RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

INTEGRAÇÃO DE DADOS DE TRANSCRIPTOMA E MICRORNOMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE REDES REGULATÓRIAS, MEDIADORES E BIOMARCADORES DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

PAULA PACCIELLI FREIRE

BOTUCATU- SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

INTEGRAÇÃO DE DADOS DE TRANSCRIPTOMA E MICRORNOMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE REDES REGULATÓRIAS, MEDIADORES E BIOMARCADORES DA CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER

PAULA PACCIELLI FREIRE

PROF. DR. ROBSON FRANCISCO CARVALHO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Orientador: *Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho*

BOTUCATU-SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Freire, Paula Paccielli.
Integração de dados de transcriptoma e microRNoma para identificação de redes regulatórias, mediadores e biomarcadores da caquexia associada ao câncer / Paula Paccielli Freire. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Robson Francisco Carvalho
Capes: 20200005

1. Câncer. 2. Caquexia. 3. Marcadores bioquímicos. 4. Transcriptoma. 5. Músculo esquelético. 6. microRNA.

Palavras-chave: Biomarcadores; Caquexia; Músculo esquelético; Transcriptoma; microRNA.

Science works on the frontier between knowledge and ignorance.
We're not afraid to admit what we don't know. There's no shame in that.
The only shame is to pretend that we have all the answers.

Neil Degrasse Tyson

Dedico este trabalho às pessoas que mais me ajudaram nessa jornada e que me incentivaram para a materialização desse objetivo.

minha mãe, Silvia Aparecida Paccielli
e meu pai, Valter de Vasconcelos Freire

Muito obrigada por tudo.
Eu amo vocês.

Agradeço primeiramente ao Robson Francisco Carvalho, meu orientador e grande amigo, pessoa a qual admiro imensamente e tenho como exemplo de competência e profissionalismo. Obrigada por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e confiança durante os últimos oito anos, sem os quais eu não chegaria até aqui. Minha vida profissional e pessoal sofreu grandes modificações após a sua entrada em minha vida. Sou muito grata por caminhar ao lado de alguém que possui princípios nobres e trabalha todos os dias por um propósito maior. Muito obrigada por tanto! O mérito desse trabalho também é todo seu.

Agradeço com muito carinho à professora Maeli Dal Pai, minha grande inspiração, que se tornou uma grande amiga durante o período do meu mestrado e doutorado. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e por ser um enorme exemplo de respeito e humildade para todos nós do departamento de morfologia.

Agradeço ao professor Da-Zhi Wang, meu supervisor nos Estados Unidos, com quem aprendi muito sobre respeito e honestidade na pesquisa científica e no ambiente de trabalho. Obrigada por permitir minha experiência internacional em um laboratório de ponta, por ter acreditado em mim e por me incentivar a buscar cada vez mais conhecimento.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, Valter de Vasconcelos Freire e Silvia Aparecida Paccielli, e aos meus irmãos, Carolina Paccielli Franco e José Vitor de Vasconcelos Freire. Obrigada por terem dedicado a mim tanto amor e paciência. Sei que vocês batalharam muito e se esforçaram ao máximo pensando no meu bem. Tenho muito orgulho de vocês e sou muito grata por ter escolhido vocês como minha família. Toda a minha dedicação, persistência no trabalho e na vida é para um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim. Eu amo vocês mais que tudo.

Agradeço meus avós, José de Vasconcelos e Helena Pera, meus tios, Cecília Froner, Edemar Froner, Verginia Vasconcelos, Alexandre Tosetto, Nanci Paccielli e Denise Figueiredo, e meu cunhado Leandro Garcia. Obrigada pelo apoio e por todo o carinho que vocês sempre dedicaram a mim.

Agradeço muito ao meu namorado, João Marcos de Mattos Barguil, que foi a pessoa mais incrível que surgiu em minha vida nos últimos anos, me presenteando com seu amor, amizade e companheirismo. Muito obrigada por me ensinar o tempo todo e por me orientar nas horas mais difíceis. Você sempre foi um enorme exemplo de dedicação e discernimento. Sou uma pessoa melhor agora que tenho você comigo. Amo muito você e quero caminhar sempre ao seu lado na direção de um propósito maior. Agradeço também a Francisco Barguil e Ana Lúcia Barguil, pessoas maravilhosas que tive a sorte de conhecer e que agora são parte da minha família. Vocês são grandes exemplos para mim. Obrigada pelos ensinamentos, por tanto carinho e acolhimento.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e de defesa, Patrícia Pintor dos Reis, Maeli Dal Pai Silva, Erick da Cruz Castelli, Edilamar Menezes de Oliveira, Rodrigo Wagner Alves de Souza, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa e Luis Fernando Barbisan, pela disponibilidade, pelos valorosos conselhos e sugestões para a melhoria desse trabalho. Aproveito para agradecer o professor Luis Fernando Barbisan também pela supervisão durante o período de estágio docência, sua conduta me inspirou muito e aumentou ainda mais o meu desejo de me tornar professora universitária.

Agradeço a todos os docentes e funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente os professores Wellerson Rodrigo Scarano (grande amigo), Luis Antonio Justulin Jr., Sérgio Luis Felisbino e Flávia Karina Delella. Obrigado por todo o aprendizado e pelo convívio diário.

Agradeço ao meu grande e eterno professor Antonio Carlos Cicogna, por ter me ensinado tanto sobre ética profissional e disciplina, por ter me preparado para o mundo acadêmico e por ser um incentivador de grandes mentes. Obrigada por me apoiar tanto e por estar sempre presente.

Agradeço a todos os amigos, novos e antigos, do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado, Ana Omoto, Ana Carolina Alvarez, Bruna Zanella, Brunno Vivone, Bruno Fantinatti, Diogo Moraes, Douglas Marques, Erika Perez, Geysson Fernandez, Grasieli de Oliveira, Isabele Magiore, Jakeline Oliveira, Jefferson Souza, Jéssica Silvino, João Paulo Cunha, Juarez Ferreira, Leonardo de Moraes, Letícia Oliveira, Maria Laura Kuniyoshi, Mathias Chaves, Pedro Guilherme, Rafaela Nunes, Tassiana Gutierrez. Agradeço especialmente à Sarah Cury e Bruno Duran, que são meus grandes amigos e companheiros, os quais estiveram presentes em todos os meus melhores e piores dias durante a pós-graduação. Agradeço pelas risadas, pelo trabalho e por me ajudarem a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço aos funcionários e colegas do Children's Hospital – Harvard Medical School, Xiaoyun Hu, Justin King, Yao Wei Lu, Vanessa Lima, Sumei Cui, Jing Lin, Katia Andrade, Yi Wang, Haipeng Guo, Cheng Fan, Erica Sousa, Tingting Wang e Panpan Hao. Agradeço especialmente ao Jianming Liu, meu amigo supervisor, que me auxiliou em todos os meus experimentos durante os seis meses de estágio no exterior. Obrigada pelos muitos ensinamentos. 謝謝你.

