</i>	
Classificação	Grupos	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max
Grau de Malignidade	Baixo Grau (n=5)	34,31	26,84-45,07	5,92	1,47-111,76
	Alto Grau (n=19)	19,96	8,81-37,63	9,31	0,34-191,81
	valor p	0,023		0,696	
Huvos	Bom respondedor (n= 3)	20,24	17,06-37,24	26,32	7,63-27,09
	Mau respondedor (n=14)	22,74	8,96-45,07	3,15	0,35-33,71
	valor p	0,705		0,101	
Metástase	Ausência (n=4)	31,98	19,87-37,24	8,86	0,60-27,09
	Presença (n=21)	20,57	8,81-45,07	9,31	0,35-191,82
	valor p	0,188		0,553	
Recidiva	Ausência (n=13)	20,24	8,81-41,87	9,94	0,60-191,81
	Presença (n=12)	26,66	8,95-45,07	7,61	0,35-111,76
	valor p	0,434		0,480	
Evento	Ausência (n=4)	31,98	19,96-37,24	8,86	0,60-27,09
	Presença (n=21)	20,57	8,81-45,07	9,31	0,35-191,81
	valor p	0,188		0,553	
Óbito	Ausência (n=18)	26,66	11,58-45,07	12,49	0,60-111,76
	Presença (n=7)	15,42	8,81-35,52	3,09	0,35-191,81
	valor p	0,136		0,276	

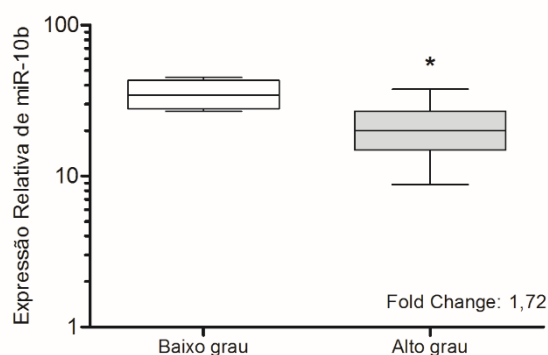


Figura 6. A expressão de miR-10b está relacionada com o grau de malignidade em OS. Pacientes diagnosticados com OS de alto grau apresentam menores níveis de expressão de miR-10b em relação a pacientes com OS de baixo grau ($p=0,023$).

Quanto a expressão de *HOXD10* e as características clínicas dos pacientes, as análises mostraram que dentre os critérios avaliados, nenhuma delas estava associado ao nível de expressão deste gene

(Tabela I). Além disso tanto os níveis de expressão do miRNA quanto do gene não apresentaram relação com a sobrevida global ou livre de eventos dos pacientes (Figura 7).

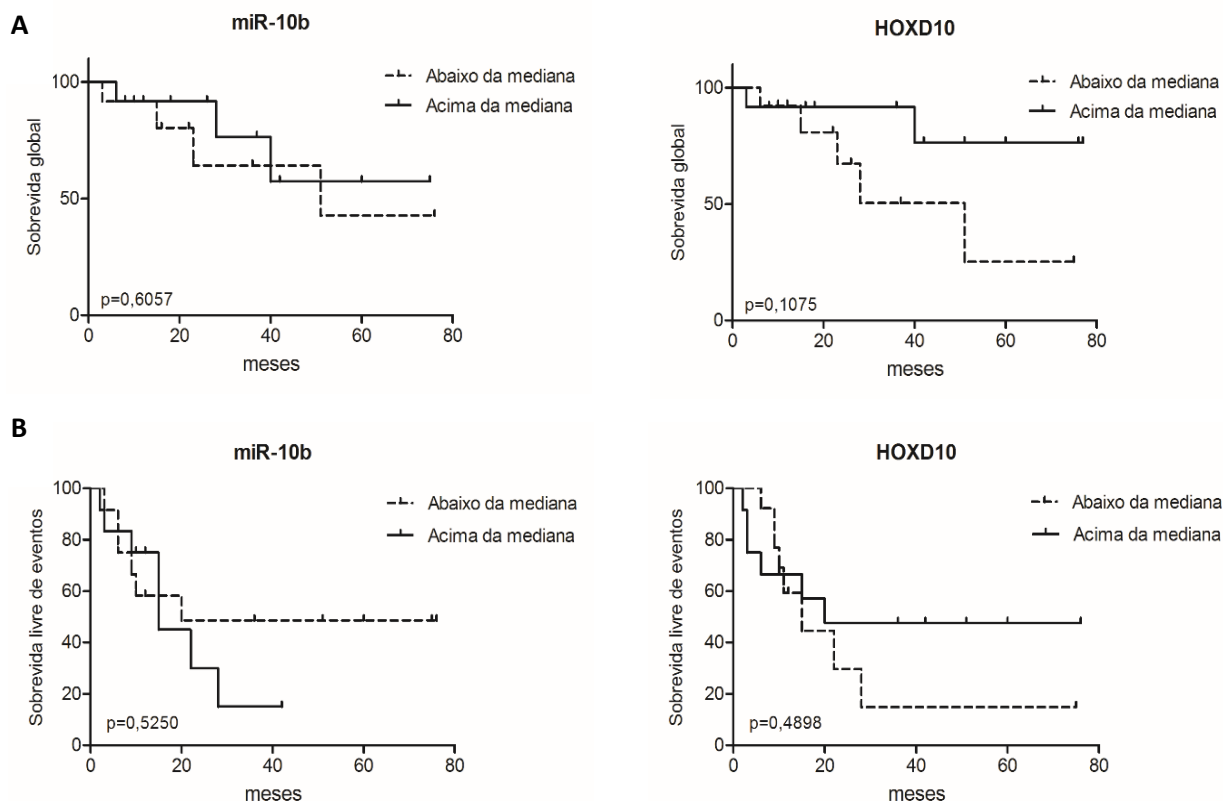


Figura 7. A. expressão de miR-10b e *HOXD10* não apresenta relação com a sobrevida global (A) ou livre de eventos (B) em pacientes com OS.

4.5. Efeito *in vitro* da modulação de miR-10b em OS.

Devido a associação encontrada entre baixa expressão de miR-10b e maior grau de malignidade tumoral, nós optamos por continuar a investigar o papel deste miRNA no OS. Para tanto, os níveis de miR-10b foram aumentados nas linhagens celulares através do emprego de mimetizadores. A eficiência do emprego desta técnica foi avaliada através de PCR em tempo real 48h após a transfecção. Todas as linhagens de OS apresentaram aumento com *fold change* superior a 10^3 em relação ao controle após 48h de transfecção (Figura 8).

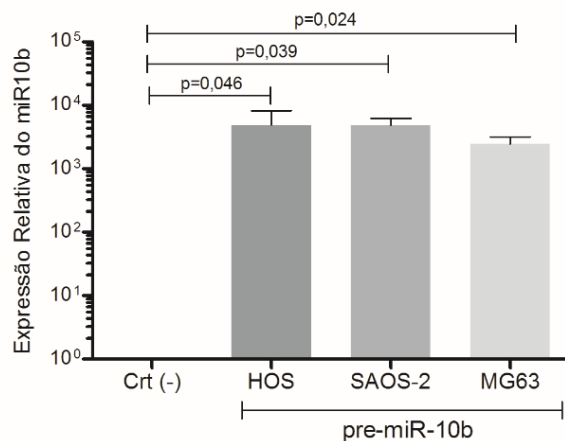


Figura 8. Aumento de miR-10b nas linhagens de OS, 48h após a transfecção com mimetizadores específicos (Ambion®).

