



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ELISANGELA CRISTINA PEREIRA LOPES

**ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DE MICRORNAS CIRCULANTES RELACIONADA
AO CÂNCER APÓS LESÃO MEDULAR**

***BIOINFORMATICS ANALYSIS OF CIRCULATING MICRORNAS RELATED TO
CANCER FOLLOWING SPINAL CORD INJURY***

CAMPINAS

2020

ELISANGELA CRISTINA PEREIRA LOPES

**ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DE MICRORNAS CIRCULANTES RELACIONADA
AO CÂNCER APÓS LESÃO MEDULAR**

***BIOINFORMATICS ANALYSIS OF CIRCULATING MICRORNAS RELATED TO
CANCER FOLLOWING SPINAL CORD INJURY***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título Mestra em Ciências na área de Clínica Médica

*Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences of the State
University of Campinas as a requirement to obtain the Master of
Sciences degree in the field of Clinical Medicine*

ORIENTADOR: ROBERTO SCHREIBER

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ELISÂNGELA CRISTINA PEREIRA LOPES, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. ROBERTO SCHREIBER.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

- L881a Lopes, Elisangela Cristina Pereira, 1989-
Análise bioinformática de microRNAs circulantes relacionada ao câncer após lesão medular / Elisangela Cristina Pereira Lopes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.
- Orientador: Roberto Schreiber.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
1. Traumatismos da medula espinal. 2. Neoplasias hematológicas. 3. Neoplasias esofágicas. 4. Neoplasias da bexiga. 5. MicroRNAs. I. Schreiber, Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Análise bioinformática de microRNAs circulantes relacionada ao câncer após lesão medular
Bioinformatics analysis of circulating microRNAs related to cancer following spinal cord injury

Palavras-chave em inglês:

Spinal cord injuries

Hematologic neoplasms

Esophageal neoplasms

Bladder neoplasms

MicroRNAs

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Roberto Schreiber [Orientador]

Gustavo Jacob Lourenço

Alessandro Gonzales Salerno

Data de defesa: 17-09-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8424-3528>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5199657001294557>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ELISÂNGELA CRISTINA PEREIRA LOPES

ORIENTADOR: ROBERTO SCHREIBER

MEMBROS:

- 1. Presidente da banca: DR. ROBERTO SCHEREIBER**
- 2. Membro titular: PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO**
- 3. Membro titular: PROF. DR. ALESSANDRO GONZALEZ SALERNO**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 17/09/2020

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me deu forças para vencer todas as dificuldades. A minha mãe Crystina (*in memoriam*), que infelizmente não pode estar presente neste momento tão importante da minha vida. Ao meu pai José e irmão Daniel, que sempre estão ao meu lado me apoiando e me ajudando. Ao meu filho Arthur, razão pela qual eu me levanto e batalho todos os dias.

Ao professor Dr. Roberto Schreiber pela oportunidade que me deu em seu laboratório, pelos ensinamentos e por toda ajuda e apoio durante o processo. Ao Dr. Wilson Nadruz Junior, pelo acolhimento em sua equipe e colaboração em todo o processo.

A minha amiga Dra. Layde, por toda a paciência e ensinamentos. A equipe de meninas do laboratório pelo apoio.

A todos que sempre torceram por mim não só nesta etapa, mas em todas da minha vida, mesmo não sendo citados aqui e que de certo modo me influenciaram e ajudaram.

RESUMO

Indivíduos com lesão medular (LM) possuem maior pré-disposição a desenvolverem alguns tipos de câncer, entre eles o câncer de bexiga, câncer esofágico e câncer hematológico. Estudos apontam que a desregulação de microRNAs pode estar relacionada com o processo de carcinogênese. Nesse estudo utilizando-se de ferramentas de bioinformática foram identificados os microRNAs e seus genes alvos relacionados aos três tipos mais frequentes de câncer em pacientes com LM, utilizando para isso os microRNAs diferencialmente expressos em pacientes com LM comparado com pacientes saudáveis em estudo prévio realizado pelo nosso grupo. O programa utilizado para a pesquisa dos microRNAs nas databases foi o MirWalk 2.0 e para criar a rede de interação microRNA gene alvo o software utilizado foi o CytoScape. Foram selecionados 23 microRNAs com expressão reduzida e 3 microRNAs com expressão aumentada em pacientes com LM. Associados ao câncer hematológico foram identificados 21 microRNAs com expressão reduzida e 3 microRNAs com expressão aumentada, os quais possuíam 69 genes alvo e 18 genes alvo respectivamente. Ao câncer de bexiga foram associados 19 microRNAs com expressão reduzida e 3 com expressão aumentada, possuindo 26 genes alvo nos microRNAs com expressão reduzida e 10 genes alvo nos microRNAs com expressão aumentada. Em relação ao câncer esofágico foi obtida associação com 20 microRNAs com expressão reduzida e 3 com expressão aumentada, onde há 24 genes alvo para os microRNAs de expressão reduzida e 15 genes alvo para os microRNAs de expressão aumentada. Dentre os microRNAs com expressão aumentada observamos três genes alvo comuns aos três tipos de câncer, sendo o MAPK1, MAPK3 e o TP53. Por sua vez, nos microRNAs com expressão reduzida foram encontrados também três genes alvo comuns aos três tipos de câncer, sendo o TP53, CCND1 e o KRAS. Nossa análise bioinformática conclui portanto, que há potencial influência de diversos microRNAs no desenvolvimento de câncer em paciente com LM.

Palavras chave: lesão da medula espinhal, câncer hematológico, câncer esofágico, câncer de bexiga, microRNAs.

ABSTRACT

Individuals with spinal cord injury (SCI) are more likely to develop some types of cancer, including bladder cancer, esophageal cancer, and hematological cancer. Studies show that microRNA deregulation may be related to the process of carcinogenesis. In this study, by the bioinformatics approach, microRNAs and their target genes related to the three most frequent types of cancer were identified in patients with SCI and compared to healthy patients from our previous study. The software used for researching microRNAs in databases was MirWalk 2.0 and to create the microRNA interaction network target gene was CytoScape. A total of 23 microRNAs with reduced expression and 3 with increased expression which had 69 target genes and 18 target genes respectively, were associated with hematological cancer. For bladder cancer, 19 microRNAs with reduced expression and 3 with increased expression, having 26 target genes, and 10 target genes respectively, were identified. Finally, we obtained an association with 20 microRNAs with reduced expression and 3 with increased expression, which had 24 target genes for microRNAs with reduced expression and 15 with increased expression for esophageal cancer. We found, among microRNAs with increased expression, three target genes that were common to the types of cancer, i.e., MAPK1, MAPK3, and TP53. In microRNAs with reduced expression, TP53, CCND1 and KRAS were described. We concluded a potential influence of several microRNAs on the development of cancer in SCI patient.

Keywords: spinal cord injury, hematological cancer, esophageal cancer, bladder cancer, microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Protocolo referente ao objetivo do estudo.....	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASIA	American Spinal Injury Association
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region in gene 8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LM	Lesão medular
miRNAs	MicroRNAs
RNase	RNA polimerase
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA_m	RNA mensageiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Lesão Medular	11
1.2. Câncer e fatores de risco	11
1.3. MicroRNAs.	12
1.4. MicroRNAs e biomarcadores	13
1.5. MicroRNAs como biomarcadores no câncer e lesão medular	14
2. OBJETIVOS	15
3. METODOLOGIAS	16
3.1. Seleção dos microRNAs	16
3.2. Análise bioinformática	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO GERAL	34
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Medular

A lesão da medula espinhal (LM) é caracterizada pelo dano à medula espinhal resultando em perda ou comprometimento da sensação ou movimento abaixo da região lesionada. Dentre as causas mais comuns de LM temos trauma, degeneração e doenças¹.

