



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Patrick Buosi

**Radioterapia Metabólica com Iodo-131 Associada à Modulação
in vitro da Expressão Gênica e de miRNAs Envolvidos na
Angiogênese em Colangiocarcinoma**

São José do Rio Preto

2024

Patrick Buosi

**Radioterapia Metabólica com Iodo-131 Associada à Modulação
in vitro da Expressão Gênica e de miRNAs Envolvidos na
Angiogênese em Colangiocarcinoma**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para Obtenção
do Título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto
2024

Buosi, Patrick

Radioterapia metabólica com iodo-131 associada à modulação in vitro da expressão gênica e de miRNAs envolvidos na angiogênese em colangiocarcinoma.

São José do Rio Preto, 2024

99p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

1. Radioterapia; 2. MicroRNAs; 3. Iodo; 4. Câncer; 5. Fígado; 6. ; Angiogênese.

Patrick Buosi

**Radioterapia Metabólica com Iodo-131
Associada à Modulação in vitro da Expressão
Gênica e de miRNAs Envolvidos na Angiogênese
em Colangiocarcinoma**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

2º Examinador: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

3º Examinador: Profa. Dra. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

Suplentes: Profa. Dra. Maria Clara Jessica Calastri

Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto, 18 de Dezembro de 2024.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| DEDICATÓRIA..... | vi |
| AGRADECIMENTOS ESPECIAIS..... | viii |
| AGRADECIMENTOS..... | xi |
| EPÍGRAFE..... | xiii |
| LISTA DE FIGURAS | xv |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | xviii |
| RESUMO..... | xxi |
| ABSTRACT..... | xxiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos do Colangiocarcinoma | 2 |
| 1.2 Interação Gênica e Colangiocarcinoma..... | 4 |
| 1.3 Angiogênese e Colangiocarcinoma | 8 |
| 1.4 Objetivos..... | 10 |
| 1.4.1 Objetivo Geral..... | 10 |
| 1.4.2 Objetivos Específicos..... | 11 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 2.1 Cultura Celular..... | 13 |
| 2.2 Irradiação de Células com ¹³¹ I..... | 13 |
| 2.3 Análise de Expressão Gênica e miRNA..... | 14 |
| 3. RESULTADOS | 17 |
| 3.1 Nível de Expressão Gênica e de miRNAs em Linhagens Celulares de CCA Considerando a Exposição ao ¹³¹ I | 17 |
| 3.1.1 Expressão gênica e <i>HIF1A</i> e <i>VEGFA</i> | 17 |
| 3.1.2 Expressão do supressor tumoral miRNA-142-3p | 18 |
| 3.1.3 Expressão do oncomiR 210-5p | 19 |
| 3.1.4 Expressão do supressor tumoral miRNA-224-3p | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.1.5 Expressão do supressor tumoral miRNA-101-3p | 22 |
| 3.1.6 Expressão do supressor tumoral miRNA-126-3p | 22 |
| 3.1.7 Expressão do supressor tumoral miRNA-145-3p | 22 |
| 3.2 Expressão Gênica de <i>VEGFA</i> e <i>HIF1A</i> considerando Dosagem e Tempo de Exposição a Radioterapia com ¹³¹ I | 25 |
| 3.3 Nível de miRNAs considerando Dosagem e Tempo de Exposição a Radioterapia com ¹³¹ I | 27 |
| 3.4 Associação de Expressão Gênica de <i>VEGFA</i> e <i>HIF1A</i> com miRNAs, em Linhagens Celulares de CCA considerando a Exposição ao ¹³¹ I..... | 32 |
| 3.4.1 Expressão gênica e de miRNA-142-3p..... | 32 |
| 3.4.2 Expressão gênica e de miRNA-210-5p | 34 |
| 3.4.3 Expressão gênica e de miRNA-126-3p..... | 36 |
| 3.4.4 Expressão gênica e de miRNA-145-3p..... | 38 |
| 3.4.5 Expressão gênica e de miRNA-224-3p..... | 40 |
| 3.4.6 Expressão gênica e de miRNA-101-3p..... | 42 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 45 |
| 5. CONCLUSÕES | 55 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |
| ANEXO I – Aprovação Comitê de Ética e Pesquisa | 69 |
| APÊNDICE I - Compilado de melhores condições da radioterapia metabólica utilizando iodo-131, para modulação de genes e microRNAs em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra e extra-hepático | 71 |

DEDICATÓRIA***Dedico este trabalho***

Aos meus pais, Edson e Aparecida, pelo amor incondicional, apoio e incentivo ao longo de minha jornada acadêmica. A vocês que sempre acreditaram em mim e me encorajaram a perseguir meus sonhos. A minha família e amigos, que comemoraram junto comigo cada conquista e que contribuíram cada um do seu jeitinho. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria primeiramente de agradecer a minha família pelo apoio incondicional. Sem o amor, paciência e compreensão de vocês, eu não teria alcançado esse marco em minha vida acadêmica. Não há palavras suficientes para expressar minha gratidão por todo amor, paciência e incentivo que vocês me deram ao longo dessa trajetória. Cada conquista minha é também uma conquista de vocês. Muito obrigado por estarem sempre ao meu lado.

Em especial, a minha mãe Aparecida Perpétua da Silva Buosi e ao meu pai Edson Luis Buosi (In memoriam), que se desdoblaram em vários para me proporcionar um estudo de qualidade e me guiar no caminho certo. Ao meu pai e avó, Genisse Modesto Buosi, que mesmo não estando aqui, sei que seguem me apoiando e me guiando para continuar firme com meu propósito. Sei também, que estão orgulhosos de mim!

Ao meu incrível namorado Thiago Delgado dos Santos, que entrou em minha vida neste momento e que mesmo sem fazer ideia do que era angiogênese, fez questão de aprender e enche o peito para falar: “O meu namorado faz mestrado em colangiocarcinoma na angiogênese”. Sem falar dos vários momentos de apoio e carinho para me encorajar a persistir. Obrigado por acreditar em mim, por entender as minhas ausências e por me incentivar a ir além dos meus limites. Minha gratidão sincera.

Aos meus amigos. Vocês foram minha motivação e minha fonte de alegria e risadas. Cada momento compartilhado, cada palavra de encorajamento e cada ombro amigo foram essenciais para me manter firme durante os desafios e celebrar as vitórias.

Aos meus colegas e amigos que encontrei nesse caminho. Ao pessoal do Laboratório NPBIM, do curso de Ciências Biológicas da UNIP, da Residência de Vigilância em Saúde, do Complexo Integrado de Educação Ciência e Cultura - CIECC, do Laboratório de Histotecnologia da FAMERP e da IDEXX Laboratórios. Muitos de vocês foram minha inspiração, cúmplices, incentivadores e educadores. Obrigado por cada debate enriquecedor, cada troca de experiências e cada momento de aprendizado. Vocês são uma parte essencial dessa conquista e levo cada um de vocês no meu coração.

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, minha orientadora e exemplo de ser humano e profissional. Agradeço por acreditar no meu potencial e por toda contribuição para o meu crescimento profissional e científico. Agradeço por toda paciência, parceria e amizade em todos esses anos de NPBIM. Minha gratidão e admiração por me ensinar tanto e por me possibilitar estar aqui.

Que essas palavras transmitam a profundidade do meu agradecimento e o amor que sinto por cada uma dessas pessoas especiais em minha vida. Vocês foram os pilares que sustentaram meu caminho até aqui. Muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, pela oportunidade oferecida, atenção, eficiência e por todo o suporte necessário.

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP pelo apoio financeiro.

À Universidade de Coimbra pela parceria no desenvolvimento das técnicas e concessão de amostras para a realização deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na execução deste trabalho (400988/2016-0).

Ao Laboratório Multiusuário (LMU) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) pelo suporte na utilização do Equipamento StepOnePlus™.

EPÍGRAFE

“Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados. Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades. Quando lutamos por eles, nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apoiam e nos compreendem. Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias, tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos.”

Augusto Cury

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1. | Classificação do colangiocarcinoma de acordo com a localização anatômica. | 02 |
| Figura 2. | Biogênese do microRNA e mecanismos de regulação do RNAm-alvo. | 05 |
| Figura 3. | Progressão do tumor por meio do processo de angiogênese. | 09 |
| Figura 4. | Expressão gênica de fator induzido por hipóxia (HIF1A) e fator de transcrição endotelial vascular (VEGFA) em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). | 18 |
| Figura 5. | Expressão de miRNA-142-3p, miRNA-210-5p e miRNA-224-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). | 21 |
| Figura 6. | Expressão de miRNA-101-3p, miRNA-101-3p e miRNA-126-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). | 24 |
| Figura 7. | Expressão gênica de fator de transcrição endotelial vascular (<i>VEGFA</i>) e fator induzido por hipóxia (<i>HIF1A</i>) em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). | 26 |
| Figura 8. | Expressão de miRNA-142-3p e miRNA-210-5p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). | 29 |
| Figura 9. | Expressão de miRNA-126-3p e miRNA-145-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). | 30 |

- Figura 10.** Expressão de miRNA-224-3p e miRNA-101-3p em linhagens 31
celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático
(TFK-1).
- Figura 11.** Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial 33
vascular (VEGFA) e fator induzido por hipóxia (HIF1A) com
miRNA-142-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra
(HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1).
- Figura 12.** Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial 35
vascular (VEGFA) e fator induzido por hipóxia (HIF1A) com
miRNA-210-5p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra
(HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1).
- Figura 13.** Associação de expressão gênica do fator de crescimento endotelial 37
vascular (VEGFA) e fator induzido por hipóxia (HIF1A) com
miRNA-126-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra
(HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1).
- Figura 14.** Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial 39
vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com miRNA-
145-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-
1) e extra-hepático (TFK-1).
- Figura 15.** Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial 41
vascular (VEGFA) e fator induzido por hipóxia (HIF1A) com
miRNA-224-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra
(HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1).
- Figura 16.** Associação de expressão gênica do fator de crescimento endotelial 43
vascular (VEGFA) e fator induzido por hipóxia (HIF1A) com
miRNA-101-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra
(HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|---|
| % | Porcentagem |
| ~ | Aproximadamente |
| < | Menor |
| °C | Grau Celsius |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| μL | Microlitro |
| Ago | <i>Argonaute</i> |
| ATG5 | <i>Autophagy-associated gene 5</i> - proteína 5 relacionada à autofagia |
| CCA | Colangiocarcinoma |
| cDNA | DNA complementar |
| CHC | Carcinoma hepatocelular |
| dCCA | Colangiocarcinoma Distal |
| DGCR8 | <i>Syndrome critical region gene 8</i> - região crítica 8 da síndrome de DiGeorge |
| DICER | Ribonuclease tipo III |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DROSHA | Ribonuclease tipo III |
| FAMERP | Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto |
| FAMERP/LMU | Laboratório Multiusuário da FAMERP |
| FCM/UNICAMP | Faculdade de Ciências Médicas de Campinas |
| FMUC | Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra |
| Gy | Dose absorvida |
| HIF-1 | Fator de transcrição induzido por hipóxia |
| HIF-1α | Fator de transcrição induzido por hipóxia 1 alfa |
| HIF-1β | Fator de transcrição induzido por hipóxia 1 beta |
| H69 | Colangiócitos intra-hepáticos não malignos |
| HuCCCT-1 | Linhagem celular de colangiocarcinoma intra-hepático |
| iCCA | Colangiocarcinoma Intra-hepático |
| Log2FC | <i>log2 fold change</i> |
| MYC | <i>Microcystin Synthetase</i> |
| min | Minutos |

| | |
|------------------------|--|
| miRNAs | Micro-RNAs |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| N | Números de indivíduos |
| ng | Nanograma |
| NIS | Bomba de Sódio e Iodo |
| NK | Células <i>Natural Killer</i> |
| nt | Nucleotídeos |
| Onco-mir | microRNA que está associado ao câncer |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| pCCA | Colangiocarcinoma Peri-hilar |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction Real Time</i> |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| Pre-miRNA | MiRNA precursor |
| Pri-miRNA | MiRNA primário |
| RAC1 | <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> - substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1 |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNA_m | Ácido ribonucleico mensageiro |
| RT-PCR | <i>Polymerase chain reaction Real Time</i> |
| TEM | Transição epitélio-mesenquimal |
| TFK-1 | Linhagem celular de colangiocarcinoma extra-hepático |
| TRBP | <i>Transactivation responsive RNA binding protein</i> - proteína de ligação a RNA responsiva à transativação |
| UTRs | Regiões não traduzidas |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VEGF-A | Fator de crescimento endotelial vascular A |
| XPO5 | Exportina 5 |
| 3' UTR | Região 3' não traduzida |
| ¹³¹I | Iodo Radioativo 131 |