4.6. Aumento nos níveis de miR-10b interfere na capacidade clonogênica *in vitro*.

Das três linhagens investigadas, duas delas apresentaram reduções na sua capacidade clonogênica após o aumento de miR-10b. A linhagem HOS apresentou uma redução média de 35% ($p=0,049$) enquanto que na linhagem SAOS-2 esta redução chegou a 50% ($p=0,03$) em relação ao controle negativo. Não foi encontrada alteração na capacidade clonogênica das células da linhagem MG63 (Figura 9).

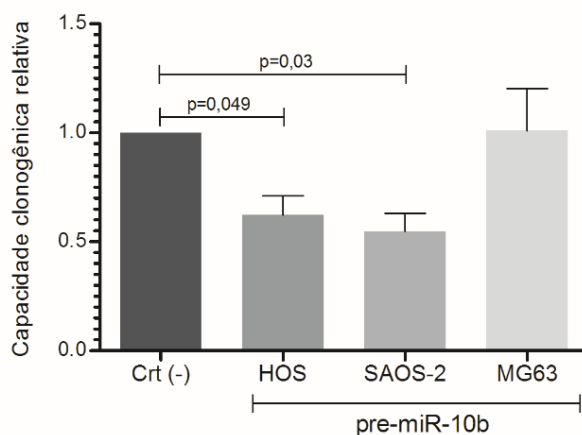


Figura 9. Aumento de miR-10b levou a redução na capacidade clonogênica de linhagens de OS.

4.7. Aumento de miR-10b afeta ligeiramente a capacidade de adesão de células de OS.

Embora estatisticamente significativo, o aumento de miR-10b nas células de OS induziu uma diminuição tênue da capacidade de adesão destas células. A maior redução encontrada foi na linhagem SAOS-2 correspondendo a 17% em relação ao controle negativo ($p=0,043$). Sob o aumento do miR-10b, a linhagem MG63 teve sua capacidade de adesão reduzida significativamente em 13% ($p=0,016$), enquanto que a redução de 11% encontrada na linhagem HOS em relação ao controle não foi considerada significativa (Figura 10).

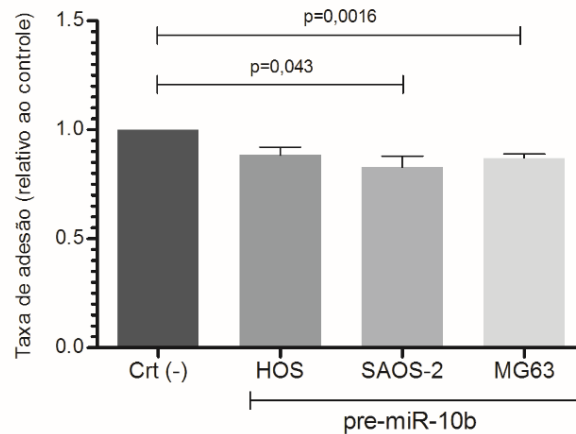


Figura 10. Aumento de miR-10b afetou ligeiramente a capacidade de adesão de células de OS.

4.8. Aumento do miR-10b afeta a capacidade migratória em OS.

A capacidade de migração das células foi avaliada por dois ensaios diferentes, o *wound healing* e a migração pela câmara de Boyden. No primeiro, observou-se reduções na capacidade migratória em todas as linhagens variando de 18% na linhagem SAOS-2 até 38% na linhagem MG63 (Figura 11A) em resposta ao aumento de miR-10b. Esses resultados foram ligeiramente distintos dos encontrados quando avaliamos a capacidade migratória de forma individual induzida ou não por quimioatraentes no ensaio de migração por Boyden (Figura 11B). Na presença de um quimioatraente (SBF) para direcionar e estimular a migração das células, observou-se redução na taxa de migração em torno de 40% nas linhagens SAOS-2 ($p=0,0023$) e MG63 ($p=0,013$) após o aumento do miR-10b. No entanto, a linhagem HOS não apresentou diferença significativa neste aspecto entre a linhagem transfectada e o controle negativo. Por outro lado, na ausência de quimioatraente, as três linhagens quando transfectadas com miR-10b se comportaram de maneira diferente. A linhagem SAOS-2 praticamente manteve a redução em torno de 40% em relação ao controle ($p=0,016$). A linhagem MG63 ainda apresentou uma redução na capacidade migratória em relação ao controle negativo, porém é inferior àquela apresentada quando exposta ao quimioatraente e ficou em torno de apenas 10% ($p=0,023$). Já na linhagem HOS, na ausência do quimioatraente, o aumento do miR-10b levou a um aumento na capacidade migratória em 65% ($p=0,0109$).

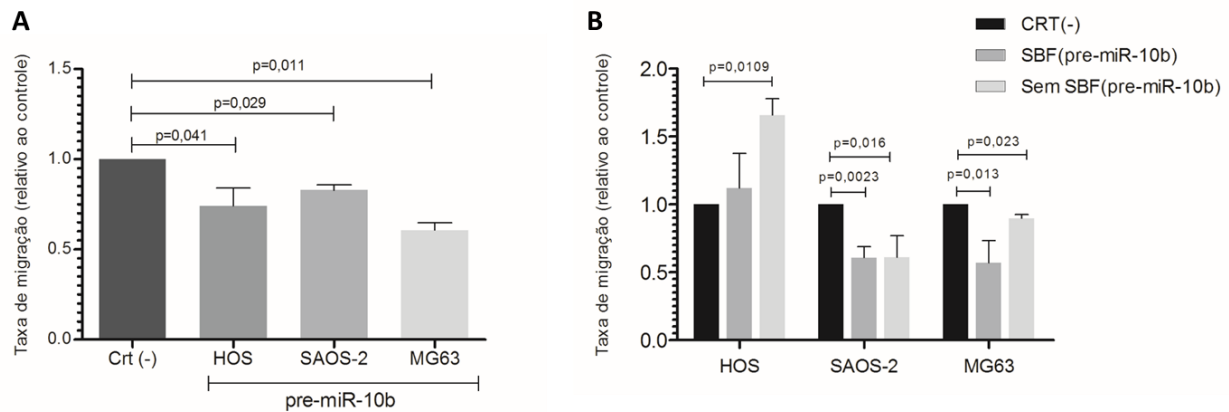


Figura 11. Aumento do miR-10b reduziu a capacidade migratória avaliada pelo ensaio de *wound healing* em todas as linhagens de OS (A). Aumento de miR-10b afetou migração de células de forma distinta entre as linhagens em resposta a quimioatraentes mensuradas em ensaio na câmara de Boyden (B).

3.9. Aumento nos níveis de miR-10b leva a redução na capacidade invasiva de células de OS.

A capacidade invasiva de células de OS foi avaliada através do ensaio de invasão em matrigel. Todas as linhagens apresentaram redução das taxas de invasão após a transfecção com miR-10b. A linhagem SAOS-2 apresentou-se mais sensível aos efeitos da hiperexpressão do miRNA tendo sua capacidade invasiva reduzida em 40% ($p=0,029$), enquanto a linhagem MG63 mostrou-se mais resistente com apenas 30% de redução ($p=0,025$) (Figura 12).

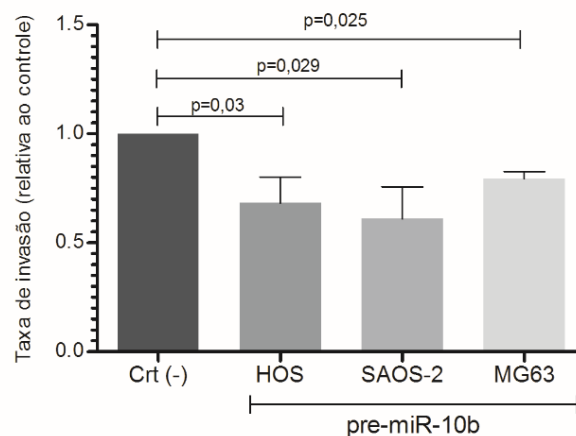


Figura 12. Aumento de miR-10b levou a redução na capacidade invasiva de linhagens de OS.