Nos Estados Unidos da América há aproximadamente 12.000 novos casos por ano, sendo que destes 4.000 vão a óbito antes de chegarem ao hospital. No Brasil a incidência é de 40 novos casos por ano por milhão de habitantes. Cerca de 80% das vítimas são homens entre 15 e 40 anos de idade. As causas traumáticas compreendem principalmente acidentes automobilísticos, ferimentos por projétil de arma de fogo e quedas, especialmente quedas de laje. As causas não traumáticas possuem um vasto leque de patologias como fraturas patológicas, estenose de canal medular, tumores intra e extra-medulares, deformidades graves da coluna, hérnia discal, isquemia, doenças autoimunes e infecciosas^{2,3}.

O indivíduo com lesão medular é classificado pela Associação Americana de Lesão Medular de acordo com a extensão da lesão, sendo: ASIA A: lesão completa, ou seja, sem preservação das funções motoras e sensoriais abaixo do nível de lesão; ASIA B: sem preservação da função motora e com preservação sensorial abaixo do nível de lesão; ASIA C: manutenção da função motora abaixo do nível de lesão, porém com força muscular menor que grau 3; ASIA D: função motora preservada abaixo do nível de lesão, porém com força muscular igual ou maior que 3; e ASIA E: funções sensoriais e motoras preservadas abaixo do nível de lesão⁴.

1.2. Câncer e fatores de risco

O câncer é considerado um problema de saúde pública no Brasil sendo a segunda maior causa de morte por doenças registradas. A concentração da população nos centros urbanos aumenta a exposição a fatores de riscos ambientais o que contribui para o crescente número de casos. Há grande interesse do poder público na detecção precoce da doença, pois o tratamento na fase inicial reduz o custo das terapias de fases avançadas e possíveis ressarcimentos por invalidez⁵.

O processo da oncogênese inicia-se a partir de uma alteração no DNA celular, levando essa célula a desempenhar funções para a qual não estava programada inicialmente. A alteração pode ocorrer em genes específicos denominados proto-oncogenes, que são inativos em células normais. Após sua ativação ele se torna um oncogene e inicia a mutação da célula normal para uma célula cancerosa. Esse processo é dividido em três estágios: estágio de iniciação, estágio de promoção e estágio de progressão. Diversos fatores promovem a iniciação e a progressão da carcinogênese, como a exposição prolongada ao tabaco, hormônios, doenças crônicas, fatores ambientais, entre outros⁶.

Pacientes com lesão medular sofrem alterações corporais ao longo do tempo, como metabolismo e regulação hormonal. Estudos apontam que pessoas com lesão medular possuem maior pré-disposição a desenvolverem câncer esofágico, de bexiga e hematológico^{7,8}.

O câncer de esôfago apesar de incomum é extremamente letal. Essa agressividade é observada nas taxas de mortalidade, as quais se aproximam das taxas de incidência. Sua classificação ocorre conforme as características histológicas, podendo ser carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma⁹. As neoplasias hematológicas originam-se do crescimento de células hematopoiéticas e tecidos linfóides, sendo responsáveis por 6,5% da incidência das neoplasias mundiais¹⁰.

Em 2017 estima-se que foram diagnosticados cerca de 79 mil novos casos de câncer de bexiga no Estados Unidos da América. Esse tipo de câncer é considerado o nono mais prevalente nas taxas de mortalidade¹¹. Pessoas com lesão medular possuem maior pré-disposição a desenvolverem câncer de bexiga^{12,13}. As células do trato urinário sofrem metaplasia para se adequarem as novas condições irritantes como urina relativamente estática, cateter interno e cálculos da bexiga. Durante o processo de metaplasia é normal que algumas células sofram displasia e iniciem um processo tumorigênico¹².

1.3. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenas moléculas com aproximadamente 23 nucleotídeos de comprimento de RNA, não codificantes, evolutivamente conservados, que regulam a expressão de genes alvo, causando

repressão da tradução para a síntese proteica^{11,14}. Um único miRNA consegue regular diversos RNAs mensageiros (mRNAs) influenciando na expressão de genes distintos¹⁵. A estimativa é que há mais de 2.600 genes de miRNAs no genoma humano, cujos produtos são responsáveis por controlar as atividades de mais de 60% de todos os genes que codificam proteínas¹⁶. Dentre as funções biológicas controladas pelos miRNAs, temos desenvolvimento, proliferação, diferenciação, crescimento, metabolismo e apoptose^{17,18}. Os miRNAs são produzidos por duas proteínas da RNase III, a Drosha e a Dicer, e seu processamento ocorre no núcleo e citoplasma, respectivamente¹⁹.

No núcleo o processamento dos pri-miRNA é realizado pela RNase III Drosha e seu cofator DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region in gene 8) formando uma estrutura em forma de grampo chamado de pré-miRNA. Esse precursor de miRNA tem em torno de 70 a 90 nucleotídeos e posteriormente será exportada para o citoplasma pela proteína exportina-5. Os pré-miRNAs são processados no citoplasma, por uma RNase III Dicer, tornando-se pequenas cadeias de RNA com aproximadamente 23 nucleotídeos, chamado de microRNA. Uma ligação ocorre na proteína argonauta 2 como parte do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que irá separar as duas fitas de miRNA. Uma fita continuará ligada ao RISC, enquanto a outra poderá ser degradada. A fita de miRNA que está ligada ao RISC se liga ao RNAm alvo através de um emparelhamento de bases. Existindo complementaridade entre o miRNA e o RNAm ocorrerá uma clivagem. Não existindo uma completa complementaridade entre o miRNA e o RNAm ocorrerá uma inibição da tradução de proteínas no RNA²⁰.

1.4. MicroRNAs como biomarcadores

Um biomarcador deve cumprir alguns critérios como ser acessível por métodos não invasivos, boa especificidade a patologia investigada, passível de detecção precoce e sensível à progressão ou regressão da doença²¹. Desde 2009 diversos grupos têm estudado os miRNAs como potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão e infarto do miocárdio²².

1.5. MicroRNAs como biomarcadores no câncer e lesão medular

Os biomarcadores na detecção de diversos cânceres são um desafio presente na ciência. Novas estratégias são necessárias visando antecipar o diagnóstico aumentando as chances de recuperação do paciente. O uso de microRNAs circulantes como biomarcadores tumorais tem boa perspectiva pois, frequentemente, sua expressão está desregulada em pacientes com câncer, além de possuírem boa estabilidade no plasma e no soro²³. Hank M, et al²⁴ relatou a expressão aumentada de miR-126 e miR-182 em amostras de urina de pacientes com câncer de bexiga quando comparadas a urinas de indivíduos saudáveis. Park NJ, et al²⁵ em seu estudo encontrou diferenças nas expressões de miR-125a e do miR-200a em amostra salivar de pacientes com câncer de boca quando comparado a indivíduos saudáveis. Ambos os estudos corroboram a possibilidade da utilização de microRNAs como biomarcadores tumorais.

2. OBJETIVOS

Realizar uma análise exploratória utilizando-se ferramentas de bioinformática com o objetivo de identificar miRNAs e seus genes alvo relacionados aos três tipos mais frequentes de câncer em indivíduos com LM, utilizando para isto, os resultados de miRNAs diferencialmente expressos em indivíduos com LM em comparação com indivíduos saudáveis previamente relatados em estudo de nosso grupo.

3. METODOLOGIAS

O desenho metodológico referente ao objetivo do estudo está apresentado na Figura 1.