RESUMO

Introdução - Colangiocarcinoma (CCA), segunda neoplasia hepática mais comum, é classificado em intra-hepático (iCCA), peri-hilar (pCCA) e distal (dCCA). Considerando a alta heterogeneidade de CCA, a caracterização genômica e molecular têm expandido ações terapêuticas. Radioterapia com iodo-131 (^{131}I) amplamente utilizada em tumores de tireoide tem potencial aplicação em neoplasias hepáticas. **Objetivos** – Avaliar os efeitos da radioterapia com ^{131}I sobre a expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e do fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) e de miRNAs alvos (101-3p, 126-3p, 145-3p, 142-3p, 210-5p e 224-3p), em linhagens celulares de CCA intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1). **Material e Métodos** - Linhagens celulares humanas de CCA (TFK-1 e HuCCT-1), e de colangiócitos intra-hepáticos não malignos (H69) foram cultivadas. TFK-1 e HuCCT-1 foram irradiadas com ^{131}I (dosagens: 1, 20 e 60 Gy) em diferentes tempos de exposição (2 horas, 48 horas e 12 dias). Após a exposição, foi realizada a extração de RNA e miRNA, para análise de expressão por RT-PCR, com resultados expressos em unidade de expressão relativa na base \log_2 *fold change*. **Resultados** – Em todas as dosagens e períodos, observou-se subexpressão de *HIF1A*, com destaque para as doses de 1Gy após 48 horas (-0,97), seguido de 20Gy (-0,60), na linhagem HuCCT-1. A linhagem TFK-1 mostrou valores reduzidos de *HIF1A* na dosagem 60Gy após 2 horas (-4,0), seguido de 20Gy (-3,86) e 1Gy (-2,67), após 48 horas. Houve subexpressão também em todas as dosagens e períodos para *VEGFA* na linhagem HuCCT-1, destacando-se 1Gy (-0,82 – 48 horas) e 60Gy (-2,06 – 12 dias). Para a linhagem TFK-1 houve subexpressão de *VEGFA* para 20Gy, após 12 dias (-2,09), seguido de 48 horas (-0,92), e para 60Gy, após 2 horas (-1,32). Em relação aos miRNAs, na linhagem HuCCT-1, destacou-se subexpressão de miRNA-224-3p e miRNA-101-3p em

todas as dosagens e períodos, particularmente, para 60Gy (-1,69), após 2 horas e 12 dias (-8,34), respectivamente; o mesmo ocorreu para o oncomiR 210-5p, destacando-se 20Gy, após 48 horas (-1,12). Por outro lado, nos demais miRNAs supressores tumorais destacaram-se valores elevados em 126-3p (60Gy: 2,65), 142-3p (1Gy: 6,94) e 145-3p (20Gy: 7,38), após 2 horas e 48 horas para os demais, respectivamente. A linhagem TFK-1 mostrou valores negativos em todas as dosagens e períodos apenas para miRNA-126-3p, especialmente, para 1Gy e 60 Gy, após 2 horas (-8,97; -8,38, respectivamente). Por outro lado, os demais miRNAs supressores tumorais mostraram valores aumentados principalmente, após 48 horas (101-3p - 1Gy: 4,87), 2 horas (142-3p - 20Gy: 1,21) e 12 dias (145-3p -1Gy: 2,26; e 224-3p – 20Gy: 2,78). O oncomiR-210-5p mostrou redução, com destaque para 60 Gy, após 12 dias (-0,57), mas superexpressão, após 48 horas na dosagem 1Gy (2,51). **Conclusão** - Ressalta-se o potencial da radioterapia com ¹³¹I na modulação da expressão dos genes *VEGFA* e *HIF1A* e de miRNAs, em função da dosagem e do tempo de exposição, contribuindo para a compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na angiogênese, destacando-se a relevância desta modalidade terapêutica para o CCA.

Palavras-chave: Radioterapia; MicroRNAs; Iodo; Câncer; Fígado; Angiogênese.

ABSTRACT

Introduction - Cholangiocarcinoma (CCA), the second most common hepatic neoplasm, is classified into intrahepatic (iCCA), perihilar (pCCA), and distal (dCCA). Considering the high heterogeneity of CCA, genomic and molecular characterization has expanded therapeutic actions. Radiotherapy with iodine-131 (^{131}I), widely used in thyroid tumors, has potential application in liver neoplasms. **Objectives** – To evaluate the effects of radiotherapy with ^{131}I on gene expression of vascular endothelial growth factor (*VEGFA*) and hypoxia-inducible factor (*HIF1A*) as well as target miRNAs (101-3p, 126-3p, 145-3p, 142-3p, 210-5p and 224-3p) in intrahepatic (HuCCT-1) and extrahepatic (TFK-1) CCA cell lines. **Material and Methods** - Human CCA cell lines (TFK-1 and HuCCT-1) and non-malignant intrahepatic cholangiocyte cell line (H69) were cultured. TFK-1 and HuCCT-1 were irradiated with ^{131}I (doses: 1, 20, and 60Gy) at different exposure times (2 hours, 48 hours, and 12 days). After exposure, RNA and miRNA extraction was performed, for expression analyzes by RT-PCR, with results expressed as relative expression unit on a log₂ fold change basis. **Results** – In all dosages and periods, *HIF1A* underexpression was observed, with emphasis on doses of 1Gy after 48 hours (-0.97), followed by 20Gy (-0.60) in the HuCCT-1 cell line. The TFK-1 cell line showed reduced *HIF1A* values at the 60Gy dose after 2 hours (-4.0), followed by 20Gy (-3.86) and 1Gy (-2.67) after 48 hours. There was also underexpression in all doses and periods for *VEGFA* in the HuCCT-1 cell line, notably at 1Gy (-0.82 – 48 hours) and 60Gy (-2.06 – 12 days). For the TFK-1 cell line, there was *VEGFA* underexpression for 20Gy after 12 days (-2.09), followed by 48 hours (-0.92), and for 60Gy after 2 hours (-1.32). Regarding miRNAs, in the HuCCT-1 cell line, underexpression of miRNA-224-3p and miRNA-101-3p was highlighted in all doses and periods, particularly for 60Gy (-1.69) after 2 hours

and 12 days (-8.34), respectively; the same occurred for the oncomiR 210-5p, with emphasis on 20Gy after 48 hours (-1.12). On the other hand, other tumor-suppressor miRNAs showed elevated values in 126-3p (60Gy: 2.65), 142-3p (1Gy: 6.94), and 145-3p (20Gy: 7.38) after 2 hours and 48 hours for the others, respectively. The TFK-1 cell line showed negative values in all doses and periods only for miRNA-126-3p, particularly for 1Gy and 60Gy after 2 hours (-8.97; -8.38, respectively). Conversely, other tumor-suppressor miRNAs showed increased values mainly after 48 hours (101-3p - 1Gy: 4.87), 2 hours (142-3p - 20Gy: 1.21), and 12 days (145-3p - 1Gy: 2.26; and 224-3p - 20Gy: 2.78). The oncomiR-210-5p showed a reduction, particularly for 60Gy after 12 days (-0.57), but overexpression after 48 hours at the 1Gy dose (2.51). **Conclusion** - The potential of Radiotherapy with ^{131}I in modulating the expression of *VEGFA* and *HIF1A* genes and miRNAs is emphasized, depending on the dose and exposure time, contributing to the understanding of molecular mechanisms involved in angiogenesis, highlighting the relevance of this therapeutic modality for CCA.

Keywords: Radiotherapy; MicroRNAs; Iodine; Cancer; Liver, Angiogenesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos do Colangiocarcinoma

O colangiocarcinoma (CCA) é a segunda neoplasia hepática mais comum,⁽¹⁾ que se desenvolve nos ductos biliares, caracterizando-se como um tumor geneticamente heterogêneo, raro, agressivo, com alta frequência de metástase e mortalidade.^(2,3) É classificado em três subtipos de acordo com o seu local de origem (Figura 1), incluindo intra-hepático (iCCA), localizado dentro do parênquima hepático próximo aos ductos de segunda ordem; peri-hilar (pCCA), originado entre os ductos biliares de segunda ordem e a inserção no ducto cístico e ducto biliar comum; e distal (dCCA), presente no ducto biliar comum, abaixo da inserção do ducto cístico.^(1,2,4)

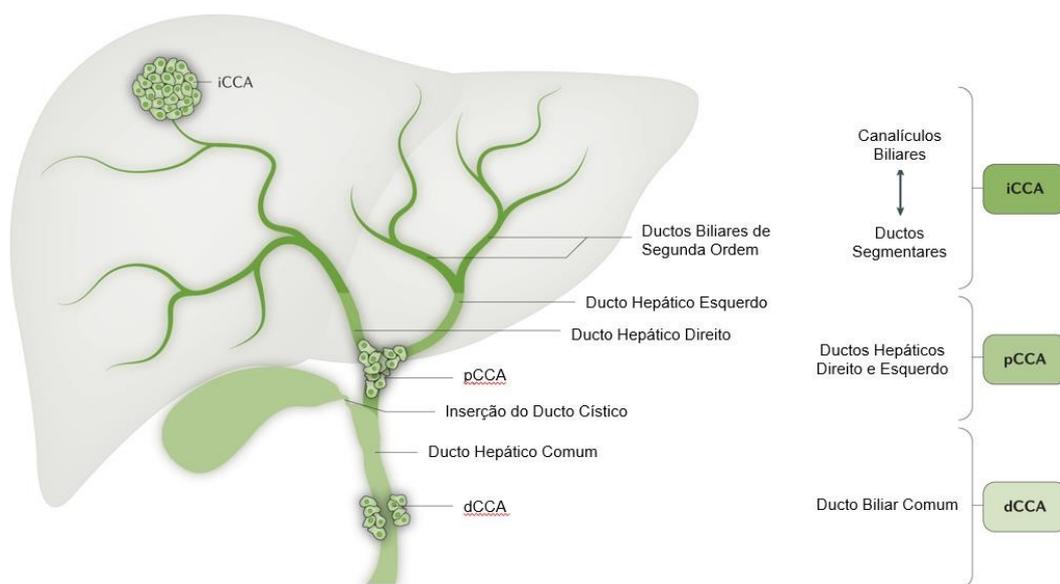


Figura 1. Classificação do colangiocarcinoma de acordo com a localização anatômica. Modificado de Brindley et al. (2021).⁽²⁾ iCCA= colangiocarcinoma intra-hepático; pCCA= colangiocarcinoma peri-hilar; dCCA= colangiocarcinoma distal.

Globalmente, essa neoplasia representa entre 10 e 15% dos casos de câncer hepático.⁽⁵⁾ Contudo, sua incidência tem aumentado nas duas últimas décadas,

principalmente, em países do continente Asiático como Tailândia, Coreia do Sul e China,^(3,4) onde a incidência de infecções por parasitas hepáticos é muito comum.⁽²⁾ Destacam-se entre os fatores de risco infecção por vírus da hepatite C e B, colelitíase, etilismo, cirrose, tabagismo, obesidade, diabetes, dentre outros.⁽³⁾

Por ser uma doença silenciosa e que apresenta, em seu estágio inicial, sintomas inespecíficos, geralmente é diagnosticada em fases avançadas, o que limita as opções terapêuticas e efetividade do tratamento.^(6,7) Ressalta-se que a ressecção cirúrgica e o transplante hepático oferecem possibilidade de cura, entretanto, apenas cerca de 25% dos casos são elegíveis para ressecção cirúrgica no diagnóstico.^(1,5) Para os casos sem indicação cirúrgica, as opções terapêuticas incluem quimioterapia e radioterapia.⁽⁵⁾ No entanto, de modo geral, estas abordagens têm caráter paliativo,⁽¹⁾ tornando-se imprescindível investigar novas formas de tratamento para a doença.