4.10. Aumento do miR-10b não afeta os níveis de expressão de *HOXD10*

Os níveis de expressão de *HOXD10* foram avaliados por PCR em tempo real e *Western Blot* após transfecção com miR-10b. Todas as linhagens apresentaram uma diminuição na expressão gênica de *HOXD10* após sua transfecção com o miRNA, no entanto o resultado só foi significativo na linhagem HOS,

que apresentou uma redução média de 32% na expressão de *HOXD10* ($p=0,004$) (Figura 13A). Apesar desta diminuição observada a nível gênico, nas três linhagens de OS avaliadas observou-se que o tratamento com mimético não afetou de forma significativa a expressão da proteína *HOXD10* (Figura 13B).

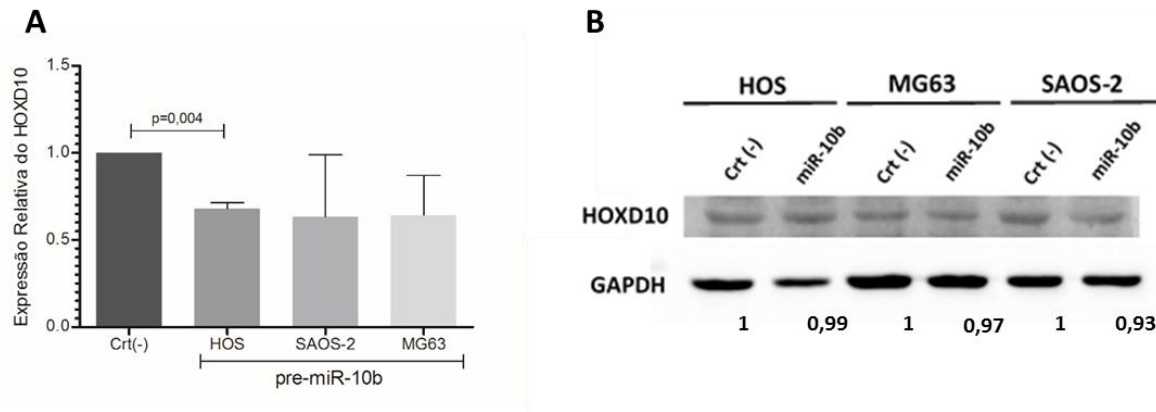


Figura 13. Aumento de miR-10b resultou em diminuição significativa na expressão gênica de *HOXD10* na linhagem HOS (A), porém não alterou sua expressão proteica em todas as linhagens (B).

4.11. Aumento do miR-10b não afeta os níveis de expressão de genes relacionados a proliferação e invasão

A linhagem SAOS-2 apresentou os resultados mais significativos em relação ao aumento de miR-10b nos ensaios funcionais realizados, sendo assim, nós avaliamos o efeito do tratamento com mimético em genes relacionados a proliferação e apoptose (*BCL2* e *TP53*) e a invasão (*ROCK1*, *MMP2*), no entanto nenhuma variação significativa na expressão destes genes foi encontrada nesta linhagem (Figura 14A). Também foi avaliado o nível de expressão de *KLF4*, já descrito como alvo de miR-10b nas três linhagens, porém apesar de encontrarmos menores níveis de expressão nas células transfectadas com miR-10b em relação ao controle, esta variação não foi significativa em nenhuma das linhagens (Figura 14B).

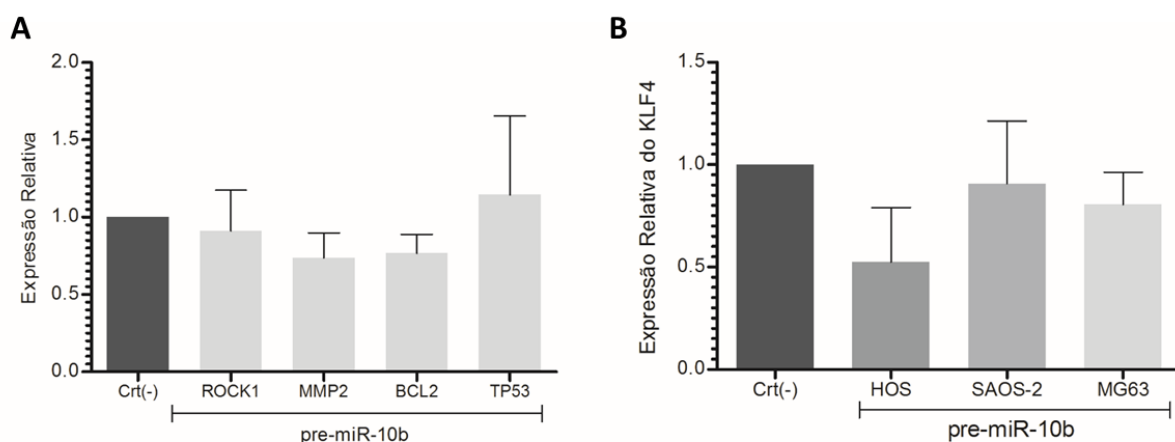


Figura 14. Aumento de miR-10b não alterou de forma significativa a expressão de genes relacionados a proliferação e invasão na linhagem SAOS-2 (A) e de *KLF4* nas três linhagens avaliadas (B).

Discussão

A alta capacidade metastática do OS é ainda o principal desafio no combate a este tipo tumoral diminuindo a sobrevida livre de eventos em cinco anos para 20% em contrapartida com os 70% de cura alcançados quando a doença é localizada (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2005; GORLICK & KHANNA, 2010; BRENNECKE et al., 2013). O desenvolvimento da metástase em si envolve uma série de processos biológicos que incluem alterações na adesão celular, no remodelamento da MEC e na dinâmica de controle da morfologia celular, todos os quais capacitam os processos migratórios e invasivos (KUMAR et al., 2012).

Desde sua descrição como metastamiR (MA et al., 2007), o miR-10b vem sendo amplamente descrito como oncogene em diversos tumores e sua expressão é regularmente encontrada elevada nos tipos tumorais metastáticos, de pior prognóstico e com alto potencial invasivo como relatado em estudos de glioblastoma (GABRIELY et al., 2011; LIN et al., 2012), melanoma (SALDANHA et al., 2016), câncer de próstata (FENDLER et al., 2011); de ovário (NAKAYAMA et al., 2013); de pâncreas (NAKATA et al., 2011), colorretal (ABDELMAKSOUD-DAMMAK et al., 2017); e ainda em carcinoma de tireóide folicular (JIKUZONO et al., 2013) e de nasofaringe (SUN et al., 2013). Em carcinoma hepatocelular (LI et al., 2012) e câncer de endométrio (CHEN et al., 2016) a inibição do miR-10b resultou na redução da migração e invasão celular, enquanto que em câncer de pulmão de células pequenas, seu silenciamento levou à parada do ciclo celular em G0/G1 e promoção de apoptose (HUANG et al., 2015). Em glioblastoma, a injeção intratumoral de anti-miR-10b foi capaz de inibir o crescimento de tumores implantados subcutaneamente em camundongos (GABRIELY et al., 2011).

Em OS, o presente trabalho expôs resultados distintos, sendo a expressão mediana de miR-10b inferior à mediana encontrada nos tecidos não neoplásicos, ainda que a variação não tenha sido significativa. Além disso, observou-se uma associação inversa entre os níveis de expressão do miR-10b e o grau de malignidade.