Agradeço aos meus amigos do Departamento de Morfologia, Ana Carolina Camargo, Ariana Musa, Bruno Martinucci, Caroline Barquilha, Caio Cesar, Cecilia Luvizutti, Cristiane Pinho, Elian Ribeiro, Flávia Bessi, Francielle Mosele, Helga Nunes, Isabela Barbosa, Jordana Oliveira, Ketlin Colombelli, Luiz Frediane, Maira Cucielo, Matheus Fioretto, Nilton Santos, Sérgio Alexandre dos Santos, Teng Fwu Shing e Vivian Cypriano. Obrigada pelo cafezinho diário, pelos encontros e por tornarem nosso ambiente de trabalho tão agradável. Nosso departamento possui uma harmonia inigualável.

Agradeço às minhas amigas Danielle Vileigas e Priscila Sales, por terem participado intensivamente desses meus dois últimos anos de doutorado. Obrigada pela amizade de vocês, pelas alegrias vividas, pelo apoio em todas as horas e, principalmente, pelos trabalhos desenvolvidos em conjunto.

Agradeço às minhas amigas de Botucatu, Vanessa Carvalho, Maria Carolina Vieira, Tainá Silva, Carolina Benato, Jéssica Nicolai e Isadora Tiegui, e aos meus amigos da universidade, Camila Pergentino, Claudia Diniz, Marcela Martins, Heloísa Bortolin, Mariane Gonçalves, André Sartori, Henrique Silva, Carlos Alves, Leandro Inson, Jonas Vieira e Danilo Hohne. Obrigada por estarem sempre do meu lado, comemorando minhas conquistas e me apoiando durantes os momentos difíceis. Não seria nada sem vocês.

Agradeço à seção técnica da Pós-Graduação, que sempre soube me auxiliar em tudo. Em especial, agradeço muito ao Davi Müller, um profissional excelente, paciente e muito prestativo. Obrigada por me ajudar durante esses seis anos de pós-graduação. Você é um grande exemplo para todos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado: 141919/2016-7. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa no exterior: programa PDSE processo 88881.187095/2018-01.

Sumário

Resumo **2**

Abstract **3**

Introdução **4**

Atrofia do músculo esquelético 4

Caquexia 4

Secretoma tumoral 6

Vias moleculares e citocinas associadas à caquexia 7

Via ubiquina-proteassomal 7

Via de sinalização IGF1-AKT-FOXO 8

Sistema autofágico-lisossomal 8

IL-6 na caquexia associada ao câncer 10

MicroRNAs e a regulação da expressão gênica 11

MicroRNAs em doenças do músculo esquelético 13

Justificativas e Objetivos **16**

Referências **19**

Capítulo I - MicroRNA-regulated networks in skeletal muscle cells treated with interleukin-6: the potential role of miR-497 in muscle wasting **26**

Capítulo II - The pathway to cancer cachexia: microRNA-regulated networks in muscle wasting based on integrative meta-analysis **62**

Capítulo III - The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers **99**

Conclusões Finais **137**

Atividades Complementares **138**

Integração de dados de transcriptoma e microRNoma para identificação de redes regulatórias, mediadores e biomarcadores da caquexia associada ao câncer.

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome metabólica complexa caracterizada pela perda de massa muscular, com ou sem perda de tecido adiposo, a qual não pode ser revertida por suporte nutricional. Pacientes com essa síndrome apresentam alterações funcionais em processos fisiológicos, metabólicos e imunológicos que resultam em um desequilíbrio energético e proteico. A caquexia associada ao câncer afeta até 80% dos pacientes em estágios avançados da doença, e representa a causa de morte de até 20% de todos os pacientes. Tipos específicos de tumores, como o de pâncreas, esôfago, estômago, cabeça e pescoço e pulmão apresentam uma alta prevalência de caquexia e, em contrapartida, os pacientes acometidos por câncer de mama ou próstata apresentam um menor risco de desenvolver a síndrome. As vias moleculares responsáveis pela caquexia não estão completamente esclarecidas, entretanto, evidências sugerem que citocinas pró-inflamatórias possuem um papel fundamental no desenvolvimento de alterações metabólicas que resultam na perda de função e massa muscular. A complexidade dessas alterações também sugere o envolvimento de moléculas reguladoras pós-transcricionais, como os microRNAs (miRNAs). Essas moléculas trabalham de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum, sendo consideradas ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos. O presente trabalho realizou três estratégias diferentes para identificar redes regulatórias, mediadores e biomarcadores da caquexia associada ao câncer. No primeiro capítulo, avaliamos o perfil de expressão de miRNAs na atrofia de células musculares esqueléticas induzida por IL-6, uma importante molécula indutora de caquexia. Essa análise identificou o miR-497 associado a um potencial mecanismo anti-atrófico em resposta à IL-6. No segundo capítulo, como há uma diversidade de modelos experimentais, heterogeneidade entre pacientes e tipos tumorais nos estudos de caquexia, realizamos uma revisão sistemática e meta-análise para integrar dados de mRNAs e miRNAs do músculo esquelético na caquexia associada ao câncer. Essa estratégia identificou vias moleculares, novas interações entre mRNAs e miRNAs e potenciais alvos de drogas para a síndrome. No último capítulo, considerando que a prevalência da caquexia varia de acordo com o tipo tumoral, avaliamos dados de transcriptoma de 12 tipos tumorais humanos (4.651 amostras) comparadas com os respectivos tecidos não doentes (2.737 amostras). Nossos dados mostram um perfil tumor-específico de mediadores de caquexia e observamos que os tumores que apresentam uma alta prevalência de caquexia possuem um número elevado de fatores indutores de caquexia. Além disso, a expressão desses mediadores está associada a um pior prognóstico (sobrevida). Em conjunto, esses resultados poderão servir de base para estudos funcionais e desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas visando a minimização da perda de massa muscular, aumentando assim a sobrevida e a melhora da qualidade de vida dos pacientes com caquexia.