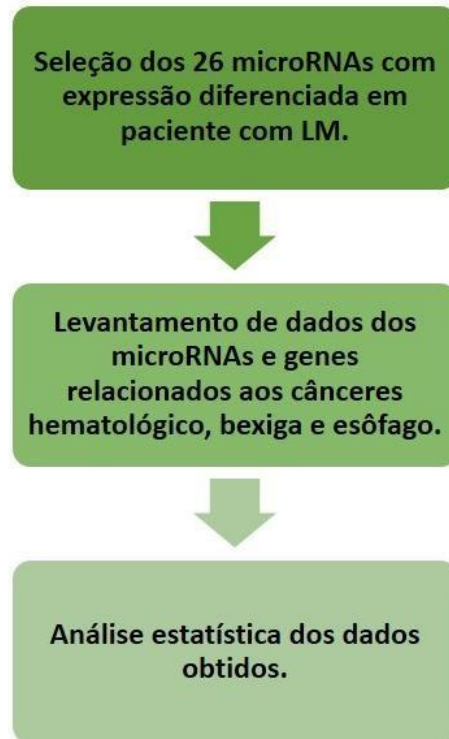


Figura 1. Desenho metodológico referente ao objetivo do estudo

3.1. Seleção dos microRNAs

Os microRNAs utilizados nesse estudo foram selecionados através da pesquisa publicada por nosso grupo²⁶, onde avaliou-se a diferença na expressão de microRNAs em pacientes com lesão medular comparado ao grupo controle. Foram considerados 23 microRNAs com expressão reduzida e 3 microRNAs com expressão aumentada. Sendo os reduzidos: miR-766-3p; miR-409-3p; miR-374b-5p; miR-328-3p; miR-30e-3p; miR-301a-3p; miR-26a-5p; miR-221-3p; miR-191-5p; miR15b-5p; miR-148b-3p; miR-146b-5p; miR-146a-5p; miR-140-5p; miR-130b-3p; miR130a-3p;

miR-125a-5p; miR-103a-3p; miR-744-5p; miR-30b-5p; miR-142-3p; miR126-3p; miR-127-3p. Os aumentados: miR-597-5p; miR-125b-5p; miR-25-3p.

3.2. Análise Bioinformática

O programa utilizado na pesquisa dos genes alvo dos microRNAs foi o MirWalk 2.0 que consiste em uma plataforma de código aberto que compila dados de diferentes “databases”. Nesta pesquisa utilizamos dados das bases miRWalk, miRanda, miRDB, RNA22 e Targetscan. Foram considerados apenas os genes descritos em pelo menos 4 “databases” para cada microRNA. Assim genes relacionados em 3 ou menos “databases” foram excluídos da pesquisa.

Após serem selecionados os genes alvo dos microRNAs estudados no câncer de bexiga, câncer hematológico e câncer esofágico, utilizamos o programa Cytoscape para visualizar a rede de interação molecular.

4. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação estão apresentados no seguinte artigo:

1. **“Bioinformatics analysis of circulating miRNAs relatade to cancer following spinal cord injury”**. Lopes ECP, Paim LR, Matos-Souza JR, Calegari DR, Gorla JI, Cliquet A, Lima CSP, McDonald JF, Nadruz W. J, Schreiber R. Bioscience Reports. 2019 Sep 20. doi: 10.1042/BSR.2019.0989.

Bioinformatics analysis of circulating miRNAs related to cancer following spinal cord injury

Subjects

Elisângela C. P. Lopes, MSc1*; Layde R. Paim*, PhD1; José R. Matos-Souza, PhD1; Décio Roberto Calegari, PhD3; José L. Gorla, PhD2; Alberto Cliquet, PhD 4,5; Carmem S. Lima, 1; John F. McDonald, 6; Wilson Nadruz Jr., PhD1; Roberto Schreiber PhD*1.

* These authors contributed equally to the manuscript

1 - Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

2 - School of Physical Education, University of Maringá, Maringá, PR, Brazil;

3 - School of Physical Education, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

4 - Department of Orthopedics, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

5 - Department of Electrical Engineering, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

6 - School of Biology, Petit Institute of Bioengineering and BioSciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, U.S.A.

Corresponding Author:

Roberto Schreiber, Ph.D.

Departamento de Clínica Médica,

Faculdade de Ciências Médicas,

Universidade de Campinas, Cidade

Universitária Zeferino Vaz, 13081-

970, Campinas, SP. Brazil.

Phone/FAX: (55) (19) 3521 7364; E-Mail: robertos@fcm.unicamp.br

Running title: Cancer in people with spinal cord injury and miRNAs

Abstract

Patients with spinal cord injury (SCI) have an increased risk of developing esophageal, bladder and hematologic malignancies compared with the normal population. In the present study, we aimed to identify, through in silico analysis, miRNAs and their target genes related to the three most frequent types of cancer in individuals with SCI. In a previous study, we reported a pattern of expression of miRNAs in 17 sedentary SCI males compared with 22 healthy able-bodied males by TaqMan OpenArray. This list of miRNAs deregulated in SCI patients was uploaded to miRWALK2.0 to predict the target genes and pathways of selected miRNAs. We used Cytoscape software to construct the network displaying the miRNAs and their gene targets. Among the down-regulated miRNAs in SCI, 21, 19 and 20 miRNAs were potentially associated with hematological, bladder and esophageal cancer, respectively, and three target genes (*TP53*, *CCND1* and *KRAS*) were common to all three types of cancer. The three up-regulated miRNAs were potentially targeted by 18, 15 and 10 genes associated with all three types of cancer. Our current bioinformatics analysis suggests the potential influence of several miRNAs on the development of cancer in SCI. In general, these data may provide novel information regarding potential molecular mechanisms involved in the development of cancer among individuals with SCI. Further studies aiming at understanding how miRNAs contribute to the development of the major cancers that affect patients after SCI may help elucidate the role of these molecules in the pathophysiology of the disease.

Keywords: spinal cord injury; hematological cancer; bladder cancer; esophageal cancer; miRNA.

Introduction

Spinal cord injury (SCI) is an insult that commonly occurs because of trauma resulting in loss or impairment of motor/sensory function below the injury level. According to the 2014 National SCI Statistical Center (NSCISC) annual report [1], neoplasms are the third leading cause of death in SCI individuals in the United States. Patients with SCI have an increased risk of developing esophageal, bladder and hematologic malignancies, such as multiple myeloma chronic or acute myeloid leukemia, and lymphoma, compared with normal population [2,3].

MicroRNAs (miRNAs) are small molecules of highly conserved non-coding RNAs, which promote post-transcriptional regulation of gene expression, and play an important role in both physiological and pathological conditions [4]. Several studies have demonstrated the expression of aberrant miRNA in most human malignancies, so that some highly expressed miRNAs can function as oncogenes by suppressing tumor suppressor genes [5]. By contrast, some miRNAs, even when expressed at low levels, can function as tumor suppressors by down-regulating oncogenes [5]. However, the miRNAs and their target genes in oncogenic pathways involved in the development of neoplasms among SCI individuals have not been clearly elucidated. Knowledge regarding the molecular mechanisms of initiation and progression of cancers in patients with SCI can provide potential information on therapeutic approaches and biomarkers for the preventive diagnosis of SCI-related cancer.

In a previous study, we reported for the first time a specific pattern of circulating miRNAs expression in individuals with chronic SCI compared with healthy controls [6]. Given that patients with SCI have higher risk of cancer and miRNAs have been implicated in the risk of cancer, it is possible that the distinct pattern of miRNA expression in SCI might be involved in the development of cancer in this population. Therefore, in the present study, we performed an exploratory analysis aiming to identify miRNAs and their target genes related to the three most frequent types of cancer in SCI individuals, using bioinformatics tools, among the miRNAs that were reported to be differently expressed in individuals with SCI compared with healthy individuals [6].

Materials and methods

MiRNA expression microarray data

We previously evaluated 17 sedentary SCI (SCI-S) males with 1 year or more of SCI and 22 apparently healthy able-bodied males [6]. Twenty-six deregulated (23 down-regulated and 3 up-regulated) circulating miRNAs were identified in SCI individuals when compared with healthy controls using a TaqManOpenArray® Human MicroRNA system (Life Technologies). These miRNAs, which are also presented in Supplementary Table S1, were used for the current analysis. Detailed clinical characteristics of the patients used for the analysis of miRNAs can be found elsewhere [6].