Os subtipos de colangiocarcinoma (CCA) apresentam diferenças significativas em prognóstico e gravidade, influenciadas principalmente pela localização anatômica do tumor e pelas particularidades de cada região afetada.^(1,8) O CCA intra-hepático (iCCA), localizado dentro do fígado, é frequentemente diagnosticado em estágios avançados devido à ausência de sintomas específicos iniciais, o que compromete as chances de tratamento cirúrgico e contribui para um prognóstico geralmente mais desfavorável.^(2,9,10) O CCA peri-hilar (pCCA), localizado próximo ao hilo hepático, é o subtipo mais comum e possui um prognóstico intermediário.^(1,4) Apesar de também ser diagnosticado tardiamente, o pCCA pode ser ressecado em alguns casos, embora a complexidade da cirurgia aumente os riscos.⁽¹¹⁾ Já o CCA distal (dCCA), presente na porção distal do ducto biliar, tende a ter o melhor prognóstico dos três subtipos, devido à maior acessibilidade cirúrgica e taxas mais elevadas de ressecção completa.^(1,2,12) Esses aspectos tornam o

entendimento das diferenças entre os subtipos essencial para o planejamento terapêutico e para o desenvolvimento de estratégias direcionadas ao manejo da doença.^(1,4)

1.2 Interação Gênica e Colangiocarcinoma

Considerando a alta heterogeneidade e as características individuais dos CCAs, a caracterização genômica e molecular tornam-se indispensáveis para investigar melhor a patogênese, ampliando as ações terapêuticas.⁽¹⁾ Nesse contexto, a utilização de marcadores moleculares como micro-RNAs (miRNAs) e genes alvo vêm sendo amplamente estudado. Os miRNAs, inicialmente descritos em 1993, consistem em uma classe de pequenos RNAs não codificantes de aproximadamente 18-22 nucleotídeos, geralmente localizados na região 3'UTRs dos RNAs mensageiros (RNAm).⁽¹³⁻¹⁵⁾

A biogênese (Figura 2) se inicia no núcleo, com a transcrição de DNA em miRNA primário (pri-miRNA) pela ação da polimerase II. Esta molécula, cuja estrutura se apresenta imperfeita, é clivada pelo complexo Drosha-DGCR8, resultando em nova estrutura formada por aproximadamente 60-90 nucleotídeos com extremidade 3' de dois nucleotídeos, o miRNA precursor (pre-miRNA). O pre-miRNA, é transportado para o citoplasma por meio da proteína de exportação XPO5 onde se tornará substrato para um complexo proteico (Dicer-TRBP), originando um miRNA de fita dupla que se dividirá ao interagir com proteínas da família *Argonaute* (Ago). A cadeia funcional dominante será incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) atuando, assim, na regulação gênica pós-transcricional.⁽¹³⁻¹⁵⁾

Quanto ao modo de ação, essas moléculas atuam sempre como inibidores, podendo desempenhar papéis distintos no câncer. Quando reprimem oncogenes, são caracterizados como miRNAs supressores de tumor, prevenindo o desenvolvimento da

doença. Por outro lado, ao inibir genes supressores de tumor, permitem o avanço tumoral, sendo então considerados, oncomiRs.^(15,16) Destacam-se por estarem envolvidos em vários processos da tumorigênese, como proliferação celular, apoptose, autofagia, migração, invasão e metástase.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

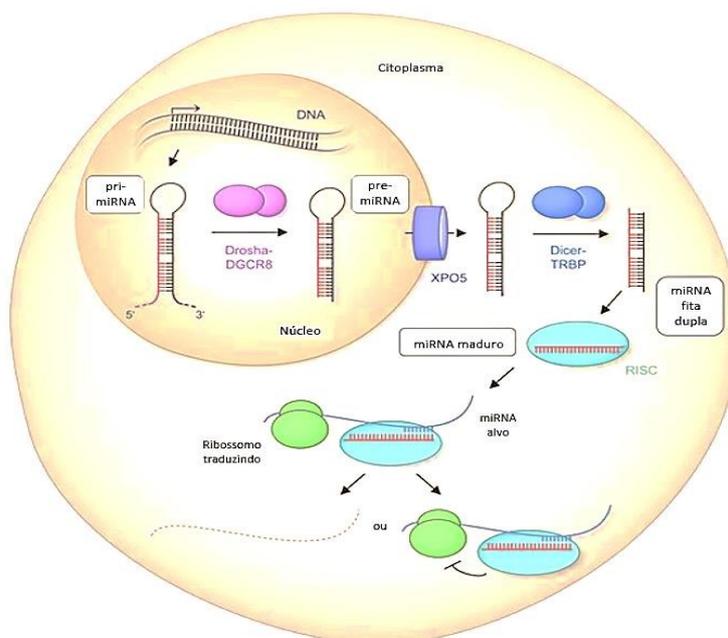


Figura 2. Biogênese do microRNA e mecanismos de regulação do RNAm-alvo. Transcrição do DNA em miRNA primário (pri-miRNA). Clivagem do pri-miRNA pelo Droscha-DGCR8 gerando miRNA precursor (pre-miRNA). Transporte do pre-miRNA até o citoplasma por meio da XPO5. Clivagem do pre-miRNA pelo Dicer-TRBP originando um miRNA de fita dupla. miRNA maduro incorporado pelo RISC. DROSHA= ribonuclease tipo III. DGCR8= syndrome critical region gene 8 - região crítica 8 da síndrome de DiGeorge. XPO5= exportina 5. DICER= ribonuclease tipo III. TRBP= transactivation responsive RNA binding protein - proteína de ligação a RNA responsiva à transativação. RISC= RNA-induced silencing complex - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA. Porção funcional do miRNA está indicada em vermelho. Alvo do RNAm apresentado pela linha azul sólida. Linha azul tracejada representa o RNAm degradado. Corpos lilás representam o complexo Droscha-DGCR8. Cilindro azul representa a proteína exportina-5. Corpos azuis representam o complexo Dicer-TRBP. Corpos turquesas representam complexo RISC. Corpos verdes representam os ribossomos. Adaptado de Diener et al., 2024.⁽¹⁴⁾

Adicionalmente, os miRNAs têm expressão diferencial em tipos de câncer associados a diferentes tecidos, como resultado da complexidade dos múltiplos alvos que afetam inúmeros transcritos nas vias de sinalização relacionadas a tumorigênese.^(20,21) Entre os fatores genéticos associados à carcinogênese, destacam-se aqueles envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos no tumor, essenciais para seu crescimento e disseminação metastática.⁽²²⁻²⁴⁾ Desse modo, é crescente o interesse pelo desenvolvimento de agentes terapêuticos que atuem nesses mecanismos.

Nesse contexto, o miRNA-142-3p surge como um potencial supressor tumoral, uma vez que atua no substrato de toxina botulínica C3 relacionado a proteína Ras 1 (*RAC1= Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), que regula eventos chave como angiogênese, ampliando a patogenicidade do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF = vascular endothelial growth factor*).⁽²⁵⁾ Além disso, He et al. Observaram que a expressão deste miRNA está reduzida no carcinoma hepatocelular (CHC). No entanto, quando superexpresso exerce funções anti-tumorais, reprimindo células metastáticas e revertendo a formação da transição epitélio-mesenquimal (TEM), um processo fundamental para a progressão tumoral, no qual células epiteliais adquirem características mesenquimais, facilitando a invasão e migração para tecidos distantes.⁽²⁶⁾

Por outro lado, o miRNA-210-5p destaca-se pelo efeito oposto, atuando como oncomiR.⁽²⁷⁾ Este miRNA regula a resposta à hipóxia, com foco no *HIF-1 α* , e integra a resposta adaptativa celular para promover a sobrevivência em ambientes de baixa disponibilidade de oxigênio, favorecendo a angiogênese e o crescimento tumoral sob condições adversas.^(27,28) Tem sua expressão aumentada em CHC correlacionada com outros tipos de carcinoma, como câncer colorretal, de pulmão e pâncreas.^(27,28) No CCA, sua expressão elevada em condições de hipóxia favorece a adaptação tumoral,

contribuindo para a proliferação celular, metástase, apoptose e resistência a quimioterapia. Desse modo, destaca-se a inibição desse miRNA como um alvo promissor no tratamento do CCA.⁽²⁹⁾ Adicionalmente, a hipóxia pode aumentar a expressão relativa da proteína 5 relacionada à autofagia (ATG5= *autophagy-associated gene 5*), importante alvo do miRNA-224-3p, que sugere uma indução da autofagia em células tumorais,⁽³⁰⁾ evidenciando sua ação antitumoral.

O miRNA-101-3p é um importante inibidor de angiogênese, atuando diretamente no *VEGF*,⁽³¹⁾ regulando negativamente sua expressão e diminuindo a invasão e migração celular e, conseqüentemente, a apoptose.⁽³²⁾ Estudos observaram o efeito importante no desenvolvimento de fibrose em doenças hepáticas, câncer e outras doenças. MiRNA-101-3p torna-se o foco e ponto importante da pesquisa sobre o câncer,⁽³³⁾ considerando que sua subexpressão em CHC está associada ao pior prognóstico, por causar supressão tumoral, tendo como alvo inúmeros genes.⁽³⁴⁾

Destaca-se também como supressor tumoral o miRNA-126-3p capaz de modular negativamente inúmeros genes, dentre eles o *VEGFA*, atuando como supressor tumoral. Há referência de sua expressão reduzida em vários tipos de câncer como CCA, glioma, CHC, de esôfago e pâncreas.^(35,36) Ressalta-se, ainda, a restauração de miRNA-126-3p em cultura de células tumorais hepáticas, como estratégia para aumento da citólise mediada por células *natural killer* (NK) e interferência na neo-angiogênese e a disseminação do tumor.⁽³⁶⁾

Adicionalmente, evidencia-se a ação semelhante do supressor tumoral miRNA-145-3p em que se destaca a ação direta no *VEGF*.⁽³²⁾ Diante da redução da expressão, observou-se mau prognóstico em câncer de próstata, mama, gástrico e colorretal em detrimento de oncoproteínas, proliferação celular e potencial angiogênico.⁽³⁷⁾ Além disso,

miRNA-145-3p inibiu a glicólise em câncer cervical pela regulação do proto-oncogene *MCY* (*microcystin synthetase*), assim como, por controlar proliferação celular e metástase.⁽³⁸⁾ De fato, miRNAs podem regular de forma positiva ou negativa inúmeros genes alvo, uma vez que participam do metabolismo celular, destacando-se que níveis desses miRNAs podem ser influenciados por diferentes tipos de terapias anticâncer.^(38,39)

Nosso grupo avaliou a eficácia terapêutica do iodo-131 (¹³¹I) em duas linhagens celulares de CCA intra (HuCCT-1) e extra-hepáticas (TFK-1).⁽⁶⁾ Observamos expressão elevada do simportador de sódio-iodo (NIS), além de redução da viabilidade e sobrevivência celular após a irradiação das células tumorais com ¹³¹I, em comparação aos colangiócitos normais. Reconhecidamente, esse transportador medeia a captação de iodo pela tireoide, representando um componente-chave na radioterapia metabólica utilizando ¹³¹I para o tratamento do câncer de tireoide.⁽⁴⁰⁾ Contudo, faz-se necessário avaliar o efeito dessa terapêutica na expressão de miRNAs envolvidos na modulação de vias associadas ao desenvolvimento de câncer de ductos biliares.