Transcriptome and microRNome integration to identify regulatory networks, mediators and biomarkers of cancer cachexia

Cancer cachexia is a complex metabolic syndrome characterized by muscle mass loss, with or without loss of adipose tissue, which cannot be reversed by nutritional support and leads to progressive functional impairment. Patients with this syndrome have functional changes in physiological, metabolic and immunological processes that result in energy and protein imbalances. Cachexia affects up to 80% of patients in advanced stages of cancer, and represents the cause of death for up to 20% of all cancer patients. Specific types of tumors, such as pancreas, esophagus, head and neck, stomach, and lung, have a high prevalence of cachexia and, similarly, patients with these neoplasms have greater weight loss. In contrast, patients with breast or prostate cancer have a lower risk of developing the syndrome. The molecular pathways responsible for cancer cachexia are not completely understood, but evidence suggests that pro-inflammatory cytokines play a fundamental role in the development of metabolic changes that result in function and muscle mass loss. The complexity of these changes also suggests the involvement of post-transcriptional regulatory molecules, such as microRNAs (miRNAs). These molecules work in an orchestrated way to control a common biological pathway or function, being considered efficient tools for determining specific pathways involved in diseases or biological processes. The present work carried out three different strategies to identify regulatory networks, mediators and biomarkers of cachexia associated with cancer. In the first approach, we evaluate the expression profile of miRNAs in skeletal muscle cells atrophy induced by IL-6, an important cachexia-inducing molecule. This analysis identified miR-497 as a miRNA associated with a potential anti-atrophic mechanism in response to IL-6. In the second strategy, as there is a diversity of experimental models and heterogeneity between patients and tumor types in cachexia associated with cancer, we integrate data from skeletal muscle mRNAs and miRNAs in this syndrome, obtained in the literature from a systematic review and meta-analysis. This strategy identified molecular pathways, new interactions between mRNAs and miRNAs, and potential drug targets for the syndrome. In the last approach, considering that the prevalence of cachexia varies according to the tumor type, we evaluated transcriptome data from 12 human tumor types (4,651 samples) compared with the respective non-diseased tissues (2,737 samples). Our data show a tumor-specific profile of cachexia mediators, and that tumors that have a high prevalence of cachexia have a high number of cachexia-inducing factors. In addition, the expression of these mediators is associated with a worse prognosis. Together, these results may be useful as a basis for functional studies and to the development of future therapeutic strategies aimed at minimizing the loss of muscle mass, thus increasing survival and improving the patients' quality of life.

Introdução

Atrofia do músculo esquelético

O músculo esquelético compreende aproximadamente 40-50 % da massa corpórea em humanos e é responsável por funções básicas como locomoção, metabolismo e respiração, além de apresentar uma alta plasticidade em resposta às mudanças nas demandas funcionais; exercícios de resistência induzem a hipertrofia do músculo esquelético, a qual é caracterizada por aumento na síntese de proteínas, no diâmetro fibra e na produção de força [1,2]. Contrariamente, condições de desuso, imobilização, repouso prolongado em leito, desnervação, microgravidade, envelhecimento e restrição alimentar resultam em perda de massa muscular, conhecida como atrofia do músculo esquelético [3–6].

Em condições catabólicas como câncer, sepse, queimadura, insuficiência cardíaca e AIDS, o tecido muscular, por ser um reservatório de proteína do corpo, atua como fonte de aminoácidos que podem ser utilizados para a produção de energia por vários órgãos (incluindo o coração, fígado e cérebro). No entanto, a degradação excessiva de proteínas e a perda de músculo resultante são altamente prejudiciais e podem levar à morte desses pacientes [7]. Além disso, a perda exacerbada de massa muscular é um indicador de prognóstico desfavorável e pode prejudicar a eficácia de muitos tratamentos terapêuticos [7,8]. Assim, a atrofia muscular agrava as doenças, aumentando a morbidade e a mortalidade. Portanto, a manutenção de músculos saudáveis é crucial para prevenir distúrbios metabólicos, manter um envelhecimento saudável e fornecer energia aos órgãos vitais durante condições de estresse (para revisão, ver Bonaldo e Sandri 2013) [7].

Estudos demonstram que a atrofia do músculo esquelético é controlada pela ação coordenada de vias reguladoras chaves envolvendo IGF1-AKT-FoxO, miostatina, citocinas inflamatórias e o fator transcricional NF-kappa B (NF-kB) [3,9] [para revisão, ver Braun & Gautel 2011[10]]. Posteriormente, vários sistemas de proteólise, tais como o que envolve as proteases lisossomais (catepsinas), as calpaínas dependente de cálcio e o proteassomal dependente de ubiquitina são ativados para degradação da maioria das proteínas musculares [4,5,11].

Caquexia

A atrofia do músculo esquelético é um fenômeno comum em várias condições sistêmicas crônicas como septicemia, insuficiência cardíaca crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica, diabetes, AIDS e câncer [12–14]. Essas condições podem ser acompanhadas de uma síndrome metabólica complexa caracterizada pela diminuição de massa muscular, com ou sem diminuição de massa gorda, denominada de caquexia [12,14–16]. A característica clínica mais proeminente

da caquexia é a perda de peso nos adultos (corrigida pela retenção fluídica) ou o distúrbio de crescimento nas crianças (excluindo desordens endócrinas) [15,16]; além disso, sabe-se que esta síndrome não pode ser revertida por suporte nutricional convencional [16].

A caquexia emerge a partir de alterações metabólicas do organismo em resposta a uma dessas condições crônicas, como por exemplo, o câncer. Nessa condição, as citocinas liberadas pelo tumor ganham a circulação sanguínea e são responsáveis por gerar uma inflamação sistêmica que afeta diversos órgãos como o cérebro e o fígado, e tecidos como o adiposo e muscular, com consequente indução de anorexia, fadiga, anemia, aumento da termogênese e, principalmente, perda de massa muscular, a qual pode ou não ser acompanhada de perda do tecido adiposo (**Figura 1**) [16–18].