Neste tipo tumoral, o grau de malignidade é dado através da análise histológica seguindo um padrão similar à proposta de BRODERS (1921) para graduação de carcinoma de células escamosas. Assim, os tumores ósseos de baixo grau apresentam crescimento lento, poucas células em relação a quantidade de MEC e menor grau de necrose. Alternativamente, aqueles de alto grau (relacionados com pior prognóstico) são caracterizados por alta taxa mitótica, dismorfia nuclear e MEC anormal (DAMJANOV, 2013).

Esses dados sugerem assim uma relação do miR-10b com os processos de proliferação tumoral de OS. Além disso, a introdução deste miRNA *in vitro* gerou reduções significativas na capacidade clonogênica, adesiva, migratória e invasiva das células tumorais, sugerindo um papel de supressor tumoral e de importante atuação em processos relacionados a metástase.

Nosso trabalho, não é o primeiro a apresentar uma atuação de miR-10b nos tumores que contraria a ideia mais consolidada de metastamiR. Baixos níveis de expressão de miR-10b já foram relatados em câncer gástrico (LI *et al.*, 2015), lesões adenomióticas (GUO *et al.*, 2015) e mais recentemente, em câncer cervical (ZOU *et al.*, 2016). Reduções drásticas na proliferação celular, migração e invasão celular após o aumento da expressão do miR-10b já foram anteriormente relatadas em câncer gástrico (LI *et al.*, 2015) assim como em células epiteliais adenomióticas (GUO *et al.*, 2015). GUO e colaboradores (2015), demonstraram que miR-10b inibe diretamente a expressão de ZEB1 (*Zinc finger E-Box binding homeobox 1*) e PIK3CA (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) induzindo o aumento na expressão de E-caderina e inibindo a fosforilação da Akt (*Protein kinase B*), exibindo um papel de supressor tumoral neste tipo de lesão. Em câncer cervical, baixos níveis de miR-10b também foram significativamente associados a um fenótipo mais agressivo e sua hiperexpressão resultou na inibição da proliferação e da invasão possivelmente através de sua atuação sob HOXA1 (ZOU *et al.*, 2016).

Dentre os alvos descritos de miR-10b, o presente trabalho objetivou o estudo do gene *HOXD10*, um dos alvos mais consolidados e que o consagrou como metastamiR. Os genes da família HOX são considerados importantes reguladores celulares que atuam no controle da transcrição gênica, ativando e reprimindo diversos genes vitais para os processos de crescimento e diferenciação celular. Em relação ao tecido ósseo, o gene *HOXD10* apresenta participação durante o seu desenvolvimento. Alterações neste gene resultaram em defeitos na adução de membros e no caminhar de camundongos afetando os membros posteriores (CARPENTER, 1997). Além disso, a microdeleção no *cluster* HOXD que remove os genes de HOX9 a HOXD13 resultou em um fenótipo de simpodactilia (produção de mais dedos que o normal e união destes entre si) (DLUGASZEWSKA *et al.*, 2006).

Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos específicos pelos quais o *HOXD10* atua no processo de carcinogênese e na progressão tumoral, porém é notável que sua expressão varia aberrantemente entre diferentes tumores sólidos e leucemias. Em uma variedade de tumores como câncer de mama (CARRIO *et al.*, 2005, MA *et al.*, 2007, 2010), gliomas (GABRIELY *et al.*, 2011), e carcinomas de bexiga (XIAO *et al.*, 2014), gástrico (WANG *et al.*, 2012; VARDHINI *et al.*, 2014), hepatocelular (LIAO *et al.*, 2014) e colangiocelular (YANG *et al.*, 2015), o gene *HOXD10* vem sendo relatado como supressor tumoral, atuando como inibidor geral dos processos invasivos. Em carcinoma gástrico, *HOXD10* foi encontrado hipoexpresso nos tumores devido à metilação de seu promotor e sua expressão reduzida foi associada a um maior grau de malignidade tumoral (WANG *et al.*, 2012; VARDHINI *et al.*, 2014). Além disso, sua hiperexpressão nas linhagens celulares levou à redução na formação de colônias, nos processos de invasão e migração, sendo capaz de diminuir o tamanho tumoral *in vivo* (WANG *et al.*, 2012). Da mesma forma, em câncer de mama,

a restauração da expressão de *HOXD10* diminuiu a capacidade de migração e afetou negativamente a capacidade proliferativa e a habilidade de formar tumores em uma linhagem altamente metastática (CARRIO et al., 2005). Mais tarde, MA e colaboradores (2007, 2010) mostraram que a hiperexpressão de miR-10b encontrada em câncer de mama metastático e consequentemente a hipoexpressão de *HOXD10* (seu gene alvo) estavam relacionadas ao aumento na capacidade de invasão e metástase das células tumorais.

Nossos resultados, por sua vez, evidenciaram altos níveis de expressão do gene *HOXD10* nas amostras tumorais de OS em relação ao tecido não neoplásico. Resultados semelhantes foram observados em carcinoma de cabeça e pescoço, no qual este gene também aparece como oncogene (HAKAMI et al., 2014).

HAKAMI e colaboradores (2014) mostraram que, nesse tipo tumoral, *HOXD10* é encontrado hiperexpresso nos tumores primários, porém pouco expresso nas amostras de metástase em nódulos linfáticos. *In vitro*, a hiperexpressão deste gene foi capaz de aumentar a migração, adesão e proliferação celular, porém diminuiu a capacidade invasiva. Os autores sugeriram que o fato do *HOXD10* ser capaz de promover a proliferação, migração e adesão sem causar apoptose auxiliaria no desenvolvimento tumoral até seu estabelecimento completo no sítio primário. Por outro lado, o fato dele não ser encontrado expresso em altos níveis em amostras metastáticas e que sua reintrodução reduz a invasão sugerem que sua hipoexpressão envolva uma mudança de papel do gene que passaria a não mais favorecer o estabelecimento do tumor, mas contribuiria para o seu espalhamento e desenvolvimento em locais distantes, ressaltando a sua ação antimetástática já relatada anteriormente em diversos estudos. Para o desenvolvimento do presente trabalho, somente foram utilizadas amostras de tumores primários, no entanto, a hiperexpressão encontrada em nossas amostras é sugestiva de uma atuação deste gene no estabelecimento tumoral.

Considerando que o surgimento de tumores pediátricos tem relação com vias de desenvolvimento (FEDERICO et al 2011) e que o gene *HOXD10* participa ativamente do desenvolvimento tanto do esqueleto axial como do apendicular, principalmente na região do joelho (CARPENTER, 1997) os níveis elevados de *HOXD10* observados em OS da suporte para o estudo de seu papel como oncogene e alvo terapêutico.

A redução da expressão proteica de *HOXD10* decorrente da hiperexpressão de miR-10b já foi relatada em estudos com amostras de câncer de mama (MA et al., 2007), câncer de ovário (NAKAYAMA et al., 2013), e em câncer colorretal (WANG et al., 2015), sendo que em todos eles, o miR-10b atua suprimindo a tradução da proteína *HOXD10*. Em nossos estudos, não foi encontrada correlação significativa entre a expressão de miR-10b e a de *HOXD10* e, apesar de uma diminuição na sua expressão

gênica ter sido observada após aumento do miRNA, este resultado não se refletiu na expressão proteica. A correlação entre os níveis de RNAm e proteína, apesar de esperada, pode ser inferior a 40% dependendo do sistema (VOGUEL & MARQUETTI, 2013). Dentre as razões que contribuem para esta baixa correlação podemos incluir a variedade e complexidade dos mecanismos pós-transcricionais ainda pouco compreendidos; a variação na meia-vida das proteínas (podendo variar de 0,5 a 150h) e da estabilidade do RNAm dependendo das condições intrínsecas bem como a presença de vieses metodológicos (SANDOVAL et al., 2013; GREENBAUM et al., 2003). Não obstante, a ausência de variação nos níveis proteicos de *HOXD10* após transfecção com miR-10b sugere que os resultados inibitórios do miRNA observados nos ensaios funcionais não são decorrentes de sua atuação sob esse fator de transcrição.