1.3 Angiogênese e Colangiocarcinoma

A angiogênese (Figura 3) é um processo biológico fundamental para o crescimento tumoral, no qual novos vasos sanguíneos se formam a partir de uma rede vascular pré-existente para suprir a demanda de oxigênio e nutrientes dos tecidos com rápida proliferação, como observado em muitos tipos de câncer, incluindo o CCA.^(41,42)

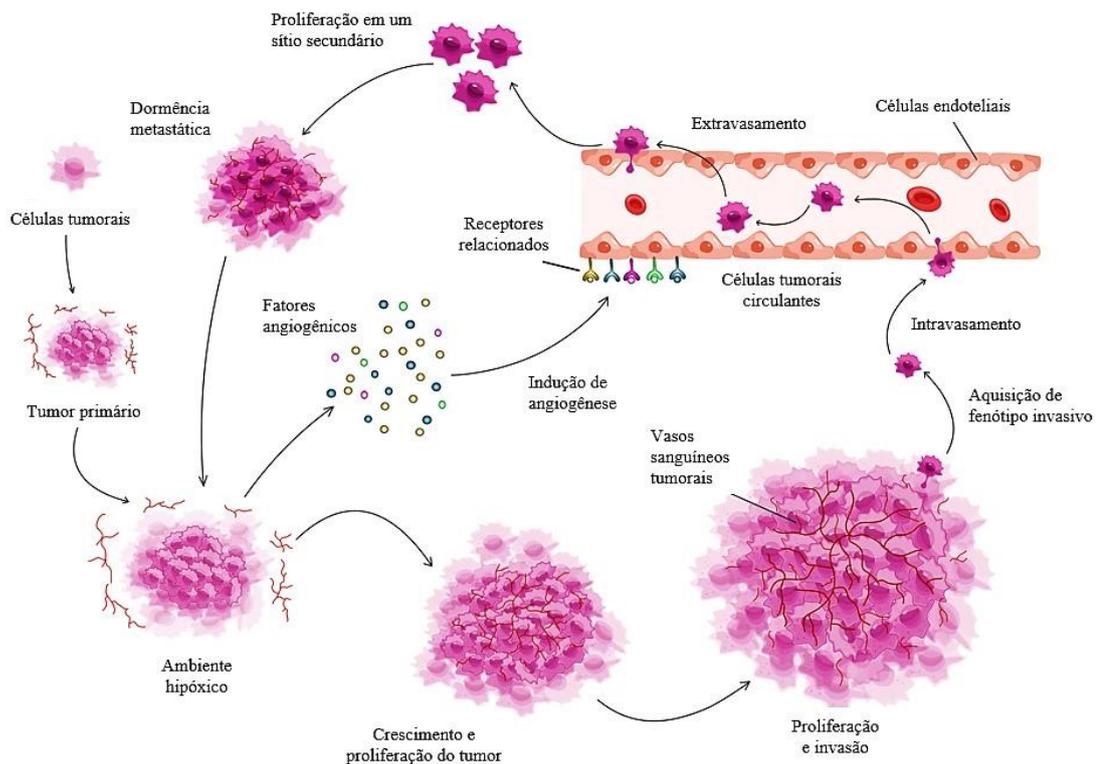


Figura 3. Progressão tumoral mediada pela angiogênese. A rápida expansão do tumor gera um ambiente de privação de oxigênio e nutrientes. Esse microambiente hipóxico estimula a liberação de fatores pró angiogênicos, resultando na formação de novos vasos sanguíneos. Esses vasos recém-formados fornecem suporte vital para o transporte de oxigênio e nutrientes, promovendo a sobrevivência, crescimento e proliferação de células tumorais. Células com fenótipo mais agressivo podem invadir tecidos adjacentes e disseminar-se para regiões distantes pela corrente sanguínea, culminando em metástases. Modificado de Pathak et al., 2024.⁽⁴¹⁾

O fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF) é essencial para a adaptação celular em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, regulando a expressão de genes que mantêm a homeostase. O HIF-1, um heterodímero composto pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β é central nesse processo. Sob condições normóxicas, HIF-1 β é constitutivamente expresso, enquanto HIF-1 α é rapidamente degradado em um processo dependente de oxigênio. Em hipóxia, o HIF-1 α não é degradado e regula mais de 100 genes relacionados à eritropoiese, metabolismo de ferro e glicose, proliferação celular,

apoptose e angiogênese. ^(23,43,44) O principal gene-alvo de HIF-1 α é o fator pró-angiogênico denominado fator de crescimento endotelial vascular (VEGF= *vascular endothelial growth factor*).

O VEGF, uma glicoproteína que se liga à heparina, atua como um potente agente de permeabilidade vascular e é reconhecido como um promotor central da angiogênese.^(23,45) Identificado por Ferrara e Henzel em 1989, o VEGF é expresso por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, células musculares lisas, condrócitos hipertróficos e osteoblastos.⁽⁴⁶⁾ Além disso, o VEGF é fator promotor da angiogênese, processo necessário para o crescimento do tumor primário, invasão e metástases.^(23,46) Entre os membros dessa família de fatores de crescimento, o VEGFA é o principal regulador da angiogênese tumoral e da permeabilidade vascular, facilitando a progressão tumoral e a disseminação metastática.⁽⁴⁷⁾

A integração de marcadores moleculares que influenciam a angiogênese, associada à análise da resposta à radioterapia metabólica com ¹³¹I, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de tumorigênese no CCA com perspectiva para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da radioterapia metabólica com ¹³¹I sobre a expressão dos genes-alvo *VEGFA* e *HIF1A*, bem como de miRNAs (101-3p, 126-3p, 142-3p, 145-3p, 210-5p e 224-3p) em linhagens celulares de CCA intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), visando avaliar seu potencial terapêutico.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Analisar a expressão dos genes-alvo *HIF1A* e *VEGFA* em linhagens celulares humanas de CCA (HuCCT-1 e TFK-1), expostas a radioterapia metabólica com ^{131}I .
2. Analisar a expressão dos miRNAs 101-3p, 126-3p, 142-3p, 145-3p, 210-5p e 224-3p em cultura de linhagens celulares humanas de CCA (HuCCT-1 e TFK-1) expostas a radioterapia metabólica com ^{131}I .
3. Avaliar a associação da expressão dos genes *HIF1A* e *VEGFA* com a expressão dos miRNAs 101-3p, 126-3p, 142-3p, 145-3p, 210-5p e 224-3p, nas linhagens celulares HuCCT-1 e TFK-1 expostas ao ^{131}I .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura Celular

Foram utilizadas linhagens celulares humanas de CCA TFK-1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) e HuCCT-1 (JCRB0425, JCRB Cell Bank), juntamente com a linhagem celular humana imortalizada de colangiócitos intra-hepáticos não malignos (H69). Essa etapa foi realizada no Instituto Biomédico de Investigação em Luz e Imagem da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), colaborador neste estudo, de acordo com as instruções do fabricante, em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco®) e piruvato de sódio (Gibco®; Thermo Fisher Scientific) a 400 mM, pH 7,4. As células H69 foram cultivadas de acordo com Hohenester et al. (2012).⁽⁴⁸⁾ As células foram mantidas em atmosfera umidificada, 37°C e 5% de CO₂ e foi realizado repique duas vezes por semana (Incubadora Heraeus HeraCell 150 CO₂, BridgePath Scientific).

2.2 Irradiação de Células com ¹³¹I

As linhagens celulares em cultura foram irradiadas com diferentes doses de ¹³¹I (1, 20 e 60 Gy) e tempos de exposição (2 horas, 48 horas e 12 dias), conforme protocolo previamente estabelecido⁽⁴⁹⁾ e padronizado por Brito et al.⁽⁶⁾ Todas as análises utilizaram células controle (H69; não irradiadas) e irradiadas (TFK-1 e HuCCT-1). As doses e os tempos foram previamente calculados pela equação $D = \frac{A_0 T_{1/2} e^{\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t} E}{\ln 2 M}$, em que D = dose absorvida (Gy), A₀ = atividade inicial da fonte radioativa (mCi), T_{1/2} = meia vida, t = tempo de irradiação (s), E = energia média de desintegração (eV), M = massa da amostra sujeita a irradiação (kg).⁽⁶⁾ Ensaios clonogênicos utilizando a coloração violeta de cristal

foram utilizados para garantir a sobrevivência e viabilidade celular, bem como, determinar a dose de ^{131}I necessária para inibir 50% da sobrevivência celular.⁽⁶⁾

2.3 Análise de Expressão Gênica e miRNA

Após exposição ao ^{131}I , as células TFK-1 e HuCCT-1 foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para extração de RNA e miRNA nas células em suspensão de 2×10^6 células/mL utilizou-se Trizol (Thermo Fisher Scientific[®]), de acordo com o manual do fabricante. A concentração e pureza do RNA total extraído foram analisadas pelo NanoDrop (NanoDrop Technologies), e considerou-se absorvância da amostra sobre a proporção de 260/280 para pureza do RNA total, e 1,7 – 2,0 para integridade da amostra. Para a transcrição reversa de RNAm e miRNAs foi utilizado o kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription, específicos para os miRNAs e universal para mRNA (material suplementar – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Com volume final de 20 μL , a reação foi submetida ao termociclador com as condições de ciclagem de 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos. As amostras de cDNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão, utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) e testadas em duplicata. A reação, com volume final de 20 μL , foi composta por 10 μL de TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 μL de sonda TaqMan (material suplementar), 2 μL de cDNA (10 ng) e 7 μL de água livre de nucleases. As condições de qPCR foram de 50°C por 2 min, 95°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos a 95° C durante 15s e 60°C por 1 min.

A expressão relativa dos miRNAs e RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008) e a reação normalizada pelos genes

housekeeping U6 e RNU48 e pelo controle negativo. Os resultados foram expressos em unidade de expressão relativa na base \log_2 *fold change* (Log2FC).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Nível de Expressão Gênica e de miRNAs em Linhagens Celulares de CCA Considerando a Exposição ao ^{131}I

3.1.1 Expressão gênica de *HIF1A* e *VEGFA*

Para *HIF1A* (Figura 4A-B), a linhagem HuCCT-1 apresentou subexpressão em todas as dosagens e períodos de exposição ao ^{131}I , exceto na dosagem de 60Gy, que mostrou superexpressão, após 12 dias (0,79; Figura 4A). Por outro lado, a linhagem TFK-1 mostrou superexpressão de *HIF1A* em 1Gy (0,71) e 20Gy (0,91) nas primeiras 2 horas após a exposição ao ^{131}I , seguida por expressiva redução nos níveis de expressão após 48 horas (-2,67 e -3,86, respectivamente) e 12 dias (-1,54 e -3,70, respectivamente) (Figura 4B). A dosagem de 60Gy nesta linhagem mostrou subexpressão imediata após 2 horas (-4,00), com aumento da expressão nos períodos subsequentes, especialmente aos 12 dias (0,90).

Em relação a *VEGFA* (Figura 4C-D), a linhagem HuCCT-1 mostrou subexpressão em todas as dosagens e períodos, destacando-se 1Gy e 60Gy, após 2 horas (-1,89) e 12 dias (-2,06), respectivamente (Figura 4C). Por outro lado, observou-se na linhagem TFK-1 superexpressão de *VEGFA* após 2 horas, na dosagem 1Gy (1,01) e principalmente para 20Gy (4,28; Figura 4D). No entanto, a dosagem 1Gy associou-se a superexpressão de *VEGFA* também após 48 horas e 12 dias (0,45 e 0,46, respectivamente), enquanto 20Gy resultou em subexpressão nos referidos períodos (-0,92 e -2,09, respectivamente). A dosagem 60Gy mostrou um padrão crescente, com subexpressão nas primeiras 2 horas (-1,32), seguido de superexpressão após 48 horas (0,06) e 12 dias (1,29).