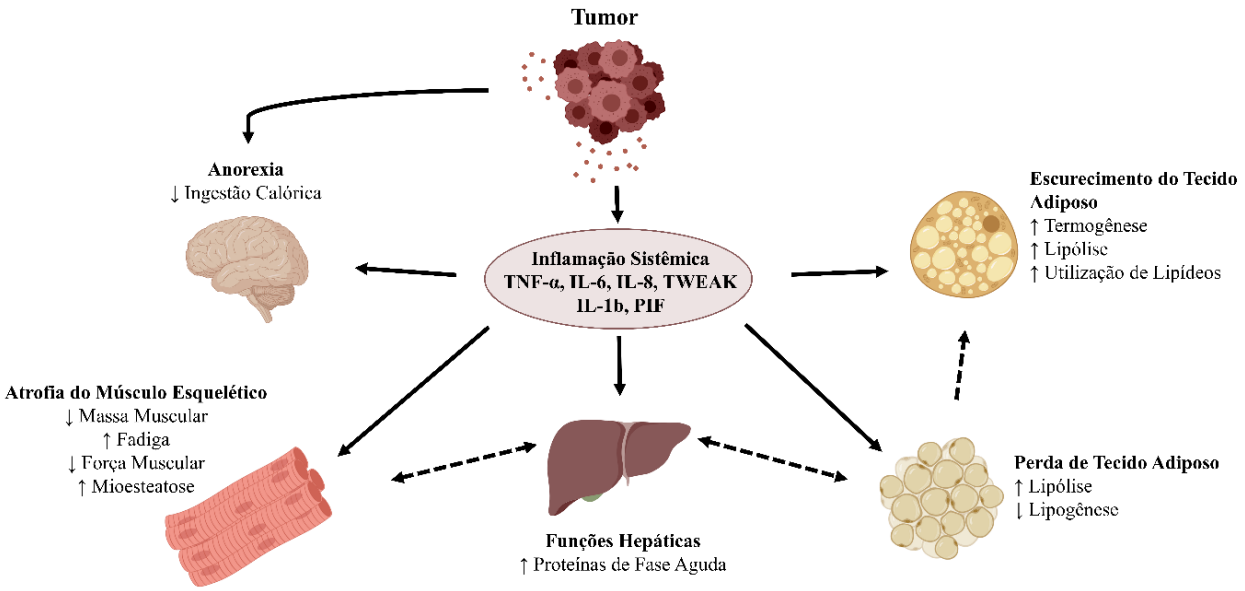


Figura 1. Alterações metabólicas na caquexia associada ao câncer. Citocinas são secretadas pelo tumor e levam a alterações metabólicas em diversos tecidos, tais como: modificação do controle neuroendócrino do apetite; redução da função e massa muscular; escurecimento e perda do tecido adiposo; e aumento da síntese de proteínas de fase aguda no fígado [adaptado de Tsoli & Robertson [19]].

A diminuição na ingestão do alimento e perda de massa corpórea resultam numa condição de astenia, imobilidade e insuficiência respiratória ou cardíaca [12]. O estado caquético é particularmente importante no câncer, representando pobre prognóstico e diminuição da resposta ao tratamento rádio e quimioterápico [13]. Além disso, sabe-se que a caquexia afeta cerca de 50% dos pacientes quando todos os tipos de tumores são considerados [20]; até 83% dos pacientes com câncer gástrico ou pancreático desenvolvem caquexia [13,17,19,21] (**Tabela 1).**

Tabela 1. Incidência de perda de peso em diferentes tipos de tumores (adaptado de Laviano 2005 [20])

Tumor	Incidência de Perda de Peso (%)
Pâncreas	83
Gástrico	83
Esôfago	79
Cabeça e Pescoço	72
Colorretal	55-60
Pulmão	50-60
Próstata	56
Mama	10-35
Outros	63

A etiologia da caquexia associada ao câncer em diferentes tipos tumorais envolve interações tumor-hospedeiro muito complexas e específicas que ainda precisam ser completamente elucidadas. A ação combinatória de mediadores solúveis (mediadores caquéticos) secretados por células tumorais e células não-tumorais do microambiente tumoral (MAT), incluindo citocinas pró-inflamatórias, contribuem para uma inflamação sistêmica, e atuam diretamente no músculo esquelético, induzindo a perda de massa muscular [19,22–24].

Secretoma tumoral

Recentes avanços na genômica, transcriptômica e proteômica tem auxiliado a esclarecer os efeitos de citocinas e fatores solúveis do MAT através da análise do secretoma tumoral [22]. O secretoma representa o conjunto de macromoléculas secretadas por células, as quais permitem a comunicação celular [25,26]. O termo secretoma foi cunhado por Tjalsma *et al.*[27] para denotar todos os fatores secretados por uma célula e, também, os constituintes da via secretória. A definição de secretoma foi posteriormente revisada para incluir apenas proteínas secretadas no espaço extracelular [24, 25].

O secretoma tumoral apresenta um papel importante em processos biológicos do câncer tais como proliferação celular, apoptose, angiogênese, alterações no metabolismo energético e desenvolvimento de resistência contra a terapias anticâncer [25]. O secretoma pode ser avaliado pela análise do meio condicionado de linhagens celulares, de líquidos intersticiais do tecido ou tumor, e de fluídos corporais (revisado por Schaaij-Visser *et al.*[28]). Portanto, a análise do secretoma tem grande pontencial para revelar mediadores, biomarcadores e alvos para tratamento da caquexia associada ao câncer.

Algumas abordagens transcriptômicas e algoritmos emergentes para predição de sequências peptídeo-sinal tornaram-se ferramentas úteis para identificar o perfil do secretoma [29] e também revelaram que uma grande fração de proteínas enriquecidas nos tecidos humanos é secretada [30]. Utilizando essa abordagem, um estudo recente apresentou uma análise *Pan-Cancer* da expressão gênica de componentes do secretoma, a qual resultou em candidatos a biomarcadores diagnósticos detectáveis em fluidos biológicos [31]. Essa investigação também revelou os padrões e as funções biológicas associadas às alterações na expressão de proteínas secretadas em diferentes tipos tumorais.

Com o avanço de tecnologias para a análise de expressão gênica na última década e os experimentos em larga escala, grandes quantidades de dados estão gerados e estão sendo depositados em bancos públicos, tornando-se acessíveis para toda comunidade científica [32]. A integração de dados ômicos disponíveis em bancos de dados é capaz de gerar respostas biológicas, que, talvez, em estudos individuais não pudessem ser obtidos [32]. A reutilização dos dados disponíveis em bancos públicos podem auxiliar na identificação de novas vias moleculares e mediadores caquéticos que são potencialmente secretados pelas células tumorais.

Vias moleculares e citocinas associadas à caquexia

As vias moleculares responsáveis pela caquexia não estão completamente esclarecidas, entretanto, evidências sugerem que citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1β (IL-1β), fator de necrose tumoral (TNF)-α, interferon (INF)-γ e interleucina-6 (IL-6) possuem um papel fundamental, principalmente no desenvolvimento de alterações celulares e moleculares em células musculares [33,34]. Essas citocinas acarretam a ativação de diferentes vias, tais como: *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-kB), *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT), MAP kinase family (MAPKs) e *Activator Protein 1* (AP-1). A transdução de sinal para os fatores de transcrição NF-kB e STAT tem um papel fundamental, especialmente durante as alterações celulares e moleculares que resultam na regulação de genes envolvidos em três principais vias moleculares: a) sistema proteossomal dependente ubiquitina, b) Via de sinalização IGF1-AKT-FoxO e c) sistema autofágico-lisossomal; que resultam em um desequilíbrio entre a síntese e a degradação das proteínas musculares, acarretando diminuição na massa e função muscular [35].