Identification of miRNA target genes

Potential target genes regulated by the differentially expressed miRNAs between SCI-S and healthy individuals were predicted using the miRWalk 2.0 online tool [7]. To understand the biological relevance of differentially expressed miRNAs, we performed functional enrichment analysis for each of the three most common types of cancer in patients with SCI (bladder, esophageal and hematologic cancer). To strengthen the data, only mRNAs predicted in at least four out of five tools (miRanda, miRDB, miRWalk, RNA22 and TargetScan) were considered as possible miRNA targets. In this way, we obtained the target genes for specific miRNAs. Additionally, a network displaying the miRNAs and their gene targets was constructed and visualized using Cytoscape software [8].

Results

Prediction of miRNA target genes

Using the miRWalk, miRanda, miRDB, RNA22 and TargetScan databases, of the 23 miRNAs down-regulated in SCI-S, only one was not associated with one of the three types of cancer studied and 21 were associated with hematologic cancer, 19 with bladder cancer and 20 with esophageal cancer. These miRNAs regulated 69, 26 and 24 target genes, respectively (Figure 1). The combination of all target genes demonstrated that the *TP53*, *CCND1* and *KRAS* genes were common to all three types of cancer (Figure 2).

Analysis of miRNAs up-regulated in SCI individuals (miR-125b-5p; miR-5975p; miR-25-3p) resulted in 18 target genes associated with hematologic cancer, 10 with bladder cancer and 15 with esophageal cancer (Figure 3). The combination of all target genes demonstrated that the *TP53*, *MAPK1* and *MAPK3* genes were common to all three types of cancer (Figure 4).

Discussion

In the present study, a bioinformatics analysis was performed to identify potential miRNAs and their target genes related to the three most frequent types of cancer in individuals with SCI. For this purpose, we analyzed the differentially deregulated circulating miRNAs in individuals with SCI from a previous study of our group [6] and showed that among the down-regulated miRNAs in SCI, 21, 19 and 20 miRNAs were potentially associated with hematological, bladder and esophageal cancer, respectively.

Increased risk of bladder cancer has been reported, ranging from 16 to 28 times in patients with SCI compared with the able-bodied population, even in patients without neurogenic bladder [3,9]. Several studies have demonstrated down-regulation of miR-26a, miR-15b-5p and miR-374b-5p associated with the development of bladder cancer in general populations [10–15]. These miRNAs were down-regulated in our studied SCI individuals suggesting that they may be potential regulators of genes related to bladder cancer in these patients. In addition, these miRNAs have been associated with regulation of *TP53* [16], *CCND1* [13] and *VEGFA* [17] in bladder cancer supporting our *in silico* analysis showed that these genes might be potential targets of down-regulated miRNAs in SCI individuals.

A greater risk of hematologic and esophageal cancer has been reported in patients with SCI [2], but the mechanisms underlying these associations are not established. A former study has shown that miR-125a-5p have a reduced expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma [18] suggesting that this miRNA can function as a tumor suppressor in this type of cancer. In our study, this miRNA was reduced in serum of SCI individuals and *in silico* analysis suggested five potential gene targets regulated by this miRNA (*TP53*, *MDC1*, *STC2*, *TNFRSF10B* e *VEGFA*). Furthermore, miR-25, an up-regulated miRNA in our sample of SCI individuals, may promote migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells by suppressing the expression of the *CDH1* gene [19]. Consistent with this notion, our results of *in silico* analysis pointed toward *CDH1* as a potential target for this miRNA.

In our *in silico* analysis, we observed 21 down-regulated miRNAs in SCI individuals that may regulate the expression of 69 potential gene targets associated with hematologic cancer, including acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia. The miR-15/16 cluster, miR-146a, miR-328 and miR-125b have been associated with development of hematologic cancer [20–26]. In the present study, miR-15b-5p, miR-146a-5p and miR-328 were down-regulated in SCI individuals and our *in silico* analysis identified several potential target genes regulated for these miRNAs, including the oncogene *PIM1* [24], while miR-125b was up-regulated in SCI individuals and *in silico* analysis revealed nine target genes as potential targets of this miRNA associated with hematological disease, including tumor suppressor genes such as *TP53*, *STAT3* and *TCF7* [27].

Notably, three target genes (*TP53*, *CCND1* and *KRAS*) were common to all three types of cancer. When considering the up-regulated miRNAs in SCI patients,

three distinct target genes (*MAPK1*, *MAPK3* and *TP53*) were common to all three types of cancer. Our *in silico* analysis showed that down-regulation of miR-15b-5p, miR-30e-3p and miR-374b-5p in SCI individuals may have *KRAS* as one of the targets gene presents in the three most frequent types of cancer related to SCI. Thus, we speculate that the *KRAS* gene, may be an attractive target for further studies evaluating oncogenesis in SCI individuals.

The difficulty in obtaining tumor samples in patients who have developed cancer after SCI in addition to the fact that circulating miRNAs do not always originate from tumor tissue [28] are limitations of our study, since our miRNA analysis was performed in the serum of patients with SCI who did not have a diagnosis of cancer. Another limitation relates to the fact that *in silico* analysis alone is not enough to elucidate the role of these molecules in the pathophysiology of cancer in SCI, suggesting that further *in vitro* and *in vivo* studies should be performed to confirm the role of these miRNAs in the development of cancer associated with SCI.

To date, we are unaware of any study that has evaluated the association of miRNA expression pattern with any type of cancer in SCI patients. The aim of our study was to investigate whether miRNAs that have been already related to cancer development in the general population might be also potentially related to cancer in SCI individuals. Since our study is a hypothesis-generating research, these findings might help to elucidate the role of these miRNAs in the increased prevalence of cancer in patients with SCI.

Understanding the regulatory roles of miRNAs has already been demonstrated in several types of cancer, however few studies have demonstrated the influence of miRNAs on the development of cancer in SCI individuals to date. Our current bioinformatics analysis suggests the potential influence of several of miRNAs on the development of cancer in individuals with SCI. Further studies aiming at understanding how miRNAs contribute to the development of the major cancers that affect patients after SCI may help elucidate the role of these molecules in the pathophysiology of the disease.

Author Contribution:

R.S. and W.N. conceived and designed experiments; R.S., E.C.L.D. L.R.P., J.R.M.S., D.R.C., J.I.G., A.C., C.S.P.L and J.F.M. contributed to the acquisition, analysis and/or interpretation of data. R.S., E.C.L.D. and W.N. drafted the manuscript and L.R.P., J.R.M.S., D.R.C., J.I.G., A.C., C.S.P.L and J.F.M. revised it critically for important intellectual content. All authors have read the manuscript and approved the submission.

Funding:

This work was supported by the CAPES; and the FAPESP [grant number 2017/23563-1].

REFERENCES

- 1) (2014) National Spinal Cord Injury Statistical Center. Spinal cord injury: facts and figures at a glance. Birmingham, AL:University of Alabama at Birmingham.
<https://www.nscisc.uab.edu/reports.aspx>
- 2) Kao, C.H., Sun, L.M., Chen, Y.S., Lin, C.L., Liang, J.A., Kao, C.H. et al. (2016) Risk of nongenitourinary cancers in patients with spinal cord injury: a population- based cohort study. *Medicine (Baltimore)* **95**, e2462,
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002462>
- 3) Kalisvaart, J.F., Katsumi, H.K., Ronningen, L.D. and Hovey, R.M. (2010) Bladder cancer in spinal cord injury patients. *Spinal Cord* **48**, 257–261,
<https://doi.org/10.1038/sc.2009.118>
- 4) Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K. and Calin, G.A. (2011) MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 467–477, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.76>
- 5) A1, Esquela-Kerscher and FJ., Slack (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269, <https://doi.org/10.1038/nrc1840>

- 6) Paim, L.R., Schreiber, R., de Rossi, G., Matos-Souza, J.R., Costa, E., Silva, A.A. et al. (2018) Circulating microRNAs, vascular risk, and physical activity in spinal cord injured subjects. *J. Neurotrauma* **35**, 1–8

- 7) (2015) miRWalk 2.0 online tool.: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature Methods* **12**, 697, <http://zmf.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2>