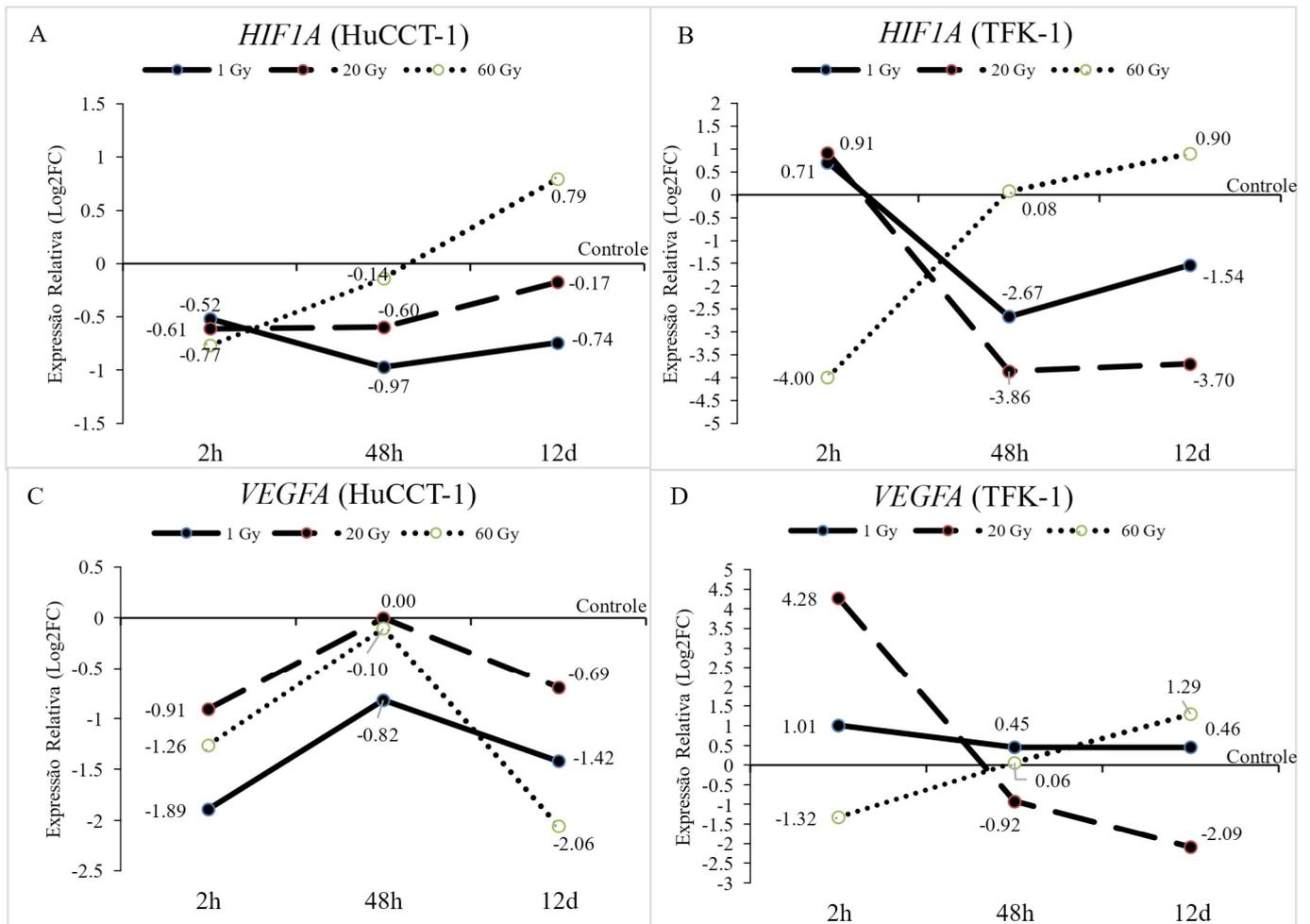


Figura 4. Expressão gênica de fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) e fator de transcrição endotelial vascular (*VEGFA*) em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1): A) *HIF1A* (HuCCT-1), B) *HIF1A* (TFK-1), C) *VEGFA* (HuCCT-1) e D) *VEGFA* (TFK-1) expostas a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias. Log2FC = log2 fold change.

3.1.2 Expressão do supressor tumoral miRNA-142-3p

Para a linhagem HuCCT-1, houve acréscimo considerável nos níveis de expressão de miRNA-142-3p após tratamento com ^{131}I nas três doses em 48 horas, principalmente, com 1Gy (6,94) e 20Gy (5,64), comparado a 60Gy (2,58). Por outro lado, houve subexpressão acentuada na dosagem de 1Gy, após 2 horas de exposição (-4,06) (Figura 5A). Para a linhagem TFK-1, os níveis de expressão de miRNA-142-3p foram mais elevados na dose de 20Gy (1,12) em comparação com 1 e 60Gy (0,93 para ambos) depois

de 2 horas de tratamento. Ao considerar a influência do tempo (2 horas, 48 horas e 12 dias) na expressão deste marcador, observou-se aumento progressivo nas doses 1Gy (-4,32; 0,93 e 1,18, respectivamente) e 60Gy (-5,06; 0,93 e 1,01, respectivamente). Por outro lado, para a dose de 20Gy, houve redução gradual da expressão de miRNA-142-3p de acordo com o aumento do tempo de exposição (1,21; 1,12 e 0,69, respectivamente; Figura 5B).

3.1.3 Expressão do oncomiR 210-5p

A Figura 5C mostra os valores de expressão para a linhagem HuCCT-1. Destacou-se a subexpressão de miRNA-210-5p exceto na dosagem de 1Gy, após duas horas de exposição (0,49) e, principalmente, na dosagem de 60Gy, associada a aumento exacerbado da expressão após 12 dias (3,83) de exposição ao ^{131}I . Por outro lado, a linhagem TFK-1 mostrou aumento exacerbado da expressão de miRNA-210-5p principalmente nas três dosagens após 48 horas de exposição (1Gy= 2,51, 20Gy= 0,69 e 60Gy= 0,57) em comparação aos outros períodos, após 2 horas (0,75, 0,41 e -0,14, respectivamente) e 12 dias (1,28, 0,60 e -0,57, respectivamente), destacando a subexpressão na dosagem apenas de 60Gy após 2 horas (-0,14) e 12 dias (-0,57; Figura 5D).

3.1.4 Expressão do supressor tumoral miRNA-224-3p

Em células HuCCT-1, notou-se subexpressão de miRNA-224-3p em todas as condições analisadas em relação ao controle. Observou-se, ainda, aumento progressivo da expressão de miRNA-224-3p ao utilizar dose de 60Gy em 2 horas (-1,69), 48 horas (-1,36) e 12 dias (-0,70). Por outro lado, houve decréscimo na expressão na dose de 1Gy

em três tempos (2 horas= -0,74, 48 horas= -1,38 e 12 dias= -1,54; Figura 5E). Nas células TFK-1, observou-se superexpressão de miRNA-224-3p associada ao aumento de dose após 2h (1Gy= 1,19, 20Gy= 1,92 e 60Gy= 1,86). Após 48 horas de irradiação com ^{131}I , os níveis continuaram superexpressos, entretanto, observou-se decréscimo em todas as doses (1Gy= 0,62, 20Gy= 0,51 e 60Gy= 1,54), seguido de acréscimo após 12 dias (1Gy= 2,71, 20Gy= 2,78 e 60Gy= 2,56; Figura 5F).

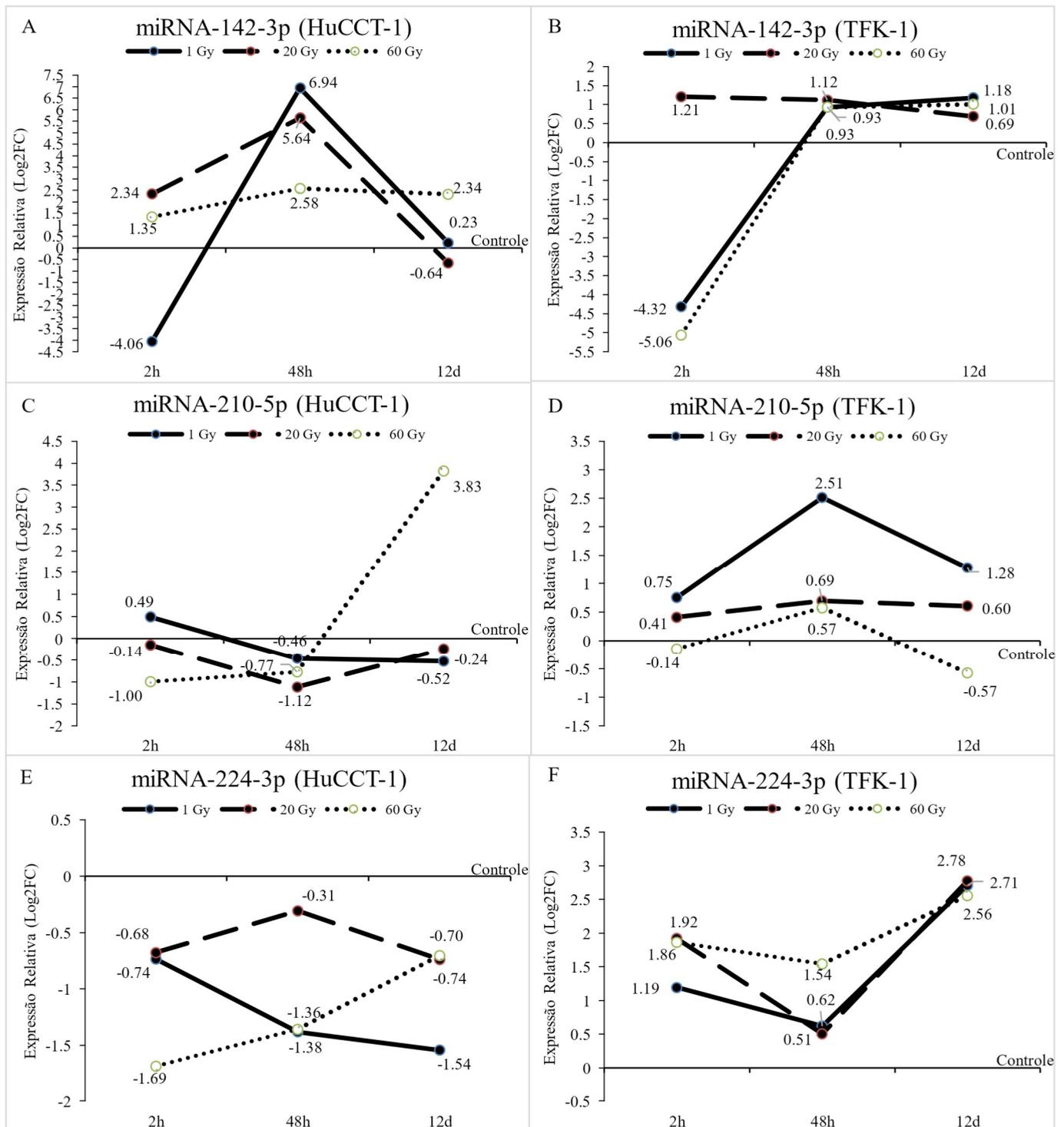


Figura 5. Expressão de miRNA-142-3p, miRNA-210-5p e miRNA-224-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1): A) miRNA-142-3p (HuCCT-1), B) miRNA-142-3p (TFK-1), C) miRNA-210-5p (HuCCT-1), D) miRNA-210-5p (TFK-1), E) miRNA-224-3p (HuCCT-1) e F) miRNA-224-3p (TFK-1) expostas a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas, 48 horas e 12 dias. Log2FC = log2 fold change.

3.1.5 Expressão do supressor tumoral miRNA-101-3p

Em relação à linhagem HuCCT-1 (Figura 6A) observou-se subexpressão em todas as dosagens e tempos, com a redução da expressão com o passar do tempo: 2 horas (1Gy= -1,05, 20Gy= -0,36 e 60Gy= -1,5); 48 horas (1Gy= -1,21, 20Gy= -1,34 e 60Gy= -7,75) e 12 dias (1Gy= -1,42, 20Gy= -1,44 e 60Gy= -8,34). Destacou-se a dose de 60Gy associada a expressão extremamente reduzida em todos os tempos (2 horas = -1,50; 48 horas = -7,75; 12 dias = -8,34). Por outro lado, para a linhagem TFK-1 (Figura 6B) foi observado a superexpressão em todas dosagens e tempos, particularmente na dosagem de 1Gy após 48 horas (4,87). A dosagem de 60Gy associou-se a valores reduzidos de expressão, particularmente, após duas horas (0,40) e 12 dias (0,71).