Via ubiquina-proteassomal: a degradação de proteínas através do sistema proteossomal dependente de ubiquitina é a principal via de proteólise, não lisossômica, de proteínas intracelulares. As proteínas são direcionadas para a degradação, por modificação covalente com a ubiquitina. Essa ativação requer ações coordenadas de três enzimas: enzimas ativadoras de ubiquitina (E1), enzimas

conjugadoras de ubiquitina (E2) e ubiquitina ligases (E3) que reconhecem a proteína específica que será ligada à ubiquitina para posterior degradação nos proteossomos [36]. O papel central das ligases de ubiquitina E3 na atrofia do músculo esquelético geralmente é devido à redução da síntese proteica, aumento da degradação, ou um desequilíbrio relativo entre os dois processos [36,37]. Esses mediadores de sinalização regulam a expressão das ligases E3, como o *Tripartite Motif Containing 63-E3 Ubiquitin Protein Ligase*, TRIM63 (MuRF1, na Figura 2) e *F-Box Protein 32*, FBXO32 (Atrogin-1, na Figura 2), que atuam na degradação das proteínas sarcoméricas e na inibição da síntese proteica [7,36]. Atrogin-1 induz a ubiquitinação de um eIF3f, que faz atua principalmente na maquinaria de tradução de proteínas [38].

Via de sinalização IGF1-AKT-FOXO: O conteúdo total de proteínas no interior da fibra muscular é regulada por uma interação entre os processos de síntese e degradação de proteínas [39]. Um dos mecanismos mais caracterizados de síntese proteica é o da sinalização de IGF1 (*insulin-like growth factor 1*). A via que acarreta a hipertrofia durante a ativação do IGF1 é IRS1/PI3K/AKT/mTOR [40] (**Figura 2**). O AKT induz a ativação da síntese proteica bloqueando a repressão do mTOR, que por sua vez mantém a massa muscular através de dois complexos distintos, conhecidos como TORC1 e TORC2 [40]. A TORC1 estimula a via da p70S6 quinase e 4E-BP, que ativam a formação do complexo ribossomal, com consequente indução da síntese de proteínas [41].

Sistema autofágico-lisossomal: Em condições de atrofia, além da proteólise mediada por ubiquitina, há a indução da autofagia que contribui para a degradação de proteínas musculares e, consequentemente, para a atrofia muscular [42]. Na autofagia, as organelas são sequestradas em vacúolos autofágicos que se fundem com lisossomos e tornam-se digeridas por enzimas lisossômicas [43]. Os genes de autofagia e o sistema proteolítico lisossômico são ativados durante a desnervação e câncer e, em ambos os casos, contribuem para a atrofia através da atividade de FOXO [44] (**Figura 2**). Estudos demonstraram que o análogo à proteína AKT, a FOXO3 é regulada negativamente pela PGC-1α. O PGC-1α é regulada negativamente nos músculos de ratos portadores de tumor e em outras condições de perda de massa muscular, e o aumento da expressão gênica de PGC-1α é capaz de amenizar a perda de músculo, através da inibição de FOXO3 e pela produção de produtos metabólicos [45].

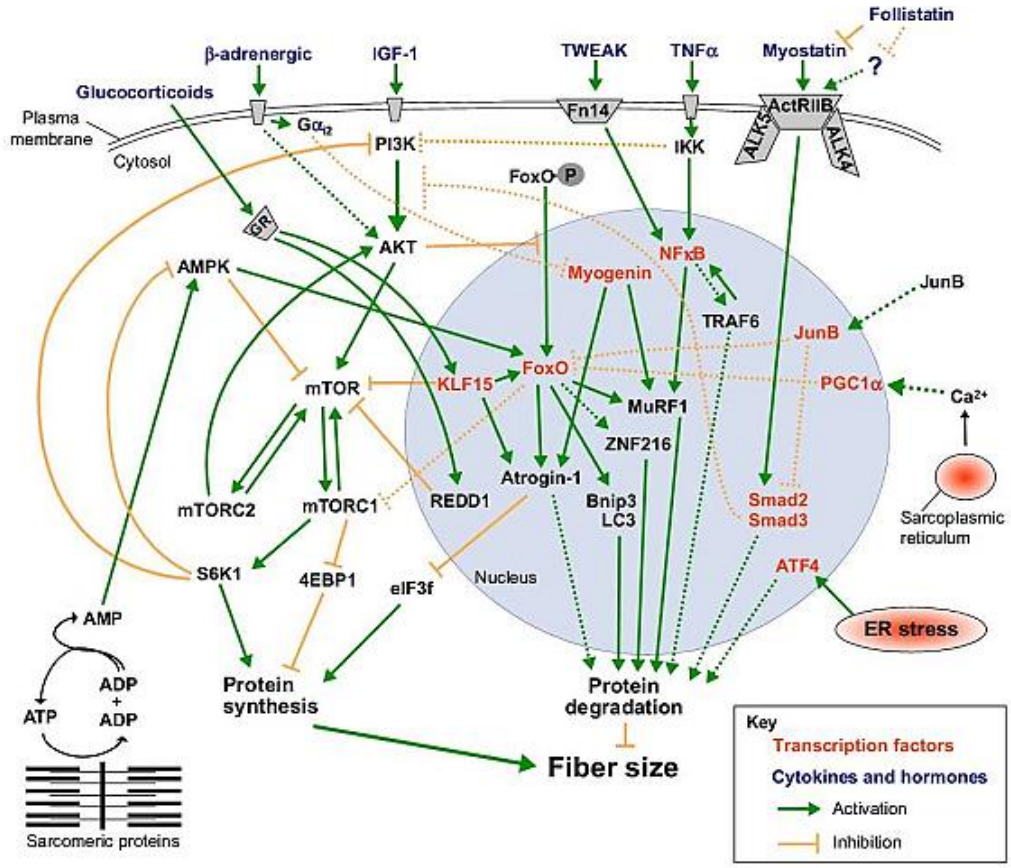


Figura 2. Principais vias que controlam a massa proteica da fibra muscular. A síntese e a degradação de proteínas são reguladas por vários estímulos diferentes, que ativam múltiplas vias de sinalização, muitas das quais convergem em elementos intermediários comuns. Linhas pontilhadas descrevem vias nas quais os mecanismos moleculares ainda não foram completamente esclarecidos no músculo esquelético adulto [adaptado de Bonaldo et al, 2013 [7]].