- 8) <https://cytoscape.org> Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D. et al. (2013) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504

- 9) Gui-Zhong, L. and Li-Bo, M. (2017) Bladder cancer in individuals with spinal cord injuries: a meta-analysis. *Spinal Cord* **55**, 341–345, <https://doi.org/10.1038/sc.2016.151>

- 10) Lin, Y., Chen, H., Hu, Z., Mao, Y., Xu, X., Zhu, Y. et al. (2013) miR-26a inhibits proliferation and motility in bladder cancer by targeting HMGA1. *FEBS Lett.* **587**, 2467–2473, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.021>

- 11) Lin, R., Shen, W., Zhi, Y. and Zhou, Z. (2014) Prognostic value of miR-26a and HMGA1 in urothelial bladder cancer. *Biomed. Pharmacother.* **68**, 929–934, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.003>

- 12) Jiang, X., Du, L., Wang, L., Li, J., Liu, Y., Zheng, G. et al. (2015) Serum microRNA expression signatures identified from genome-wide microRNA profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer. *Int. J. Cancer* **136**, 854–862, <https://doi.org/10.1002/ijc.29041>

- 13) Xu, S., Gu, G., Ni, Q., Li, N., Yu, K., Li, X. et al. (2015) The expression of AEG-1 and Cyclin D1 in human bladder urothelial carcinoma and their clinicopathological significance. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 21222–21228

- 14) Wang, S., Zhang, G., Zheng, W., Xue, Q., Wei, D., Zheng, Y. et al. (2018) MiR454-3p and miR-374b-5p suppress migration and invasion of bladder cancer cells through targeting ZEB2. *Biosci. Rep.* **38**, pii: BSR20181436, <https://doi.org/10.1042/BSR20181436>

- 15) Schreiber, R., Mezencev, R., Matyunina, L.V. and McDonald, J.F. (2016) Evidence for the role of microRNA 374b in acquired cisplatin resistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Gene Ther.* **23**, 241–245, <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.23>

- 16) Frasca, F., Rustighi, A., Malaguarnera, R., Altamura, S., Vigneri, P., Del Sal, G. et al. (2006) HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 2980–2989, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2637>

- 17) Zaravinos, A., Volanis, D., Lambrou, G.I., Delakas, D. and Spandidos, D.A. (2012) Role of the angiogenic components, VEGFA, FGF2, OPN and RHOC, in urothelial cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol. Rep.* **28**, 1159–1166, <https://doi.org/10.3892/or.2012.1948>

- 18) Zhao, Y., Ma, K., Yang, S., Zhang, X., Wang, F., Zhang, X. et al. (2018) MicroRNA-125a- 5p enhances the sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin by suppressing the activation of the STAT3 signaling pathway. *Int. J. Oncol.* **53**, 644–658

- 19) Xu, X., Chen, Z., Zhao, X., Wang, J., Ding, D., Wang, Z. et al. (2012) MicroRNA25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 640–645, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.048>

- 20) Rassenti, L.Z., Balatti, V., Ghia, E.M., Palamarchuk, A., Tomasello, L., Fadda, P. et al. (2017) MicroRNA dysregulation to identify therapeutic target combinations for chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 10731–10736, <https://doi.org/10.1073/pnas.1708264114>

- 21) Boldin, M.P., Taganov, K.D., Rao, D.S., Yang, L., Zhao, J.L., Kalwani, M. et al. (2011) miR- 146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J. Exp. Med.* **208**, 1189–1201, <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>

- 22) Hua, Z., Chun, W. and Fang-Yuan, C. (2011) MicroRNA-146a and hemopoietic disorders. *Int. J. Hematol.* **94**, 224–229, <https://doi.org/10.1007/s12185-011-0923-7>

- 23) Liu, L., Chen, R., Zhang, Y., Fan, W., Xiao, F. and Yan, X. (2015) Low expression of circulating microRNA-328 is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Diagn. Pathol.* **10**, 109, <https://doi.org/10.1186/s13000015-0345-6>

- 24) Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R. et al. (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* **140**, 652–665, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.007>

- 25) Wu, Z., Sun, L., Wang, H., Yao, J., Jiang, C., Xu, W. et al. (2012) MiR-328 expression is decreased in high-grade gliomas and is associated with worse survival in primary glioblastoma. *PLoS ONE* **7**, e47270, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047270>

- 26) Alemdehy, M.F. and Erkeland, S.J. (2012) MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **19**, 261–267, <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328353d4e9>

- 27) Shen, L., Shi, Q. and Wang, W. (2018) Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis* **7**, 25, <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0034-x>

28) Katoh, M. (2014) Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 61, <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00061>

Figure Legends

Figure 1. Regulatory network of down-regulated miRNAs in SCI individuals and target genes associated with cancer (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent target genes.

Figure 2. Combination of regulatory network of down-regulated miRNAs in SCI individuals and target genes associated with all studied cancers (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent target genes. The green nodes represent the target genes common to the three types of cancer.

Figure 3. Regulatory network of up-regulated miRNAs in SCI individuals and targets genes associated with cancer (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent targets genes.

Figure 4. Combination of regulatory network of up-regulated miRNAs in SCI individuals and targets genes associated with all of cancer (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent targets genes. The red nodes represent the target genes common to the three types of cancer.

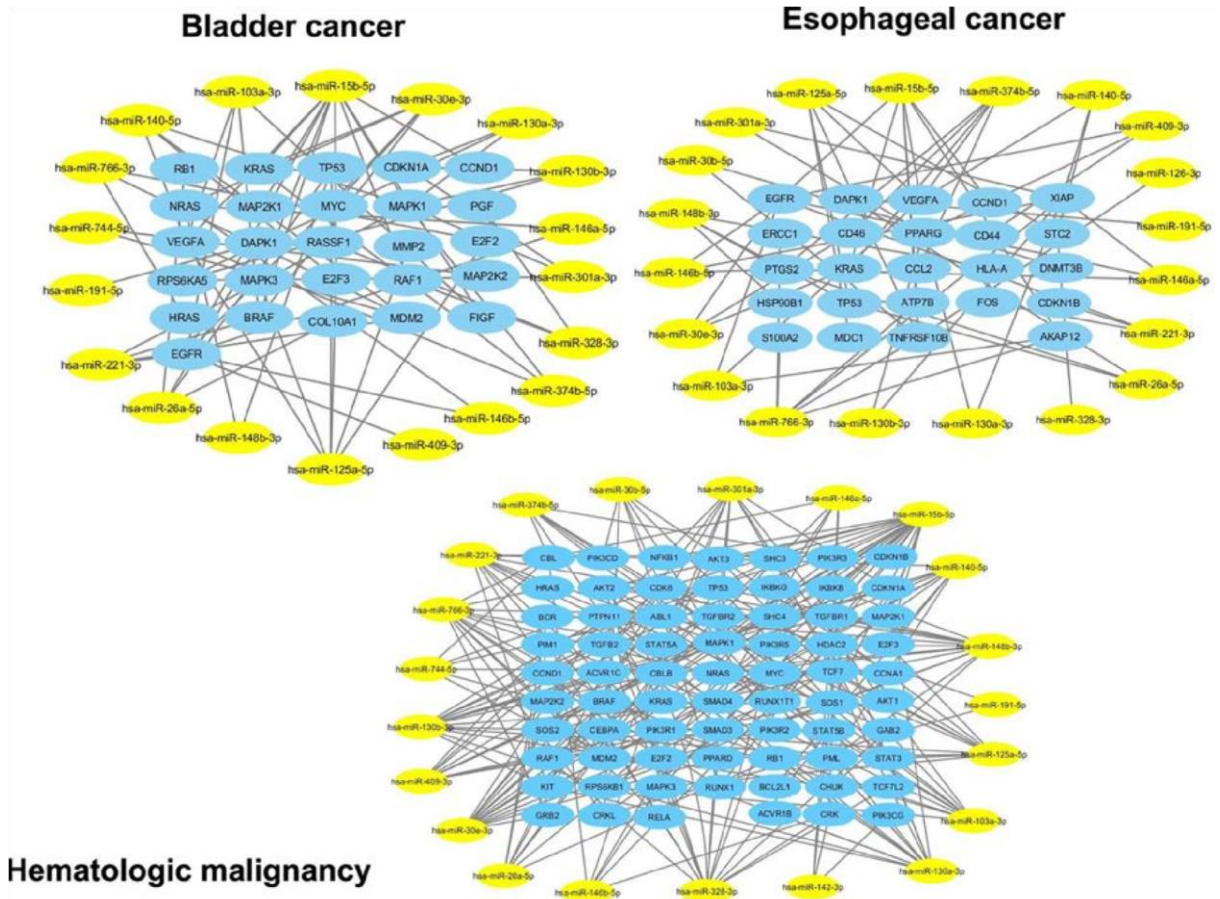


Figure 1. Regulatory network of down-regulated miRNAs in SCI individuals and target genes associated with cancer (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent target genes.