3.1.6 Expressão do supressor tumoral miRNA-126-3p

Em células HuCCT-1 (Figura 6C), observou-se expressão elevada de miRNA-126-3p após 2 horas de tratamento com ^{131}I ao aumentar as doses (1Gy = -2,94, 20Gy = 1,48 e 60Gy = 2,65). Por outro lado, na análise considerando variações do tempo de exposição ao ^{131}I com dose de 60Gy, houve decréscimo da expressão do miRNA-126-3p (2 horas: 2,65, 48 horas: 2,58 e 12 dias: 2,34). Para células TFK-1, mostrou-se subexpressão em todos os tempos e dosagens, destacando um aumento progressivo para as dosagens 1Gy (2 horas = -8,97; 48 horas = -3,64; 12 dias = -2,84) e 20Gy (2 horas = -3,64; 48 horas = -3,64; 12 dias = -2,84; Figura 6D).

3.1.7 Expressão do supressor tumoral miRNA-145-3p

A Figura 6E mostra os valores de expressão para a linhagem HuCCT-1. Destacou-se a superexpressão de miRNA-145-3p na dosagem de 1 e 20Gy após 48 horas de

exposição ao ^{131}I (4,72 e 7,38, respectivamente), assim como, elevação nas doses de 1 e 60Gy após 2 horas de exposição (2,08 e 2,91, respectivamente). Houve subexpressão de miRNA-145-3p em todas as dosagens (1, 20 e 60 Gy), após 12 dias de irradiação com ^{131}I (-2,09; -0,06 e -0,23, respectivamente). Em relação a linhagem TFK-1 (Figura 6F), mostrou aumento considerável da expressão de miRNA-145-3p na dosagem de 1Gy em 2 horas, 48 horas e 12 dias (-3,40, -0,81 e 2,26, respectivamente) e, ainda, ao considerar as doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy em 2 horas (-3,40, -1,25 e 1,30, respectivamente) e 48 horas (-0,81, -0,38 e 0,02, respectivamente).

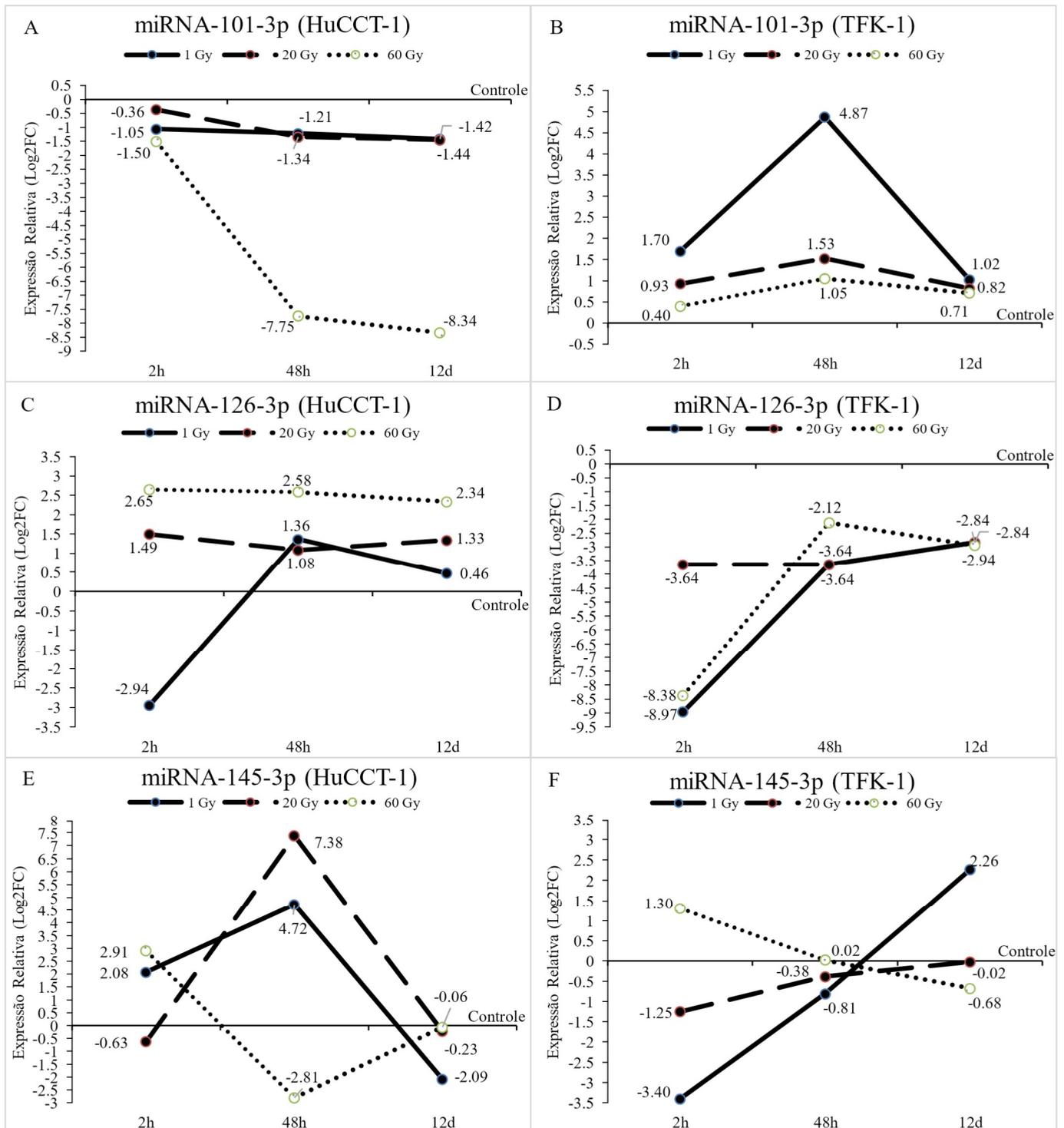


Figura 6. Expressão de miRNA-101-3p, miRNA-101-3p e miRNA-126-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1): A) miRNA-101-3p (HuCCT-1), B) miRNA-101-3p (TFK-1), C) miRNA-126-3p (HuCCT-1), D) miRNA-126-3p (TFK-1), E) miRNA-145-3p (HuCCT-1) e F) miRNA-145-3p (TFK-1) expostas a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias. Log2FC = log2 fold change.

3.2 Expressão Gênica de *VEGFA* e *HIF1A* considerando Dosagem e Tempo de Exposição a Radioterapia com ^{131}I

Na análise do *VEGFA*, a linhagem HuCCT-1 apresentou subexpressão consistente em todos os períodos para a dosagem de 1Gy (2 horas = -1,89; 48 horas = -0,82; 12 dias = -1,42), enquanto a linhagem TFK-1 mostrou superexpressão (1,01, 0,45 e 0,46, respectivamente; Figura 7A). Para a dosagem de 20Gy apenas a linhagem TFK-1 mostrou superexpressão após 2 horas (4,28; Figura 7B), para os demais tempos observou-se subexpressão. Para a dosagem de 60Gy houve subexpressão de *VEGFA* para as duas linhagens, após 2 horas (HuCCT-1 = -1,26; TFK-1 = -1,32), no entanto, manteve-se subexpresso apenas em HuCCT-1 (48 horas = -0,10; 12 dias = -2,06), enquanto em TFK-1 destacou-se superexpressão, após 12 dias (1,29; Figura 7C).

Em relação à expressão de *HIF1A*, observou-se um padrão similar nas dosagens de 1Gy e 20Gy, com subexpressão na linhagem HuCCT-1 (-0,52 e -0,61, respectivamente) e superexpressão em TFK-1 (0,71 e 0,91, respectivamente), após 2 horas de exposição ao ^{131}I (Figura 7D-E). Após 48 horas nas referidas doses houve subexpressão em HuCCT-1 (-0,97 e -0,60, respectivamente), assim como em TFK-1 (-2,67 e -3,86, respectivamente). O mesmo ocorreu após 12 dias, com valores reduzidos principalmente em TFK-1 na dose de 20Gy (-3,70; Figura 7D-E). Para a dosagem de 60Gy houve subexpressão de *HIF1A*, após 2 horas em ambas as linhagens, com destaque para TFK-1 (-4,00), e superexpressão após 12 dias (HuCCT-1 = 0,79 e TFK-1 = 0,90), enquanto em 48 horas expressão reduzida (HuCCT-1 = -0,14 e TFK-1 = 0,08; Figura 7F).

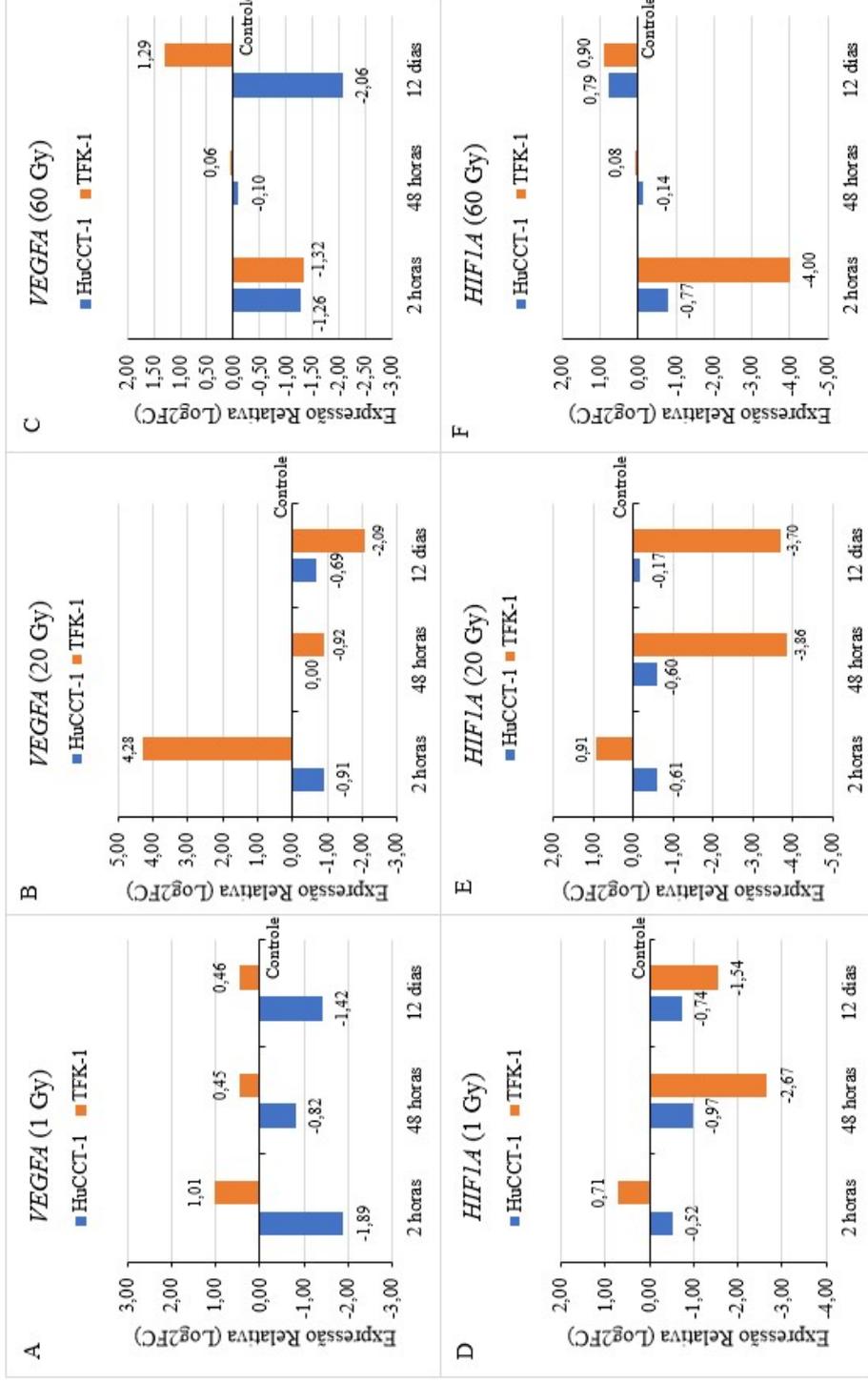


Figura 7. Expressão gênica de fator de transcrição endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) *VEGFA* (1 Gy), B) *VEGFA* (20 Gy), C) *VEGFA* (60 Gy), D) *HIF1A* (1 Gy), E) *HIF1A* (20 Gy) e E) *HIF1A* (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

3.3 Nível de miRNAs considerando Dosagem e Tempo de Exposição a Radioterapia com ^{131}I

Observou-se subexpressão nas duas linhagens para miRNA-142-3p na dose de 1Gy após 2 horas de exposição (HuCCT-1 = -4,06 e TFK-1 = -4,32), seguido de superexpressão, após 48 horas (HuCCT-1 = 6,94 e TFK-1 = 0,93) e 12 dias (HuCCT-1 = 0,23 e TFK-1 = 1,18; Figura 8A). Já para as outras dosagens, destacou-se superexpressão particularmente na linhagem HuCCT-1, após 48 horas na dose 20Gy (5,64; Figura 8B), enquanto subexpressão foi observada em TFK-1, após 2 horas na dose de 60Gy (-5,06; Figura 8C).