Além das vias mencionadas acima, destacamos que diversos autores já avaliaram os mecanismos pelos quais as citocinas pro-inflamatórias induzem isoladamente a degradação de proteínas em células musculares [46–51]. Também já foi descrito que altos níveis de citocinas inflamatórias causam alterações na matriz extracelular que impedem a regeneração de fibras musculares [52,53]. Um estudo demonstrou que as citocinas catabólicas IL-1α, TWEAK, IL-1β e TNF-α induzem efeitos catabólicos mediada pelo fator transcricional p65 em cultura de miotubos [51]; ainda segundo esses autores, a atrofia de miotubos induzida isoladamente pela IL-6 é a única independente do p65 e os mecanismos moleculares ainda não estão completamente esclarecidos. Além disso, foi descrito uma correlação inversa entre altos níveis de IL-6 e o tempo de sobrevida de pacientes com câncer em estágio avançado, sugerindo que essa citocina possui um valor prognóstico importante em pacientes com caquexia associada ao câncer [54].

IL-6 é uma citocina pleiotrópica e, além do seu papel na atrofia de células musculares, também é essencial para cicatrização e regeneração de tecidos, tumorigênese, produção de proteínas de fase aguda do fígado [55,56] e hipertrofia do tecido muscular [57]. Durante o exercício físico, há um aumento na concentração circulante de diversas citocinas, incluindo a IL-6, a qual é produzida pelo próprio músculo esquelético em regeneração e em condições hipertróficas [58,59]. Além disso, a IL-6 apresenta uma importante função como um regulador da ativação de células satélites, uma vez que a deficiência de IL-6 prejudica a ativação da STAT3 e a expressão de seu alvo Ciclina D1 e, consequentemente, deprime a proliferação de células satélites [60]. Esses efeitos paradoxais da IL-6, a qual atua em processos distintos, como hipertrofia e atrofia muscular, tem sido atribuídos a uma função temporal dessa citocina, e pode estar relacionado às respostas distintas entre as exposições aguda ou crônica à IL-6 [61].

A função da IL-6 envolve ativação dos leucócitos, particularmente através da diferenciação de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório [62]. A família da citocina IL-6 compartilha o receptor secundário glicoproteína 130 (gp130). O complexo IL-6 / mIL-6R (receptor de membrana IL-6R) recruta duas subunidades gp130 para induzir a ativação da via JAK/STAT (Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription) e da sinalização da via ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinases). A fosforilação da STAT-3 conduz à transcrição de SPE-3, um regulador negativo da sinalização de IL-6 [63,64]. A sinalização clássica da IL-6, limitada pela expressão celular de mIL-6R leva à proliferação, regeneração e resposta de fase aguda (APR) em tecidos-alvos [65]. No entanto, em condições crônicas como caquexia associada ao câncer, a ativação prolongada da proliferação e APR pode levar a tumorigênese e hipermetabolismo, conduzindo ao recrutamento adaptativo do sistema imune e da sinalização de IL-6R (sIL-6R) solúvel.

IL-6 na caquexia associada ao câncer

Diversos trabalhos demonstraram que a perda muscular durante a caquexia associada ao câncer possui dois mecanismos: um envolvendo a supressão da síntese de proteínas e outro relacionado à ativação de diversas vias de degradação de proteínas [66–68]. Adicionalmente, os níveis de IL-6 estão elevados em pacientes com câncer e modelos experimentais de caquexia [69–71] e, dentre esses, a IL-6 está envolvida com a perda de massa muscular de camundongos com caquexia associada ao câncer de cólon-26 (C26) e a caquexia associada ao carcinoma cervical uterino [70–79]. A suramina, um antagonista da IL-6 ao seu receptor, diminui acentuadamente a taxa de caquexia em camundongos portadores de tumores C26 [70], enquanto que a utilização de anticorpos neutralizadores contra IL-6 levam a uma diminuição da perda de massa muscular em ratos com carcinoma cervical uterino [71]. A inibição da IL-6 utilizando o anticorpo contra o receptor solúvel (sIL-6R) também reduz a atrofia muscular em

modelo de câncer intestinal utilizando camundongos com câncer colorretal [80]. Em humanos, estudos demonstraram que a IL-6 é um indicador muito sensível para perda de massa muscular em pacientes com câncer de cólon [81,82] e câncer de pulmão [83]. Assim, a citocina IL-6 permanece como uma estratégia terapêutica promissora para atenuar a progressão da caquexia em diversos tipos de câncer. No entanto, ainda é necessária uma melhor compreensão dos efeitos diretos e indiretos da IL-6, bem como entender melhor suas funções em diferentes tecidos, incluindo tecido muscular, de pacientes com câncer.

Embora alguns componentes das vias moleculares envolvidas na atrofia de células pela IL-6 já tenham sido descritos, ainda é necessário elucidar os mecanismos globais de controle da expressão gênica responsáveis pelas alterações moleculares na atrofia muscular induzida por essa citocina durante a caquexia. A complexidade desses mecanismos de controle da expressão gênica nesse processo sugere o envolvimento de moléculas reguladoras adicionais, como os microRNAs (miRNAs); essas pequenas moléculas de RNA não codificantes regulam a função do músculo esquelético durante o desenvolvimento e estão envolvidas em diversas doenças musculares [84].

MicroRNAs e a regulação da expressão gênica

MiRNAs são pequenos RNAs reguladores não codificantes com tamanho variando de 17 a 25 nucleotídeos (ver miRBase, http://microrna.sanger.ac.uk/). A definição de miRNA é baseada na sua formação pela ação da enzima RNase III (Dicer), uma RNase que processa precursores com estrutura de *hairpin* (conhecidos como pré-miRNA) originando o miRNA maduro [85]. Essas moléculas reprimem pós-transcricionalmente a expressão proteica pelo reconhecimento de locais complementares na região 3’ não traduzida (3’ UTR) de seus RNAs mensageiros (mRNA) alvos.

Atualmente, estão registrados no banco de dados miRBase (miRBase v. 22.1, outubro 2018) mais de 50492 miRNAs de 285 organismos e são conhecidos atualmente 2883 miRNAs maduros humanos e 2110 miRNAs maduros em camundongos. Os miRNAs são nomeados como miR- mais números (ex: miR-133), entretanto, existem algumas exceções. Os miRNAs de sequências similares são geralmente distinguidos por uma letra adicional seguida do número do miRNA (ex: miR-133a). Um miRNA com uma sequência madura idêntica pode aparecer em diferentes *loci* genômicos com diferentes sequências precursoras, nesses casos, os diferentes genes de miRNA são usualmente distinguidos por outro número adicional no final da sequência (ex: miR-133a-1).