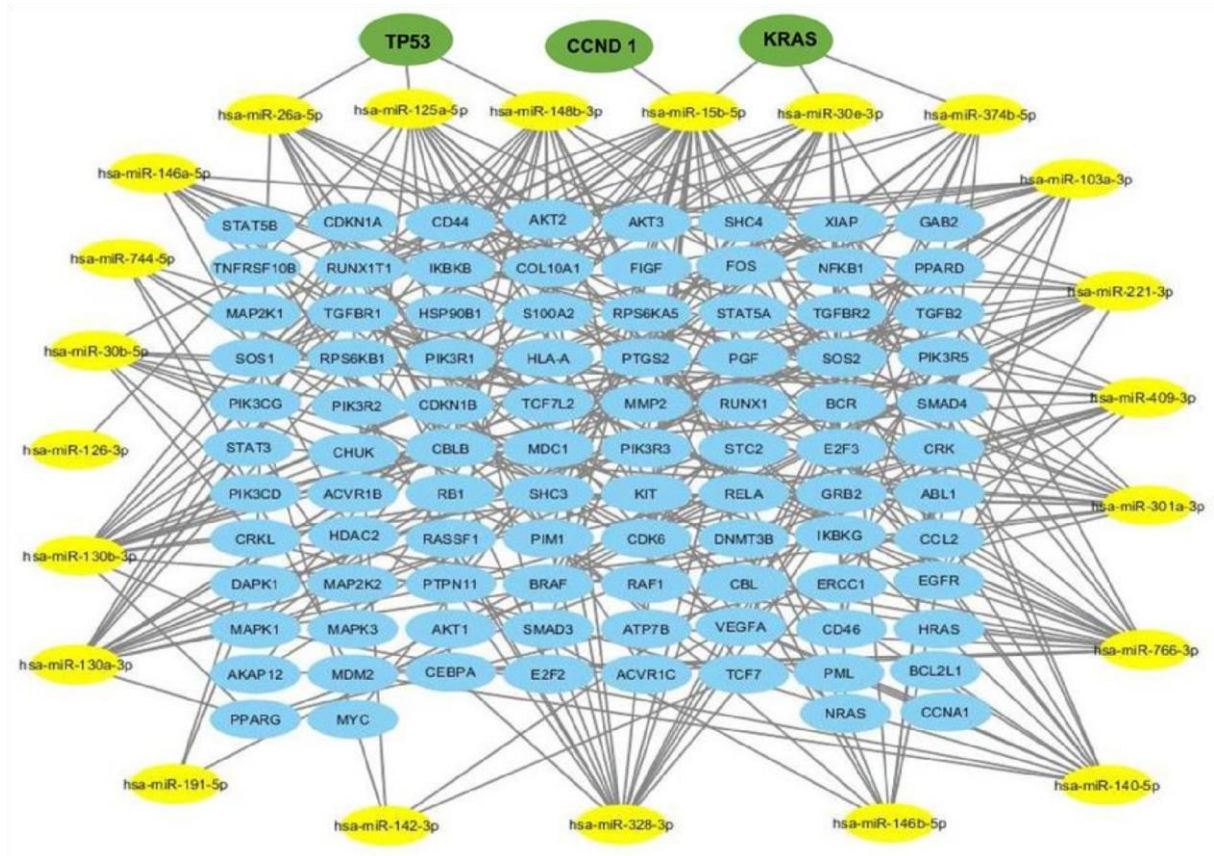


Figure 2. Combination of regulatory network of down-regulated miRNAs in SCI individuals and target genes associated with all studied cancers (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent target genes. The green nodes represent the target genes common to the three types of cancer.

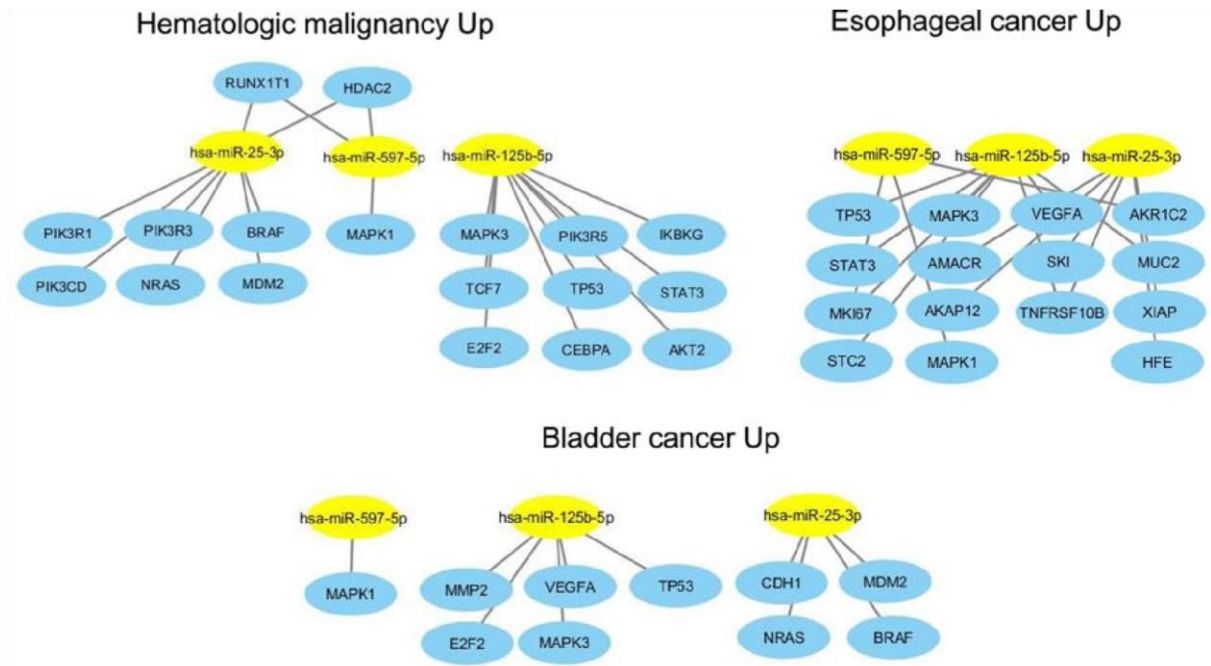


Figure 3. Regulatory network of up-regulated miRNAs in SCI individuals and targets genes associated with cancer (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent targets genes.