Na última década muitos estudos demonstraram o papel do miR-10b e sua forma de atuação em diversas vias de proliferação e invasão de tumores, de forma independente de *HOXD10*. Contudo, apesar de majoritariamente ter sido descrito como um metastamiR, atuando na indução da metástase em tumores, o miR-10b caracteriza-se como um miRNA multifuncional por interagir com diferentes alvos em diversos contextos celulares. Em gliomas, o miR-10b apresentou-se como responsável pelo crescimento tumoral atuando sob genes pró-apoptóticos como *BCL2L11* (*Bcl-2-like protein 11*) e reguladoras do ciclo celular, como *TP53* (*Tumor protein p53*) (Lin et al., 2012), *CDKN1A/p21* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) e *CDKN2A/p16* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) (GABRIELY et al., 2011). Em câncer de bexiga e esôfago, sua hiperexpressão induziu a TEM através da regulação da expressão de *KLF4* (*Kruppel-like factor 4*) (XIAO et al., 2014, TIAN et al., 2010) e em câncer colorretal, o miR-10b foi associado ao pior prognóstico por conferir resistência ao quimioterápico 5-FU (*Fluorouracil*) através de sua atuação sob a expressão de *BCL2L11* (NISHIDA et al., 2012).

Após a redução na capacidade clonogênica das linhagens de OS com o aumento de miR-10b, nós analisamos a expressão dos genes *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) e *TP53*. O primeiro caracteriza-se por ser um gene anti-apoptótico, encontrado hiporregulado em câncer de pulmão após silenciamento de miR-10b (HUANG et al., 2015), enquanto o segundo, atua como supressor tumoral no controle do ciclo celular e já foi descrito como alvo de miR-10b em glioblastoma (LIN et al., 2012). No entanto, nenhuma variação significativa em sua expressão foi encontrada em razão do aumento de miR-10b nas linhagens de OS.

Quanto as reduções encontradas nos ensaios de migração e invasão celular, avaliamos a expressão de dois genes relacionados a estes processos, *ROCK1* e *MMP2* (*matrix metalloproteinases 2*). O primeiro corresponde a uma quinase responsável pelo controle do citoesqueleto cuja hiperexpressão está relacionada com promoção da invasão (MERTSCH & THANOS, 2013), enquanto o segundo corresponde a uma metaloproteinase bem estabelecida, responsável pela degradação da MEC nos processos invasivos

(WANG et al., 2014) e encontrada hiperexpressa após aumento de miR-10b em carcinoma hepatocelular (LIAO et al., 2014). Porém, nenhum destes genes apresentou variação significativa em sua expressão gênica em resposta a transfecção com miR-10b em OS.

Em vista dos resultados observados, poderíamos sugerir que o miR-10b atua como supressor tumoral em OS inibindo significativamente *in vitro* a capacidade das células de formar colônias, de adesão, migração e de invasão, entretanto permanece indefinido a forma pela qual ele desempenha estas funções.

No entanto, recentemente, a expressão de miR-10b em OS foi também descrita por WANG e colaboradores (2016) e revelou resultados divergentes dos observados no presente estudo. Em seu trabalho, altos níveis de expressão deste miRNA foram encontrados em amostras de OS em relação a amostras de tecido ósseo não neoplásico e a inibição de miR-10b nas linhagens MG63 e U2OS resultou na diminuição da proliferação, aumento de apoptose e redução na migração e invasão. A diminuição na capacidade invasiva das células em razão da supressão de miR-10b nesse estudo foi explicada pelo aumento de KLF4, validado como alvo de miR-10b. Em carcinoma de bexiga (Xiao et al., 2014) e em câncer de esôfago (TIAN et al., 2010), os efeitos antitumorais da inibição de miR-10b também foram atribuídos a sua atuação sob a expressão de KLF4.

O KLF4 caracteriza-se por um fator de transcrição que regula diversos processos biológicos, incluindo diferenciação, proliferação, progressão do ciclo celular, apoptose, renovação de células tronco e invasão (TETREAULT et al., 2013). Inclusive, dentre as suas funções está o controle da homeostase óssea, regulando negativamente a diferenciação de osteoclastos e osteoblastos (KIM et al., 2014). Assim, sendo um fator de transcrição, esta proteína é responsável por ativar e reprimir uma variedade de genes envolvidos nestes processos e apresenta um papel ambivalente na progressão tumoral (ZHANG et al., 2016).

Diversos estudos demonstraram que a expressão de *KLF4* encontra-se significativamente reduzida atuando como supressor tumoral em uma grande variedade de tumores incluindo câncer de bexiga (OHNISHI et al., 2003), gástrico (WEI et al., 2005), de pâncreas (ZAMMARCHI et al., 2011) e de pulmão (FADOUS-KHALIFÉ et al., 2016). De forma consistente, esses estudos mostraram que a restauração da expressão de *KLF4* reduz de forma significativa a proliferação *in vitro* (ZAMMARCHI et al., 2011) além de atenuar o crescimento tumoral e a formação de nódulos metastáticos *in vivo* (WEI et al., 2005). Por outro lado, em outros tipos tumorais como câncer de mama (YU et al., 2011) e carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (TAI et al., 2011), este gene é encontrado hiperexpresso e atuando como oncogene.

Os estudos de WANG e colaboradores (2016) atribuem um papel de supressor tumoral ao KLF4, visto que seu aumento em decorrência da inibição de miR-10b resultou na inibição da proliferação e

invasão em OS. No entanto, recentemente, ZHANG e colaboradores (2016) descreveram o KLF4 em OS como uma oncoproteína. Seu trabalho demonstrou maior expressão proteica de KLF4 em tecidos de OS (n=40) em relação a tecido ósseo normal. Além disso, foi a supressão de *KLF4* com shRNA (*Short Hairpin RNA*) nas linhagens MG63 e SAOS-2 que levou à redução *in vitro* da capacidade proliferativa, de formar colônias e migratória enquanto que sua hiperexpressão resultou na indução destes processos nessas linhagens. Em conjunto, experimentos *in vivo* com injeção subcutânea de células tumorais em camundongos *nude* revelaram menor volume tumoral naqueles derivados de células *knockdown* para *KLF4*. Dessa forma, o contraste desses trabalhos deixam incertezas quanto a contribuição real desta proteína na progressão do OS.

Em nosso trabalho, não encontramos variação significativa na expressão gênica de *KLF4* após o aumento de miR-10b. No entanto, não avaliamos a sua expressão proteica e, portanto, não podemos descartar a hipótese de sua tradução estar sendo bloqueada pelo pareamento com o micro-10b e assim, contribuindo para a redução nas taxas de proliferação e migração observadas.

A divergência entre os resultados observados no nosso estudo e no de WANG e colaboradores (2016) pode decorrer de diversas razões incluindo a variação no n amostral de pacientes/controles (25/13 *versus* 15/5), bem como nas linhagens empregadas nos ensaios funcionais (HOS, SAOS-2 e MG63 *versus* UOS2 e MG63). Ainda, existem diferenças metodológicas, e.g. os autores utilizam testes de viabilidade celular e apoptose enquanto nosso estudo incluiu o ensaio de sobrevivência clonogênica que não só prediz a viabilidade celular a longo prazo, senão que também avalia a soma de todas as formas de morte celular; também, diferentemente do nosso, o ensaio de *wound healing* realizado pelos autores utilizou meio de cultivo completo que não garante a diferenciação entre proliferação e migração celular.