A biogênese de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito primário conhecido como pri-miRNA. Os pri-miRNAs são preferencialmente transcritos pela RNA polimerase II e possuem estrutura de *cap* na sua região *5’* e a cauda de poli (A) na sua região 3’UTR [86–88]. Entretanto, a RNA polimerase III é responsável por gerar um conjunto menor de miRNAs, a partir da transcrição

de miRNAs localizados em repetições genômicas do tipo Alu [89]. No núcleo, o pri-miRNA é processado para pré-miRNA pela enzima RNAse III (Drosha), a qual requer um cofator, a proteína DGCR8 (*DiGeorge Syndrome critical region gene 8*) em humanos (Pasha em *D. Melagonaster* e *C. Elegans*) [90–93]. A DGCR8 forma com a Drosha um grande complexo conhecido como complexo microprocessador, que em humanos possui ~650 kDa [91–93]. Esse complexo microprocessador reconhece e cliva o pri-miRNA, originando uma molécula com estrutura de *hairpin* de aproximadamente 70 pb, o pré-miRNA [94,95]. Um subconjunto de miRNAs, conhecidos como miRtrons utiliza uma via alternativa, na qual os pré-miRNA são derivados como produto secundário de um evento de *splicing*, sem a necessidade de processamento pela Drosha [96–98]. Após o processamento nuclear, cada pré-miRNAs é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (EXP5), membro da família de receptores de transporte sendo convertido para miRNAs maduro e funcional pela Dicer nuclear [99–101]. Após a clivagem pela Dicer, a molécula de dupla fita de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos associa-se à proteína Argonauta para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) [102]. Uma das fitas de aproximadamente 22 nucleotídeos do RNA dupla fita permanece na proteína Argonauta como o miRNA maduro (fita guia ou miRNA), enquanto a outra fita (fita passageiro ou miRNA) pode ser degradada ou, em algumas situações, ambas as fitas podem atuar como fita guia e/ou passageiro [103–105]. Da mesma maneira como ocorre a seleção de um siRNA [106,107], a fita que possui sua extremidade 5’ formando o duplex mais instável com sua fita parceira parece preferencialmente sobreviver como o miRNA no RISC [95,106,107]. O complexo miRNA-RISC interage com sítios ligantes da região 3' UTR do RNA mensageiro alvo inibindo a expressão ou degradando o RNA mensageiro alvo [108,109]. A interação entre o RNA mensageiro alvo e o complexo miRNA-RISC ocorre devido à complementaridade total ou parcial de uma sequência de 5-7 nucleotídeos do miRNA e do RNA mensageiro alvo [108,110].

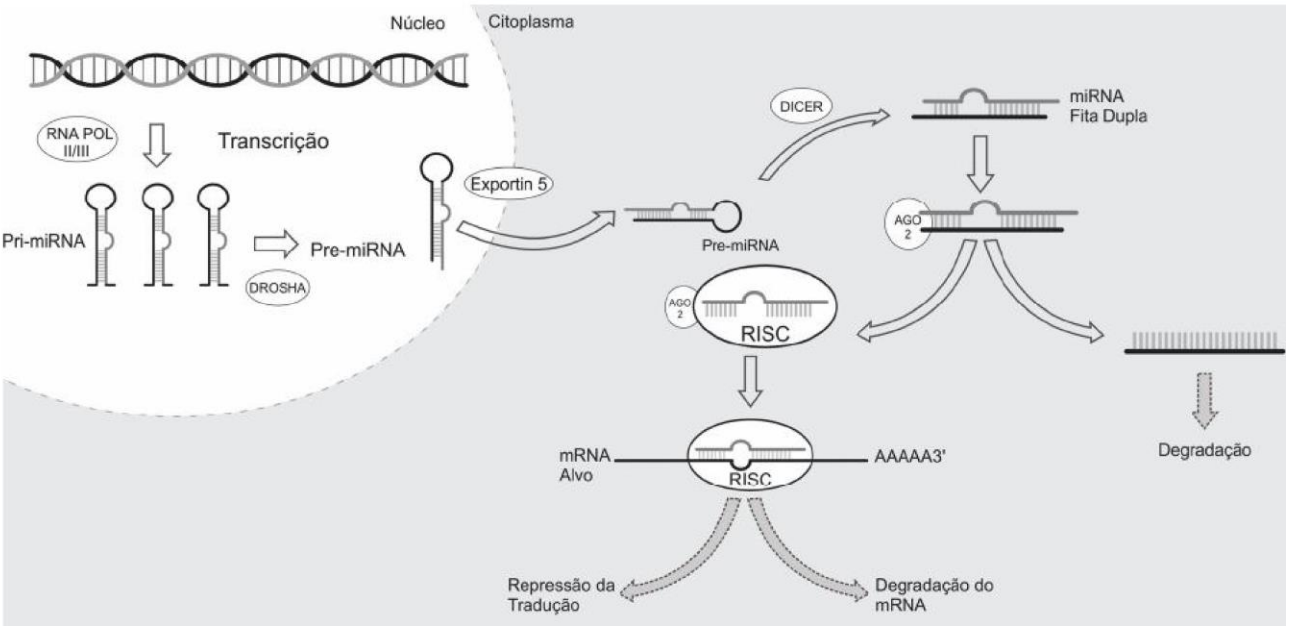


Figura 3. Biogênese e principais mecanismos de ação dos miRNAs. A enzima RNA polimerase II realiza a transcrição dos miRNAs primários (pri-miRNA). O complexo enzimático *Drosha* cliva os grampos formando precursores do miRNA (pre-miRNA), os quais são carreados ao citoplasma e associados ao complexo *Exportin-5-Ran-GTP-dependent (Exportin 5)*. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pelo complexo *Dicer*, perdendo a configuração em grampo. O miRNA fita-dupla formado associa-se à proteína Argonauta 2 e uma das fitas é acoplada ao complexo de proteínas que reprime a expressão do gene alvo (RISC), enquanto a outra é degradada. O RISC, contendo o miRNA, liga-se ao mRNA-alvo, reprimindo a sua tradução ou promovendo a sua degradação [Adaptado de Campos et al.2011 [111]].

Estima-se que cada miRNA possa se ligar a muitos RNAs mensageiros, e que os RNAs mensageiros podem ter sua estabilidade ou tradução regulada por mais de um miRNAs [112]. Os miRNAs trabalham de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum [113,114]; essa característica única dos miRNAs os tornam ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos.