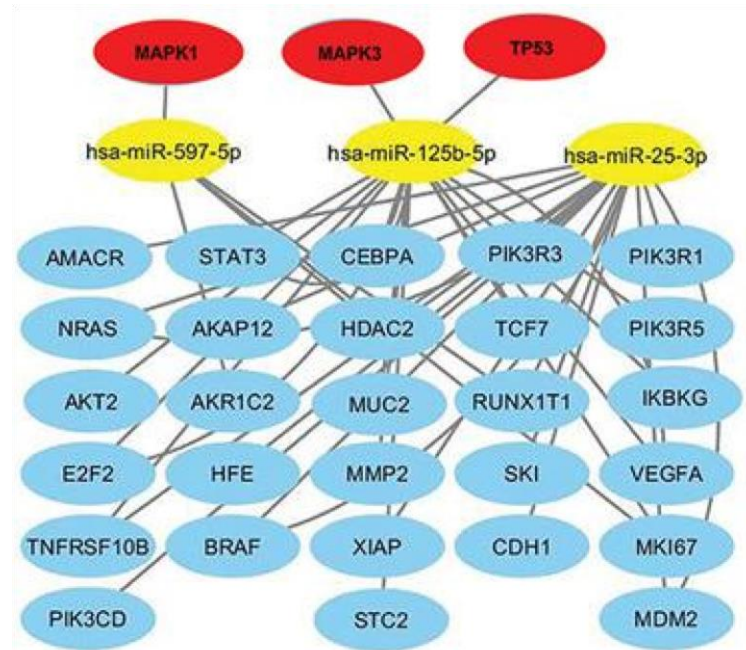


Figure 4. Combination of regulatory network of up-regulated miRNAs in SCI individuals and targets genes associated with all of cancer (bladder, esophageal and hematologic malignancies)

Yellow ellipse nodes represent differentially expressed miRNAs. Blue ellipse nodes represent targets genes. The red nodes represent the target genes common to the three types of cancer.

5. DISCUSSÃO GERAL

Em nossa análise bioinformática identificamos potenciais microRNAs e seus genes alvo relacionados aos três tipos de câncer mais frequentes em pacientes com LM. Entre os microRNAs com expressão reduzida 21 estavam potencialmente associados ao câncer hematológico, 19 ao câncer de bexiga e 20 ao câncer esofágico.

Relacionado ao câncer hematológico, os 21 microRNAs com expressão reduzida podem regular a expressão de 69 genes alvo. No câncer de bexiga os 19 microRNAs com expressão reduzida podem regular a expressão de 26 genes alvo e no câncer esofágico os 20 microRNAs com expressão reduzida podem regular a expressão de 24 genes alvo.

O miR-26a, miR-15b-5p e o miR 374b-5p, com expressão reduzida em pacientes com LM, são potenciais reguladores de genes relacionados ao câncer de bexiga, sendo eles o TP53²⁷, CCND1²⁸ e VEGFA²⁹.

Dentre diversos genes alvo identificados para o miR-15b-5p, miR146a-5p, miR-328, há o oncogene PIM1³⁰. Já o miR-125b com expressão aumentada possui nove genes alvo relacionados ao câncer hematológico, incluindo genes supressores de tumor como o TP53, STAT3, TCF7³¹.

Nos microRNAs com expressão reduzida três genes alvo foram comuns aos três tipos de câncer, sendo eles: TP53, CCND1 e KRAS. Os microRNAs com expressão aumentada também possuíam três genes alvo em comum: MAPK1, MAPK3 e TP53.

O gene supressor de tumor TP53, também conhecido como “guardião do genoma”, codifica um regulador central da via de resposta a danos no DNA, a proteína do fator de transcrição p53. Sua ativação leva à parada do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose ou senescência. O gene TP53 é considerado um gene supressor de tumor, embora Shen e cols³¹ o considerem um gene "agente duplo" porque pode funcionar como oncogene e supressor de tumor, dependendo do contexto. Esta ação poderia explicar a nossa observação deste gene regulado tanto por miRNAs com expressão reduzida como por expressão aumentada nos pacientes com LM, sendo dependente do tipo de tecido em que ocorre para levar ao efeito oncogenico ou supressor.

O gene PIM1 (Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase) codifica uma proteína que pertence à família das proteínas Serina/Threonina quinase. O gene é expresso principalmente nas linhagens celulares linfóides B e mielóides e é superexpresso em neoplasias hematopoiéticas e no câncer de próstata. Desempenha também um papel na transdução de sinal nas células sanguíneas, contribuindo para a proliferação e sobrevivência celular fornecendo uma vantagem seletiva na tumorigênese³⁰. O aumento da expressão deste oncogene seria explicado pela redução na expressão dos miR-15b-5p, miR146a-5p e miR-328 observados em nosso estudo.

O gene CCND1 codifica a proteína ciclina D1. A ciclina D1 é um oncogene frequentemente superexpresso em cânceres humanos e tem dupla função atuando no ciclo celular e como regulador transcricional sendo frequentemente regulada no câncer por diferentes alterações genômicas²⁸. A sua expressão aumentada pode ocorrer pela redução na expressão dos miRNAs avaliados neste estudo.

A proteína codificada pelo gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT3) é um membro da família de proteínas STAT. Em resposta a citocinas e fatores de crescimento, os membros da família STAT são fosforilados pelas cinases associadas ao receptor e, em seguida, formam homo- ou heterodímeros que se translocam para o núcleo da célula onde atuam como ativadores da transcrição. Esta proteína desempenha um papel fundamental em muitos processos celulares, como crescimento celular e apoptose atuando na expressão de uma variedade de genes em resposta a diversos estímulos celulares²⁸. Considerado um gene supressor de tumor, pode ter a sua expressão reduzida pelo aumento da expressão do miR-125b, sugerindo o papel destas moléculas no processo tumorigênico.

O gene do Fator de transcrição 7 codifica um membro da família de fatores de transcrição relacionados aos linfócitos T e pertence a uma família de proteínas ativadores transcripcionais denominadas HMG (High-Mobility Group). Apesar do TCF7 parecer estar superexpresso em tumores malignos, como em câncer colorretal, de próstata ou de mama, além de linfomas e leucemias derivadas do linfócito T, vários estudos demonstraram que o TCF7 pode atuar como supressor de tumor e ter expressão reduzida na leucemia, linfomas ou câncer colorretal. Os papéis duplos do TCF7 na tumorigênese podem ser explicados pelas diferentes funções das isoformas variantes do TCF7 e pela complexidade das variações do tumor com múltiplas vias de sinalização no processo de desenvolvimento do tumor³². Da mesma forma que o

TP53, o duplo papel do TCF7 sugere que este gene tem potencial de perder a atividade supressora de tumor ao ser regulado por um miRNA com expressão aumentada como no caso do miR-125b observado em nosso estudo.

As vias MAPK são módulos de sinalização que transmitem sinais extracelulares e intracelulares para redes reguladoras dentro da célula através da fosforilação dos principais alvos proteicos. MAPK1 e MAPK3 também conhecidos como: ERK-2 e ERK-1 respectivamente. MAPK1 e MAPK3 são 84% idênticos em sequência e compartilham muitas, se não todas, funções. Estas vias de sinalização têm sido implicadas em diversos eventos celulares, incluindo proliferação, crescimento, diferenciação, migração celular, sobrevivência celular, metabolismo e transcrição. Quando ativado (isto é, fosforilado) no citosol é subsequentemente translocado para o núcleo onde ativa diversos fatores de transcrição. Tem sido implicada em condições patológicas, tais como câncer, artrite, inflamação crônica e osteoporose³³. Em nossa análise, miRNAs com aumento e também com redução na expressão foram observados como reguladores de genes MAPK1 e MAPK3 sugerindo a complexidade no estudo das interações miRNAs-genes alvo.

O oncogene KRAS codifica a proteína KRAS, que é uma GTPase que atua em vários processos celulares. Mutações neste oncogene resultam em proteína KRAS permanentemente ativada, consequentemente mantendo os processos celulares de proliferação, transformação, invasão e sobrevivência. Mutações dos proto-oncogenes RAS (H-RAS, N-RAS, K-RAS) são frequentemente encontradas em todos os tumores humanos³⁴. A redução na expressão do miR-27a associado ao aumento na expressão de KRAS em câncer de esôfago em dois estudos prévios^{35,36}, além da evidência de que na ausência de mutações este gene pode ser ativado por outros mecanismos como o pós-transcricional, neste caso por miRNAs, corrobora nosso estudo que sugere que este gene comum nos três tipos de câncer estudado, tenha como potenciais reguladores os miR-15b-5p, miR-30e-3p e miR-374b-5p, com expressão reduzida em nossa amostra de pacientes com LM.