Em relação ao miRNA-210-5p, para a dose 1Gy destacou-se a superexpressão na linhagem TFK-1, após 48 horas (2,51; Figura 8D), enquanto na dose 20Gy houve subexpressão na linhagem HuCCT-1 (-1,12; Figura 8E). No entanto, essa linhagem apresentou os níveis mais elevados de expressão considerando 12 dias na dose de 60Gy (3,83; Figura 8F).

Para o miRNA-126-3p, predominou subexpressão acentuada em todas as dosagens para a linhagem TFK-1 (Figura 9A-C), particularmente, após 2 horas nas dosagens de 1Gy (-8,97) e 60Gy (-8,38). Por outro lado, para HuCCT-1 houve superexpressão com destaque na dose 60Gy, após 2 horas (2,65), 48 horas (2,58) e 12 dias (2,34), entretanto, houve subexpressão na dose 1Gy, após 2 horas de exposição ao ^{131}I (-2,94; Figura 9A).

Para miRNA-145-3p (Figura 9D-F) destacou-se superexpressão na linhagem HuCCT-1 na dose 1Gy e 20Gy em exposição por 48 horas (4,72 e 7,38, respectivamente; Figura 9D-E), no entanto, houve subexpressão nas doses 1Gy e 60 Gy, respectivamente, após 12 dias (-2,09; Figura 9D) e 48 horas (-2,81; Figura 9F). Subexpressão também foi

observada na linhagem TFK-1 na dose 1Gy, após 2 horas (-3,40), no entanto, com superexpressão, após 12 dias (2,26; Figura 9D), assim como, também após 2 horas na dose 60Gy (1,30; Figura 9F).

Em relação aos miRNAs 224-3p e 101-3p (Figura 10A-F), foi observada subexpressão em todas as dosagens e tempos na linhagem HuCCT-1. Para miRNA-224-3p destacou-se 1Gy após 12 dias (-1,54; Figura 10A) e 60Gy, após 2 horas (-1,69) e 48 horas (-1,36), enquanto para miRNA-101-3p, a dose 60Gy após 48 horas (-7,75) e 12 dias (-8,34; Figura 10F). Por outro lado, linhagem TFK-1, ambos os miRNAs mostraram superexpressão. O miRNA-224-3p destacou-se após 12 dias nas dosagens 1Gy (2,71), 20Gy (2,78) e 60Gy (2,56; Figura 9A-C), e para o miRNA-101-3p, a dose 1Gy, após 48 horas (4,87), seguido de 20Gy também nesse período (1,53) (Figura 10D-E).

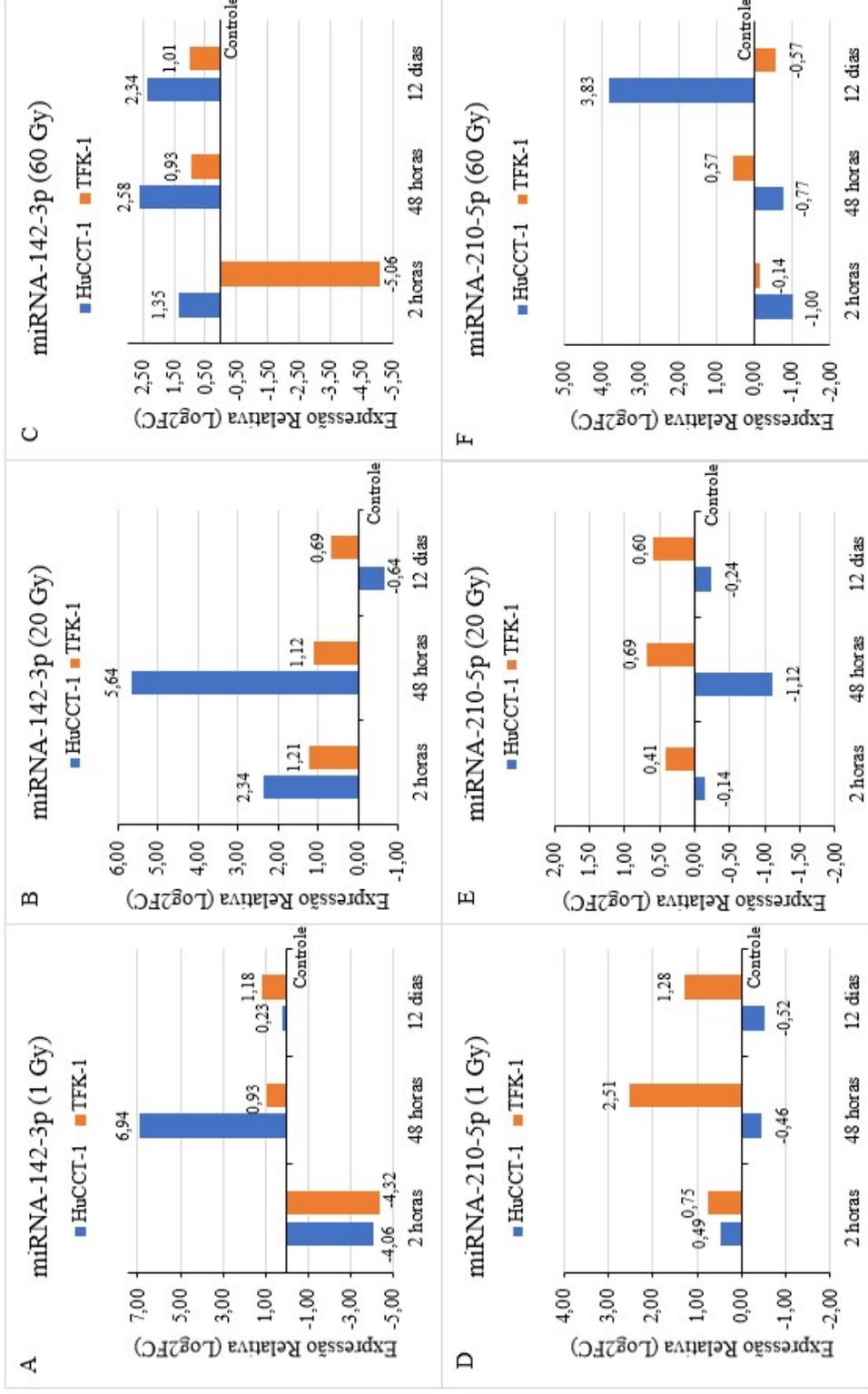


Figura 8. Expressão de miRNA-142-3p e miRNA-210-5p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas, 48 horas e 12 dias: A) miRNA-142-3p (1 Gy), B) miRNA-142-3p (20 Gy), C) miRNA-142-3p (60 Gy), D) miRNA-210-5p (1 Gy), E) miRNA-210-5p (20 Gy) e F) miRNA-210-5p (60 Gy), Log2FC = $\log_2 \text{fold change}$.

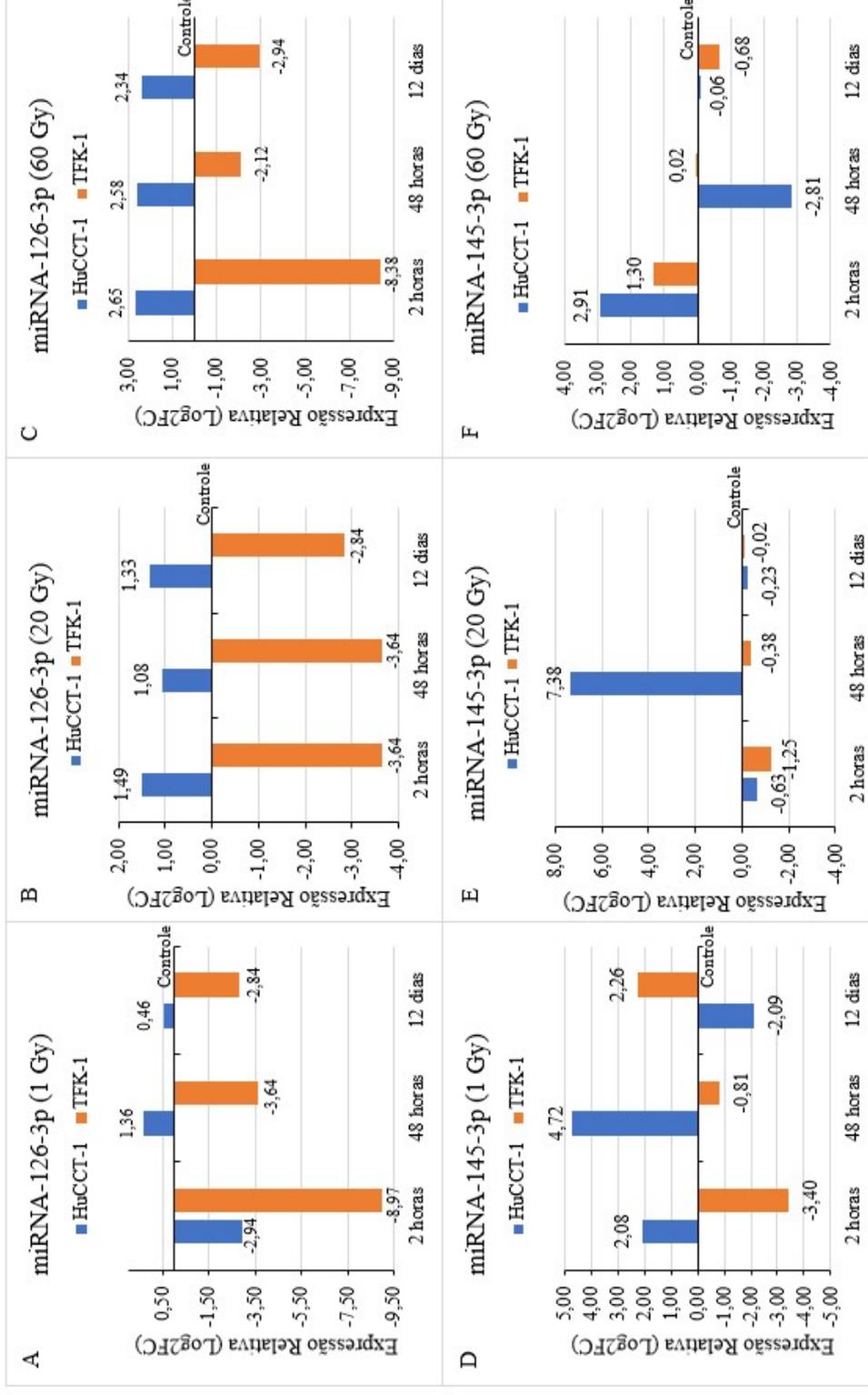


Figura 9. Expressão de miRNA-126-3p e miRNA-145-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HucCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) miRNA-126-3p (1 Gy), B) miRNA-126-3p (20 Gy), C) miRNA-126-3p (60 Gy), D) miRNA-145-3p (1 Gy), E) miRNA-145-3p (20 Gy) e F) miRNA-145-3p (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