Contudo, em câncer gástrico, o miR-10b já foi relatado como supressor tumoral (LI et al., 2015, KIM et al., 2011) e como oncomiR (MA et al., 2015; LIU et al., 2012), dependendo da coorte avaliada, de forma que seu papel neste tipo tumoral permanece uma incógnita. Ambos, nosso estudo e o de WANG (2016) apresentam um número amostral limitado (inferior a 30), de forma que um estudo com uma maior quantidade de amostras seria de grande importância para confirmar nossos resultados e melhor determinar o papel do miR-10b no OS.

Conclusões

6.1. Conclusão Geral

Os resultados obtidos neste estudo, sugerem que o miR-10b desempenha um papel de supressor tumoral em OS, estando associado com grau de malignidade tumoral e sendo capaz de suprimir a capacidade clonogênica, de adesão, migração e invasão *in vitro*. No entanto, a forma pela qual ele desempenha suas funções permanece indefinido, mas parece ser independente de seus alvos *HOXD10*, *KLF4*, e não parece afetar a expressão de genes sabidamente associados aos processos de proliferação e invasão *BCL2*, *TP53*, *MMP2* e *ROCK1*.

O *HOXD10*, por outro lado, apesar de não ter sido confirmado como alvo de miR-10b no nosso estudo, foi encontrado significativamente hiperexpresso nas amostras de OS em relação ao tecido não neoplásico. Assim, considerando a importância da desregulação de vias de desenvolvimento no surgimento de tumores pediátricos e a participação do *HOXD10* no desenvolvimento ósseo, o seu papel como oncogene e seu potencial como alvo terapêutico neste tipo tumoral merecem estudos posteriores.

6.2. Conclusões Pontuais

- Não foi encontrada variação significativa na expressão do miR-10b em amostras de OS em relação as amostras não neoplásicas, no entanto a mediana de expressão das amostras de OS foi inferior a aquela das amostras controles. Quanto ao gene *HOXD10*, este foi encontrado significativamente hiperexpresso nas amostras de OS em relação aos controles.
- A única associação encontrada entre os níveis de miR-10b e *HOXD10* das amostras tumorais e a evolução clínica dos pacientes refere-se a expressão de miR-10b e o grau de malignidade. Neste caso, amostras de maior grau de malignidade apresentaram menores níveis de expressão do miR-10b.
- Não foi encontrada nenhuma correlação entre a expressão gênica de miR-10b e de *HOXD10*.
- O aumento de miR-10b nas linhagens de OS resultou na diminuição significativa da capacidade clonogênica, adesão, migração e invasão destas células.
- Os níveis proteicos de *HOXD10* não foram alterados após aumento de miR-10b através do uso de miméticos específicos.

*Referências
Bibliográficas*

- ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 10, p. 777-85, Oct 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360280> >.
- ABDELMAKSOU-DAMMAK, R. et al. Overexpression of miR-10b in colorectal cancer patients: Correlation with TWIST-1 and E-cadherin expression. **Tumour Biol**, v. 39, n. 3, p. 1010428317695916, Mar 2017. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28345456> >.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. HOX genes and their role in the development of human cancers. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 8, p. 811-23, Aug 2014. ISSN 1432-1440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996520> >.
- BIAGIONI, F. et al. The locus of microRNA-10b: a critical target for breast cancer insurgence and dissemination. **Cell Cycle**, v. 12, n. 15, p. 2371-5, Aug 2013. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23839045> >.
- BIELACK, S. S. et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 3, p. 776-90, Feb 2002. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821461> >.
- BOULET, A. M.; CAPECCHI, M. R. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. **Development**, v. 131, n. 2, p. 299-309, Jan 2004. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668414> >.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.
- BRENNECKE, P. et al. CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. **Clin Exp Metastasis**, v. 31, n. 3, p. 339-49, Mar 2014. ISSN 1573-7276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390633> >.
- BRIDGE, J. A. et al. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 95, n. 1, p. 74-87, May 1997. ISSN 0165-4608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9140456> >.
- CANEL, M. et al. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. **J Cell Sci**, v. 126, n. Pt 2, p. 393-401, Jan 2013. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525005> >.
- CARPENTER, E. M. et al. Targeted disruption of Hoxd-10 affects mouse hindlimb development. **Development**, v. 124, n. 22, p. 4505-14, Nov 1997. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409668> >.
- CARRIO, M. et al. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. **Cancer Res**, v. 65, n. 16, p. 7177-85, Aug 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103068> >.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-72, Aug 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154349> >.
- CHEN, H. et al. miR-10b Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation and Invasion of Endometrial Cancer Cells via Targeting HOXB3. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 31, n. 6, p. 225-31, Aug 2016. ISSN 1557-8852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27447302> >.

- DAMJANOV, I. **Cancer Grading Manual**. 2 ed. Springer Berlin-Heidelberg, 2013.
- DAVIS, A. P.; CAPECCHI, M. R. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. **Development**, v. 120, n. 8, p. 2187-98, Aug 1994. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925020> >.
- _____. A mutational analysis of the 5' *HoxD* genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. **Development**, v. 122, n. 4, p. 1175-85, Apr 1996. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620844> >.
- DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 721-7, Dec 2001. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698188> >.
- DESAI, S.; LASKAR, S.; PANDEY, B. N. Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. **Cell Signal**, v. 25, n. 9, p. 1780-91, Sep 2013. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23714383> >.
- DLUGASZEWSKA, B. et al. Breakpoints around the *HOXD* cluster result in various limb malformations. **J Med Genet**, v. 43, n. 2, p. 111-8, Feb 2006. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980115> >.
- FADOUS-KHALIFÉ, M. C. et al. Krüppel-like factor 4: A new potential biomarker of lung cancer. **Mol Clin Oncol**, v. 5, n. 1, p. 35-40, Jul 2016. ISSN 2049-9450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27330761> >.
- FEDERICO, S.; BRENNAN, R.; DYER, M. A. Childhood cancer and developmental biology a crucial partnership. **Curr Top Dev Biol**, v. 94, p. 1-13, 2011. ISSN 1557-8933. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295682> >.
- FEDERMAN, N. et al. The multidisciplinary management of osteosarcoma. **Curr Treat Options Oncol**, v. 10, n. 1-2, p. 82-93, Apr 2009. ISSN 1534-6277. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238553> >.
- FENDLER, A. et al. miRNAs can predict prostate cancer biochemical relapse and are involved in tumor progression. **Int J Oncol**, v. 39, n. 5, p. 1183-92, Nov 2011. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21769427> >.
- FLETCHER CD. et al. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone**. IARC Press. France, 2002.
- FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473> >.
- GABRIELY, G. et al. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. **Cancer Res**, v. 71, n. 10, p. 3563-72, May 2011. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471404> >.
- GELLER, D. S.; GORLICK, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 8, n. 10, p. 705-18, Oct 2010. ISSN 1543-0790. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21317869> >.
- GERSCH, R. P. et al. Reactivation of *Hox* gene expression during bone regeneration. **J Orthop Res**, v. 23, n. 4, p. 882-90, Jul 2005. ISSN 0736-0266. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023004> >.
- GILL, J. et al. New targets and approaches in osteosarcoma. **Pharmacol Ther**, v. 137, n. 1, p. 89-99, Jan 2013. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983152> >.
- GOFF, D. J.; TABIN, C. J. Analysis of *Hoxd-13* and *Hoxd-11* misexpression in chick limb buds reveals that *Hox* genes affect both bone condensation and growth. **Development**, v. 124, n. 3, p. 627-36, Feb 1997. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043077> >.
- GORLICK, R.; KHANNA, C. Osteosarcoma. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 4, p. 683-91, Apr 2010. ISSN 1523-4681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205169> >.