MicroRNAs em doenças do músculo esquelético

Atualmente, embora o número de genes relacionados com o desenvolvimento de doenças musculares aumente a cada ano e a patologia histológica do tecido esteja bem documentada, as vias moleculares envolvidas permanecem pouco compreendidas [115]. Porém, importantes estudos indicam que a expressão de miRNAs está alterada em doenças do músculo esquelético e, em alguns casos, um único miRNA pode causar a doença [116,117]. Um importante miRNA para o músculo esquelético, o miR-206, encontra-se elevado no músculo diafragma do camundongo mdx (também conhecido como Dmd),

modelo animal de distrofia muscular [118]. De maneira semelhante, foi demonstrado em um modelo de atrofia muscular em ratos, que o nível de expressão do miRNA músculo específico miR-499 também está aumentado, sugerindo a ativação da rede MyomiR, codificada por genes de cadeia pesada de miosina, nessa condição [119]. Por outro lado, os níveis de expressão do miR-1 e do miR-133a estão diminuídos num modelo de hipertrofia do músculo esquelético em camundongos [116]. Em adição a esses estudos da expressão de miRNAs em doenças musculares, uma ligação genética direta conectou o miRNA com a hipertrofia muscular [120]. Uma mutação que é responsável pela excepcional muscularização da ovelha *Texel* foi mapeada como uma única mutação G/T dentro da região 3' UTR do RNA mensageiro que codifica a proteína miostatina, um membro da família do fator de crescimento transformante (TGFβ); a miostatina é regulador negativo do crescimento muscular. Essa mutação cria um sítio de ligação para os miRNAs miR-1 e miR-206, levando à repressão da tradução da miostatina, a qual origina um fenótipo semelhante à "dupla musculatura" resultante da perda da miostatina em camundongos, ratos e humanos [121,122]. Também foi demonstrado um mecanismo envolvendo interações genéticas entre os fatores transcricionais NF-κB e YYI e o miR-29; esse miRNA regula a diferenciação de mioblastos e funciona como um supressor tumoral em rabdomiosarcomas, um tumor resultante da desregulação da proliferação de células progenitoras musculares [123]. Além disso, estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram o papel do miR-29b na atrofia muscular de ratos com insuficiência cárdica [124] e do miR-155 durante os processos de proliferação e diferenciação da miogênese [125]. Esses estudos demonstram a importância da regulação mediada por miRNAs para o controle de expressão de transcritos, em diferentes condições associadas com a manutenção e desenvolvimento do tecido muscular. Entretanto, considerando-se a complexidade desses mecanismos de regulação, muitos estudos envolvendo os perfis de expressão de miRNAs e mRNAs em escala global têm auxiliado na identificação das principais vias moleculares relacionadas com a perda de massa muscular, como descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2. Estudos do perfil genômico global de miRNA e/ou mRNAs na atrofia muscular.

Condição Experimental de Atrofia	Pefil Gênomico	Plataforma	Vias identificadas	Ref.
Imobilização muscular (ratos)	mRNA	DD	A	[36]
Restrição alimentar (ratos)	mRNA	Microarray	A	[126]
Suspensão dos membros (ratos)	mRNA	Microarray	A,B,C,D,E,F	[127]
Sarcopenia (humanos)	mRNA	Microarray	G,H,I,J,K,L	[128]
Privação do meio de cultura (células C2C12)	mRNA	Microarray	A,C,F,I	[129]
Tratamento com TNF-α/INF-γ (células C2C12)	mRNA	Microaray	A,F,M,N	[130]
Suspensão dos membros (ratos)	miRNA	Microarray	O,P	[119]
Tratamento com TNF-α (células C2C12)	mRNA	Microarray	A,I,M,N,Q	[131]
Tratmento com TWEAK (células C2C12)	mRNA e miRNA	Microarray e TLDA	A,C,F,G,I,L,M,O	[132]
Tratamento com TNF e IGF (células C2C12)	mRNA e miRNA	Microarray e TLDA	M, Q, R	[50]
Modelo de cancer-caquexia (camundongos)	mRNA	Illumina HiSeq	F, I, J, S	[74]
Modelo de cancer-caquexia (camundongos)	mRNA	Illumina HiSeq	A, E, I, S	[75]
Modelo de cancer-caquexia (camundongos)	mRNA	Microarray	I, S	[76]
Caquexia associada ao câncer (humanos)	miRNA	TaqMan MiRNA Array	A, I, M, T	[133]
Caquexia associada ao câncer (humanos)	miRNA	Truseq Small RNA	D, I, M, Q	[134]
Modelos de atrofia muscular (camundongos)	miRNA	Microarray	A, T	[135]

Tabela 2. As principais vias/genes identificados foram: A) Sistema Proteassomal Dependente de Ubiquitina, B) Chaperonas, C) Estresse Oxidativo, D) Calpaínas, E) Proteases Lisossomais, F) Myod, G) MyhC, H) Transportador de Glutamina, I) Resposta imune e Citocinas Inflamatórias, J) Apoptose, K) Sistema de *Splicing*, L) Sinalização Wnt, M) Sinalização NFkB , N) Sistema iNOS, O) Rede MyomiR, P) miR-23, miR-221, miR-148b e miR-338, Q) Miogênese, R) miR-155, miR-206, miR-322, miR-335, miR-351 e miR-532 S) Sinalização JAK-STAT. T) Insulin signaling pathway. TLDA*: TaqMan low density array (Life Technologies,EUA);* DD: *Differential Display.*

Conclusões Finais

Considerando os resultados obtidos a partir das três estratégias empregadas, este trabalho pode elucidar redes moleculares, mediadores e biomarcadores na caquexia associada ao câncer. A partir de dados de transcriptoma e microRNoma, identificamos vias moleculares envolvidas com a caquexia, como interações citocina-citocina, vias ativadas pela cascata JAK-STAT, respostas inflamatórias, vias de resposta à insulina e ciclo celular. Também identificamos novas interações mRNA-miRNA que estão envolvidas com o processo de atrofia muscular da síndrome, dentre elas destacamos as interações do miR-497 com transcritos que participam da via de sinalização IGF1-AKT-FOXO. Por fim, utilizando dados de transcriptoma, pudemos identificar um conjunto tumor-específico de mediadores de caquexia em 12 cânceres humanos com diferentes prevalências de caquexia. Dessa forma, esses resultados possibilitaram a obtenção de novas informações e melhor compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que regulam o tecido muscular na caquexia. Além disso, os dados apresentados poderão ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que minimizem a perda de massa muscular, aumentando assim a sobrevida e a melhora da qualidade de vida dos pacientes com caquexia.