A dificuldade em obter amostras de tumor em pacientes que desenvolveram câncer após LM, além do fato de que os miRNAs circulantes nem sempre se originam do tecido tumoral²⁸, são limitações do nosso estudo, uma vez que nossa análise do miRNA foi realizada no soro de pacientes com LM que não tiveram diagnóstico de câncer. Outra limitação refere-se ao fato de que a análise *in silico* por si só não é suficiente para elucidar o papel dessas moléculas na fisiopatologia do câncer na LM,

sugerindo que mais estudos *in vitro* e *in vivo* sejam realizados para confirmar o papel destes miRNAs no desenvolvimento de câncer associado à LM.

6. CONCLUSÃO

Nossa análise bioinformática sugere a influência potencial de diversos microRNAs no desenvolvimento de câncer em paciente LM. Há poucos estudos que demonstram essa interação, assim faz-se necessário novas pesquisas para entender como os microRNAs contribuem para o desenvolvimento dos principais tipos de câncer em pacientes após a LM.

7. REFERÊNCIAS

- 1) Kao, C.H., Sun, L.M., Chen, Y.S., Lin, C.L., Liang, J.A., Kao, C.H. et al. Risk of nongenitourinary cancers in patients with spinal cord injury: a population- based cohort study. *Medicine (Baltimore)* 95(2): e2462; 2016. doi.org/10.1097/MD.0000000000002462.
- 2) Diretrizes de atenção à pessoa com lesão medular. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde, Departamento de ações programáticas estratégicas e Departamento de atenção especializada – Brasília. 2013.
- 3) Delfino HLA. Trauma Raquimedular. Trauma II, Medicina – Ribeirão Preto. 1999. 32: 388-400.
- 4) Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *J Spinal Cord Med.* 2011; 34(6): 535-46.
- 5) Bittencourt R, Scaletzky A, Boehl JAR. Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre – RS. *Revista Brasileira Cancerol*, 2004; 50(2):95-101.
- 6) Governo do Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Câncer. www.inca.gov.br. Acessado em: 16/04/2020.
- 7) Kao, C.H., Sun, L.M., Chen, Y.S., Lin, C.L., Liang, J.A., Kao, C.H. et al. (2016) Risk of nongenitourinary cancers in patients with spinal cord injury: a population- based cohort study. *Medicine (Baltimore)* **95**; e2462. doi.org/10.1097/MD.0000000000002462
- 8) Kalisvaart, J.F., Katsumi, H.K., Ronningen, L.D. and Hovey, R.M. (2010) Bladder cancer in spinal cord injury patients. *Spinal Cord* **48**; 257–261. doi.org/10.1038/sc.2009.118

- 9) Querioga RC, Pernambuco AP. Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2006; 52(2):173-178.

- 10) Tietsche de Moraes Hungria V, Chiatton C, Pavlovsky M, *et al.* Epidemiology of Hematologic Malignancies in Real-World Settings: Findings from the Hemato-Oncology Latin America Observational Registry Study. *Journal of global oncology*, 2019; 5:1-19. doi:10.1200/JGO.19.00025

- 11) Peng W, Dong N, Wu S, *et al.* MiR-4500 suppresses cell proliferation and migration in bladder cancer via inhibition of STAT3/CCR7 pathway. *Journal of Cell Biochem*, 2019; Dec 1. doi:10.1002/jcb.29558

- 12) Kalisvaart JF, Katsumi HK, Ronningen LD, Hovey RM. Bladder cancer in spinal cord injury patients. *Spinal Cord*, 2010; 48(3):257-61. doi:10.1038/sc.2009.118

- 13) Groah SL, Weitzenkamp DA, Lammertse DP, *et al.* Excess Risk of Bladder Cancer in Spinal Cord Injury: Evidence for an Association Between Indwelling Catheter Use and Bladder Cancer. *Arch Phys Med Rehabil*, 2002; 83(3):346-51.

- 14) Ricarte Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2006;50(6) doi:10.1590/s0004-27302006000600018

- 15) Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *Allegry Clin Immunol*, 2017; 141(4): 1202-1207. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.034

- 16) Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2011; 39; D152-7. doi: 10.1093/nar/gkq1027

- 17) Cheng Y, Ji R, Yue J, *et al.* MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophic Heart - Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy?. *Am J Pathol*, 2007; 170(6): 1831-1840. doi:10.2353/ajpath.2007.061170

- 18) Felli N, Fontana L, Pelosi E, *et al.* MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *PNAS*, 2005 ; 102(50) : 18081-18086. doi :10.1073/pnas.0506216102

- 19) Há M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Ver Cell Biol.* 2014; 15(8): 509-24. doi:10.1038/nrm3838

- 20) Zhang W, Dahlberg J. E., Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *The American journal of pathology.* 2007; vol 171; n° 3. doi:10.2353/ajpath.2007.070070728

- 21) Alton Etheridge, Inyoul Lee, Leroy Hood, David Galas, and Kai Wang. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res.* 2011 December 1; 717(1-2): 85–90. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004

- 22) Esther E. Creemers, Anke J. Tijssen, Yigal M. Pinto. Circulating MicroRNAs Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res.* 2012; 110:483-495.

- 23) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:10513–10518. [PubMed: 18663219]

- 24) Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker:

microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol.* 28:655–661. [PubMed: 19375957]

25) Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5473–5477. [PubMed: 19706812]

26) Paim, L.R., Schreiber, R., de Rossi, G., Matos-Souza, J.R., Costa, E., Silva, A.A. et al. (2018) Circulating microRNAs, vascular risk, and physical activity in spinal cord-injured subjects. *J. Neurotrauma* **35**, 1–8.

27) Frasca, F., Rustighi, A., Malaguarnera, R., Altamura, S., Vigneri, P., Del Sal, G. et al. (2006) HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 2980–2989. doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2637

28) Xu, S., Gu, G., Ni, Q., Li, N., Yu, K., Li, X. et al. (2015) The expression of AEG-1 and Cyclin D1 in human bladder urothelial carcinoma and their clinicopathological significance. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 21222–21228

29) Zaravinos, A., Volanis, D., Lambrou, G.I., Delakas, D. and Spandidos, D.A. (2012) Role of the angiogenic components, VEGFA, FGF2, OPN and RHOC, in urothelial cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol. Rep.* **28**, 1159–1166. doi.org/10.3892/or.2012.1948

30) Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R. et al. (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* **140**, 652–665. doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.007

31) Shen, L., Shi, Q. and Wang, W. (2018) Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis* **7**, 25. doi.org/10.1038/s41389-018-0034-x.

- 32) Yichun Zhu, William Wang, Xiangdong Wang J. Roles of Transcriptional Factor 7 in Production of Inflammatory Factors for Lung Diseases. *J Transl Med* 2015 Aug 20; 13: 273.
- 33) Fengbao Luo, Jian Shi, Qianqian Shi, Xianlin Xu, Ying Xia, Xiaozhou He. Mitogen-Activated Protein Kinases and Hypoxic/Ischemic Nephropathy. *Cell Physiol Biochem* 2016; 39(3):1051-67.
- 34) Marcell Baranyi, László Buday, Balázs Hegedűs. K-Ras Prenylation as a Potential Anticancer Target. *Cancer Metastasis Rev* 2020 Jun 10. doi: 10.1007/s10555-020-09902-w.
- 35) Yuzhi Jiang, Yuting Duan, Haibin Zhou. MicroRNA-27a Directly Targets KRAS to Inhibit Cell Proliferation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncol Lett*. 2015 Jan; 9 (1): 471-477.
- 36) Linan Zhu, Zhiju Wang, Qingxia Fan, Ruilin Wang, Yan Sun. microRNA-27a Functions as a Tumor Suppressor in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Targeting KRAS. *Oncol Rep*. 2014 Jan; 31 (1): 280-6.