- GREENBAUM, D. et al. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome Biol**, v. 4, n. 9, p. 117, 2003. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952525> >.
- GROSS, S. et al. Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43553, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916278> >.
- GUO, Y. et al. MiR-10b Directly Targets ZEB1 and PIK3CA to Curb Adenomyotic Epithelial Cell Invasiveness via Upregulation of E-Cadherin and Inhibition of Akt Phosphorylation. **Cell Physiol Biochem**, v. 35, n. 6, p. 2169-80, 2015. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896413> >.
- HAKAMI, F. et al. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Br J Cancer**, v. 111, n. 4, p. 807-16, Aug 2014. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25010866> >.
- HAYDEN, J. B.; HOANG, B. H. Osteosarcoma: basic science and clinical implications. **Orthop Clin North Am**, v. 37, n. 1, p. 1-7, Jan 2006. ISSN 0030-5898. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311106> >.
- HU, M; XIA, M. The Role of MicroRNA in Tumor Invasion and Metastasis. **Journal of Cancer Molecules** v.5, n.2, p. 33-39, 2010.
- HUANG, J. et al. microRNA miR-10b inhibition reduces cell proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Mol Biosyst**, v. 11, n. 7, p. 2051-9, Jul 2015. ISSN 1742-2051. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988292> >.
- IBRAHIM, S. A. et al. Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism. **Int J Cancer**, v. 131, n. 6, p. E884-96, Sep 2012. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573479> >.
- JIANG, H. et al. Up-regulation of mir-10b predicate advanced clinicopathological features and liver metastasis in colorectal cancer. **Cancer Med**, v. 5, n. 10, p. 2932-2941, Oct 2016. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27592860> >.
- JIKUZONO, T. et al. The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. **Int J Oncol**, v. 42, n. 6, p. 1858-68, Jun 2013. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563786> >.
- KARSENTY, G.; KRONENBERG, H. M.; SETTEMBRE, C. Genetic control of bone formation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 25, p. 629-48, 2009. ISSN 1530-8995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19575648> >.
- KIM, J. H. et al. Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts. **J Cell Biol**, v. 204, n. 6, p. 1063-74, Mar 2014. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616223> >.
- KONG, Y. W. et al. microRNAs in cancer management. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 6, p. e249-58, Jun 2012. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652233> >.
- KUMAR, S. Cell-Extracellular Matrix Mechanobiology in Cancer. **Elsevier**. p. 143-155, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.
- LI, J. et al. Conversion of stationary to invasive tumor initiating cells (TICs): role of hypoxia in membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) trafficking. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38403, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679501> >.
- LI, Q. J. et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through CADM1 in human hepatocellular carcinoma cells. **Tumour Biol**, v. 33, n. 5, p. 1455-65, Oct 2012. ISSN 1423-0380. Disponível em: <

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528944> >.
- LI, Z. et al. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 18, n. 1, p. 43-54, Jan 2015. ISSN 1436-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481854> >.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593> >.
- LIAO, C. G. et al. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. **J Transl Med**, v. 12, p. 234, Sep 2014. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236186> >.
- LIN, J. et al. MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme. **Cell Death Dis**, v. 3, p. e398, Oct 2012. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034333> >.
- LIU, X. et al. ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. **J Orthop Res**, v. 29, n. 8, p. 1259-66, Aug 2011. ISSN 1554-527X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387396> >.
- LIU, Z. et al. miR-10b promotes cell invasion through RhoC-AKT signaling pathway by targeting HOXD10 in gastric cancer. **Int J Oncol**, v. 40, n. 5, p. 1553-60, May 2012. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22293682> >.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.
- LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834-8, Jun 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944708> >.
- MA, L. et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 4, p. 341-7, Apr 2010. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351690> >.
- MA, L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. 210, 2010. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067538> >.
- MA, Z. et al. Augmented miR-10b expression associated with depressed expression of its target gene KLF4 involved in gastric carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 5, p. 5071-9, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191201> >.
- MACFARLANE, L. A.; MURPHY, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Curr Genomics**, v. 11, n. 7, p. 537-61, Nov 2010. ISSN 1875-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532838> >.
- MARINA, N. et al. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. **Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 422-41, 2004. ISSN 1083-7159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15266096> >.
- MASSIP, L. et al. Expression of Hoxa2 in cells entering chondrogenesis impairs overall cartilage development. **Differentiation**, v. 75, n. 3, p. 256-67, Mar 2007. ISSN 0301-4681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17359301> >.
- MERTSCH, S.; THANOS, S. Opposing signaling of ROCK1 and ROCK2 determines the switching of substrate specificity and the mode of migration of glioblastoma cells. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 2, p. 900-15, Apr 2014. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170433> >.
- MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. **Int J Cancer**, v. 125, n. 1, p. 229-34, Jul 2009a. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330840> >.

- _____. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, v. 115, n. 7, p. 1531-43, Apr 2009b. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197972> >.
- MORGAN-FISHER, M.; WEWER, U. M.; YONEDA, A. Regulation of ROCK activity in cancer. **J Histochem Cytochem**, v. 61, n. 3, p. 185-98, Mar 2013. ISSN 1551-5044. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204112> >.
- MYERS, C. et al. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 161, n. 6, p. 2099-109, Dec 2002. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466126> >.
- NAKATA, K. et al. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis. **Surgery**, v. 150, n. 5, p. 916-22, Nov 2011. ISSN 1532-7361. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018284> >.
- NAKAYAMA, I. et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. **Int J Oncol**, v. 43, n. 1, p. 63-71, Jul 2013. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670532> >.
- NISHIDA, N. et al. MicroRNA-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. **Ann Surg Oncol**, v. 19, n. 9, p. 3065-71, Sep 2012. ISSN 1534-4681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22322955> >.
- OHNISHI, S. et al. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 308, n. 2, p. 251-6, Aug 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12901861> >.
- OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 3-13, 2009. ISSN 0927-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213383> >.
- PICCI, P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). **Orphanet J Rare Dis**, v. 2, p. 6, Jan 2007. ISSN 1750-1172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244349> >.
- SALDANHA, G. et al. microRNA-10b is a prognostic biomarker for melanoma. **Mod Pathol**, v. 29, n. 2, p. 112-21, Feb 2016. ISSN 1530-0285. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26743475> >.
- SANDOVAL, P. C. et al. Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 24, n. 11, p. 1793-805, Nov 2013. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24029424> >.
- SEIFERT, A. et al. Role of Hox genes in stem cell differentiation. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 583-95, Apr 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914765> >.
- STAMENKOVIĆ, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 10, n. 6, p. 415-33, Dec 2000. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170864> >.
- STELIAROVA-FOUCHER, E et al. Classificação Internacional do Câncer na Infância, 3ed. **American Cancer Society**, 2005.
- SUN, X. J. et al. miR-10b promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 9, p. 5533-7, 2013. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175854> >.
- TAI, S. K. et al. Persistent Krüppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Sci**, v. 102, n. 4, p. 895-902, Apr 2011. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219537> >.
- TETREAULT, M. P.; YANG, Y.; KATZ, J. P. Krüppel-like factors in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 10, p. 701-13, Oct 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24060862> >.
- TIAN, Y. et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines.

- J Biol Chem**, v. 285, n. 11, p. 7986-94, Mar 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075075> >.
- VARDHINI, N. V. et al. HOXD10 expression in human breast cancer. **Tumour Biol**, v. 35, n. 11, p. 10855-60, Nov 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25081374> >.
- VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 4, p. 227-32, Mar 2012. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411467> >.
- VON HEYKING, K. et al. The posterior HOXD locus: Its contribution to phenotype and malignancy of Ewing sarcoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41767-41780, Jul 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27363011> >.
- WANG, H. L. et al. Relationships between abnormal MMP2 expression and prognosis in gastric cancer: a meta-analysis of cohort studies. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 29, n. 4, p. 166-72, May 2014. ISSN 1557-8852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784911> >.
- WANG, J. et al. miR-10b promotes invasion by targeting KLF4 in osteosarcoma cells. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 947-953, Dec 2016. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27764757> >.
- WANG, L. et al. Homeobox D10 gene, a candidate tumor suppressor, is downregulated through promoter hypermethylation and associated with gastric carcinogenesis. **Mol Med**, v. 18, p. 389-400, May 2012. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160393> >.
- WANG, Y. F. et al. MicroRNA-10b is upregulated and has an invasive role in colorectal cancer through enhanced Rhoc expression. **Oncol Rep**, v. 33, n. 3, p. 1275-83, Mar 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25606801> >.
- WEI, D. et al. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. **Cancer Res**, v. 65, n. 7, p. 2746-54, Apr 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805274> >.
- WELLIK, D. M.; CAPECCHI, M. R. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 363-7, Jul 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869760> >.
- XIAO, H. et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 and HOXD10 in human bladder cancer. **Oncol Rep**, v. 31, n. 4, p. 1832-8, Apr 2014. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573354> >.
- YANG, H. et al. HOXD10 acts as a tumor-suppressive factor via inhibition of the RHOC/AKT/MAPK pathway in human cholangiocellular carcinoma. **Oncol Rep**, v. 34, n. 4, p. 1681-91, Oct 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260613> >.
- YOKOUCHI, Y. et al. Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. **Genes Dev**, v. 9, n. 20, p. 2509-22, Oct 1995. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590231> >.
- ZÁKÁNY, J.; DUBOULE, D. Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the HoxD complex. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 69-71, Nov 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900279> >.
- ZAMMARCI, F. et al. KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma. **Am J Pathol**, v. 178, n. 1, p. 361-72, Jan 2011. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224073> >.
- ZHANG, B. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol**, v. 302, n. 1, p. 1-12, Feb 2007. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16989803> >.
- ZHANG, P. et al. MicroRNA-10b regulates epithelial-mesenchymal transition by modulating KLF4/Notch1/E-cadherin

- in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 2, p. 141-56, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186392> >.
- ZHU, Q. et al. miR-10b exerts oncogenic activity in human hepatocellular carcinoma cells by targeting expression of CUB and sushi multiple domains 1 (CSMD1). **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 806, Oct 2016. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27756250> >.
- ZOU, D. et al. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. **Oncol Res**, v. 24, n. 2, p. 99-108, 2016. ISSN 1555-3906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27296950> >.

Apêndices

Apêndice A. Perfis de STR apresentados pela ATCC (*American Type Culture Collection*) e encontrados na análise das linhagens utilizadas no presente trabalho.

Linhagens	Perfil STR							
	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	D7S820	THO1	TPOX	vWA
Ref ATCC HOS	12	12	10;13	13	11;12	6	8;11	18
Ref ATCC MG63	10;12	11	11	11;12	10	9.3	8;11	16;19
Ref ATCC SAOS-2	10	12;13	12;13	12	8;10	6;9	8	18

Apêndice B. Dados clínicos referentes as amostras de Osteossarcoma utilizadas no estudo da expressão de miR-10b e HOXD10.

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico	Grau de malignidade	Volume ao diagnóstico (cm ³)	Grau huxos	Localização	Metástase	Recidiva	Evento
1	21	F	Osteossarcoma parosteal (justa-cortical)	Não informado	401,76	sem quimioterapia	Fêmur direito	Infiltração local		Vivo com doença
2	12	F	Osteossarcoma convencional	grau 4	1393,92	não informado	Fêmur esquerdo	Pulmonar, Esternal e Hepática	sim	Óbito
3	18	M	Osteossarcoma convencional central	grau 3	865,92	grau 2	Fêmur esquerdo	Pulmonar	sim	Óbito
4	24	M	Osteossarcoma condroblástico	grau 2	82,5	retirado ao diagnóstico	Tibia direita	Presença de metástase	sim	Vivo sem a doença
5	15	M	Osteossarcoma convencional (intramedular), condroblástico	grau 3 ou 4	255,474	amputação ao diagnóstico	Tornozelo	Pulmonar		Vivo sem a doença
6	10	F	Osteossarcoma paraosteal	grau 1	não informado	retirada cirúrgica ao diagnóstico	Tibia esquerda	Pulmonar		Vivo sem a doença
7	12	F	Osteossarcoma central convencional	grau 3 ou 4	221,858	grau 2	Fíbula esquerda	Pulmonar	sim	Óbito
8	13	M	Osteossarcoma osteoblástico central, convencional	grau 3	432	grau 1	Fêmur direito	Pulmonar e arcos costais	sim	Óbito
9	20	M	Osteossarcoma condroblástico central, convencional	grau 3	não informado	não informado	Fêmur esquerdo	Pulmonar	sim	Perda de Seguimento
10	13	M	Osteossarcoma osteoblástico convencional	grau 3	486	grau 4	Fêmur esquerdo	Pulmonar		Vivo sem a doença
11	12	F	Osteossarcoma osteoblástico	grau 3	651,776	grau 1	Fêmur direito	Ingüinal, Fêmur, íliaca e região do abdômen	sim	Óbito
12	15	F	Osteossarcoma osteoblástico convencional	grau 2	455	grau 3	Joelho esquerdo	sem metástase		Vivo sem a doença
13	18	F	Osteossarcoma	grau 1 ou 2	465,108	grau 1	Fêmur esquerdo	Fossa poplíteia	sim	Vivo sem a doença
14	11	M	Osteossarcoma convencional	grau 3	396,171	grau 2	Fêmur esquerdo	Pulmonar		Vivo sem a doença
15	21	F	Osteossarcoma paraosteal	grau 3	não informado	sem quimioterapia	Fêmur direito distal	Fêmur	sim	Vivo sem a doença
16	26	F	osteossarcoma condroblástico central	grau 3 ou 4	não informado	não informado	Asa íliaca esquerda	Vértebra		Óbito
17	19	F	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	72,99	grau 2	Fêmur direito	Pulmonar		Óbito
18	18	M	Osteossarcoma	grau 3 ou 4	659,016	grau 2	Íliaco direito	Pulmonar	sim	Vivo com doença - perda de seguimento
19	17	F	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	620,736	grau 2	Fêmur direito	Pulmonar	sim	Vivo com doença - perda de seguimento
20	12	F	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	562,77	grau 2	Fêmur	sem metástase		Vivo sem a doença
21	5	M	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	50,048	grau 2	Fêmur direito	sem metástase		Vivo sem a doença
22	6	M	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	971,52	grau 3	Fêmur direito	sem metástase		Vivo com doença
23	16	F	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	não informado	grau 2	Úmero direito	Linfonodos		Vivo com doença
24	16	F	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	234,5	grau 3	Fêmur esquerdo	Pulmonar		Vivo com doença
25	12	M	Osteossarcoma central	grau 3 ou 4	não informado	grau 2	Tibia direita	Pulmonar	sim	Vivo com doença

Anexos

Anexo A. Aprovação do comitê de ética para desenvolvimento da pesquisa.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 13 de janeiro de 2016.

Ofício nº 154/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 7640/2015

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA DO MIR-10b NA PROLIFERAÇÃO E CAPACIDADE INVASIVA DE OSTEOSSARCOMA" - Projeto de Pesquisa versão 1 de 06/08/2015**, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o "Biorrepositório de tecido ósseo não neoplásico e osteossarcomas" e o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico Versão 1 de 07/12/2015; o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 1 de 07/12/2015 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Grupo Controle Versão 1 de 07/12/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
GABRIELA MOLINARI ROBERTO
MARÍA SOL BRASSESCO ANNICHINI (Orientadora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br