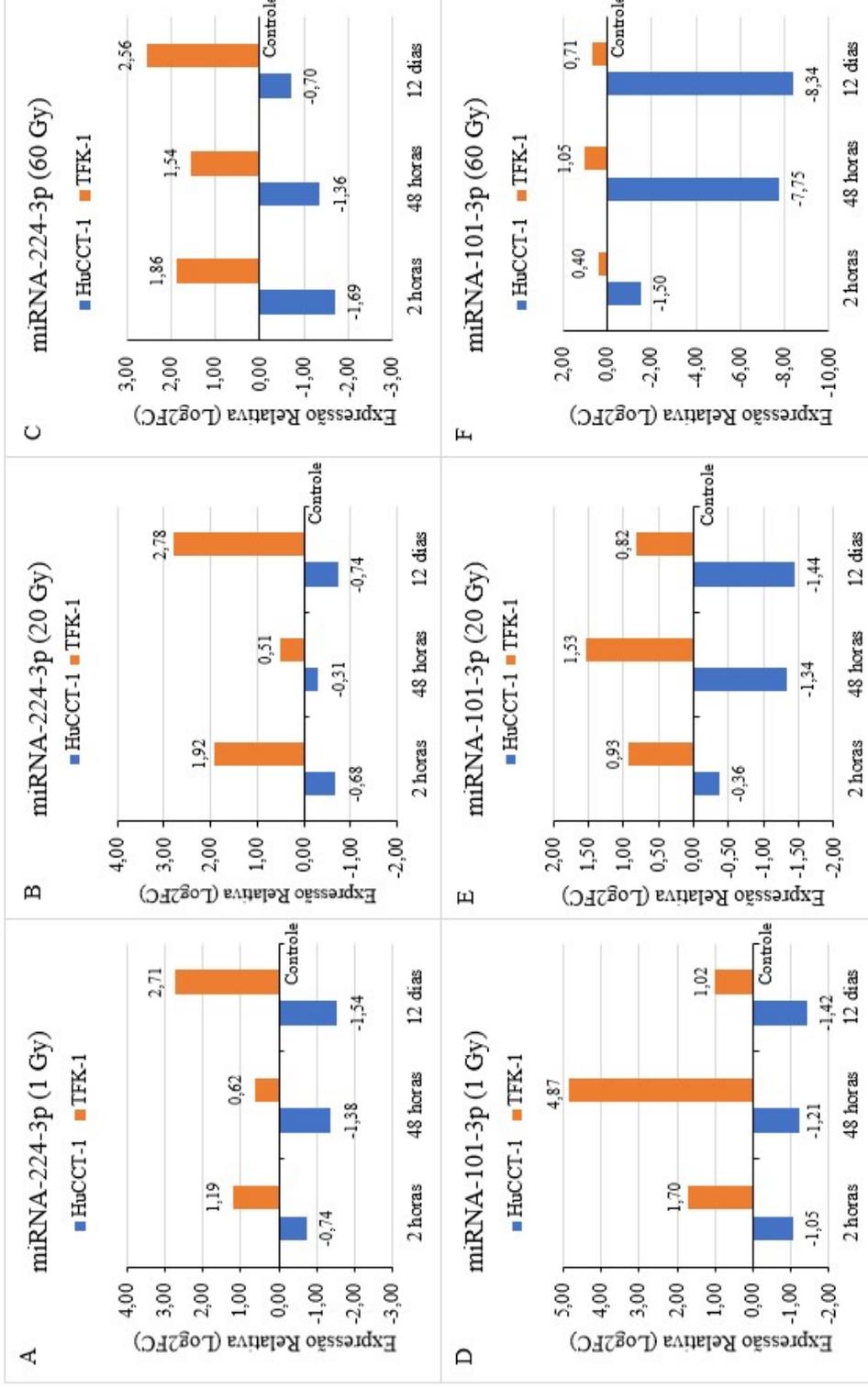


Figura 10. Expressão de miRNA-224-3p e miRNA-101-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HucCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) miRNA-224-3p (1 Gy), B) miRNA-224-3p (20 Gy), C) miRNA-224-3p (60 Gy), D) miRNA-101-3p (1 Gy), E) miRNA-101-3p (20 Gy) e F) miRNA-101-3p (60 Gy), Log₂FC = log₂ fold change.

3.4 Associação de Expressão Gênica de *VEGFA* e *HIF1A* com miRNAs, em Linhagens Celulares de CCA considerando a Exposição ao ¹³¹I

3.4.1 Expressão gênica e de miRNA-142-3p

Na linhagem HuCCT-1 predominou a superexpressão de miRNA-142-3p em todas as dosagens, destacando-se na dosagem 1Gy e 20 Gy, após 48 horas (6,94 e 5,64, respectivamente; Figura A-B). Por outro lado, observou-se subexpressão de miRNA-142-3p para 1Gy após 2 horas (-4,06) e 20Gy, após 12 dias (-0,64; Figura 11A-B). Entretanto, todos os valores de miRNA-142-3p mostraram associação com subexpressão de ambos os genes, exceto para *HIF1A* que mostrou superexpressão apenas na dosagem 60Gy após 12 dias (0,79; Figura 11C).

Em relação à linhagem TFK-1 observou-se também predomínio de superexpressão de miRNA-142-3p, em todas as dosagens, após 48 horas e 12 dias, e também 2 horas na dosagem 20Gy. Por outro lado, na dosagem 1Gy houve subexpressão de miRNA-142-3p após 2 horas (-4,32), associada a aumento de *VEGFA* (1,01) e *HIF1A* (0,71; Figura 11D). No entanto, após 48 horas e 12 dias, respectivamente, houve subexpressão de *HIF1A* (-2,67; -1,54) associada a superexpressão de miRNA (0,93; 1,18; Figura 11D). Na dosagem 20Gy observou-se superexpressão de miRNA-142-3p associada com subexpressão de *VEGFA* e *HIF1A*, respectivamente, após 48 horas (-0,92; -3,86) e 12 dias (-2,09; -3,70; Figura 11E). A dosagem 60Gy, após 48 horas e 12 dias mostrou associação entre aumento de expressão de ambos os genes e o miRNA-142-3p, entretanto, após 2 horas de exposição houve subexpressão de *VEGFA* (-1,32), *HIF1A* (-4,0) e de miRNA-142-3p (-5,06; Figura 11F).

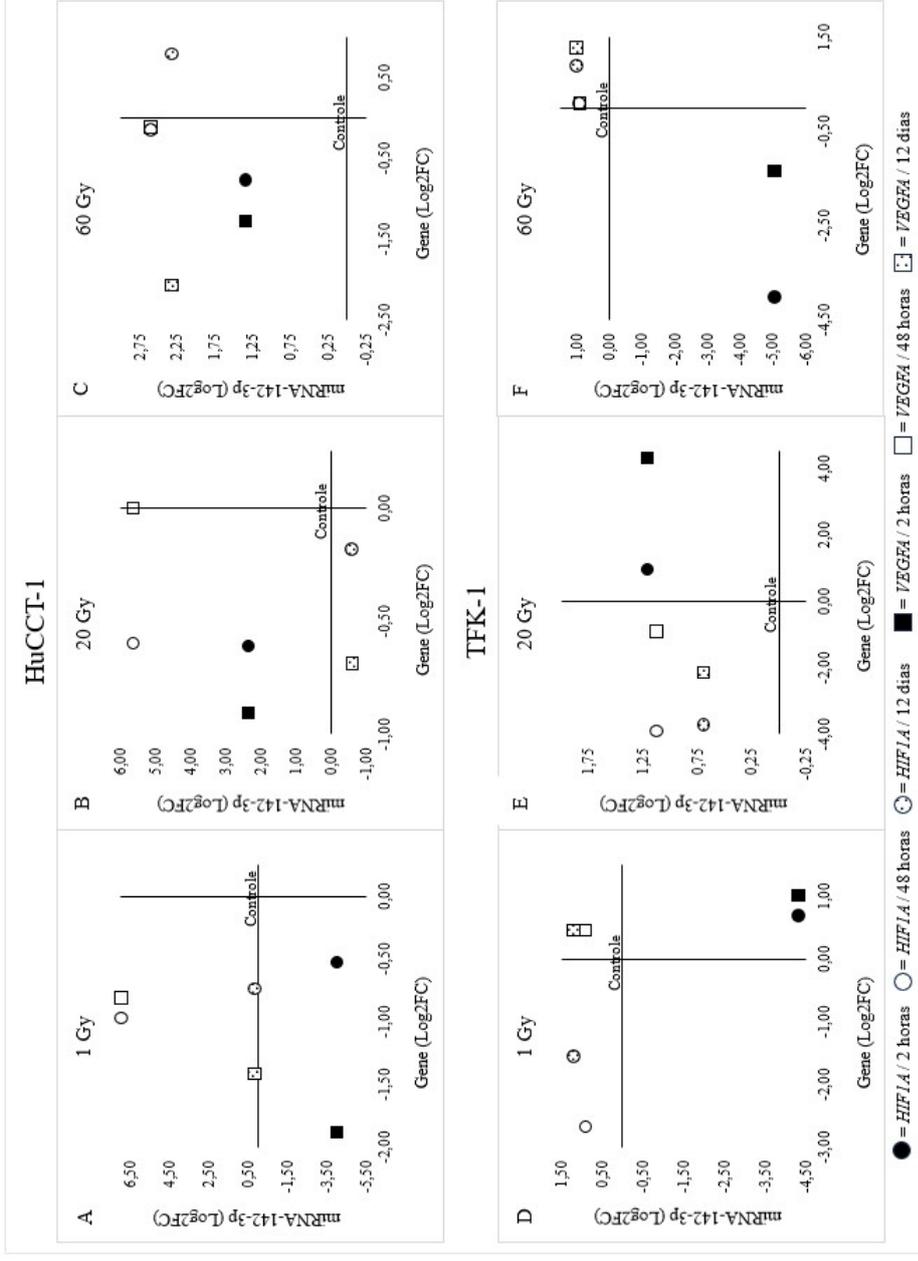


Figura 11. Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com miRNA-142-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) HuCCT-1 (1 Gy), B) HuCCT-1 (20 Gy), C) HuCCT-1 (60 Gy), D) TFK-1 (1 Gy), E) TFK-1 (20 Gy) e F) TFK-1 (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

3.4.2 Expressão gênica e de miRNA-210-5p

Verificou-se na linhagem HuCCT-1 subexpressão associada à *HIF1A* e *VEGFA* nas dosagens e tempos, com exceção para 1Gy, após 2 horas de exposição ao ^{131}I , em que houve a superexpressão do miRNA-210-5p (0,49) e subexpressão de *HIF1A* (-0,52) e *VEGFA* (-1,89; Figura 12A), e para 60Gy, após 12 dias de exposição, com a superexpressão do miRNA-210-5p (3,83) e *HIF1A* (0,79) e a subexpressão do *VEGFA* (-2,06; Figura 12C). Já para a linhagem TFK-1 predominou a superexpressão do miRNA-210-5p, exceto na dosagem 60Gy, após 2 horas de exposição ao ^{131}I , associado à subexpressão gênica (miRNA = -0,14; *HIF1A* = -4,00; *VEGFA* = -1,32), e após 12 dias associado a superexpressão gênica (miRNA = -0,57; *HIF1A* = 0,90; *VEGFA* = 1,29; Figura 12F). Para a dosagem de 1 Gy houve superexpressão de *VEGFA* em todos os períodos (2 horas = 1,01; 48 horas = 0,45; 12 dias = 0,46), incluindo *HIF1A*, após 2 horas (0,71; Figura 12D), e para 20Gy ocorreu superexpressão dos dois genes, após 2 horas (*HIF1A* = 0,91; *VEGFA* = 4,28), enquanto para os períodos seguintes houve subexpressão (48 horas: *HIF1A* = -3,82; *VEGFA* = -0,92; 12 dias: *HIF1A* = -3,70; *VEGFA* = -2,09; Figura 12E).

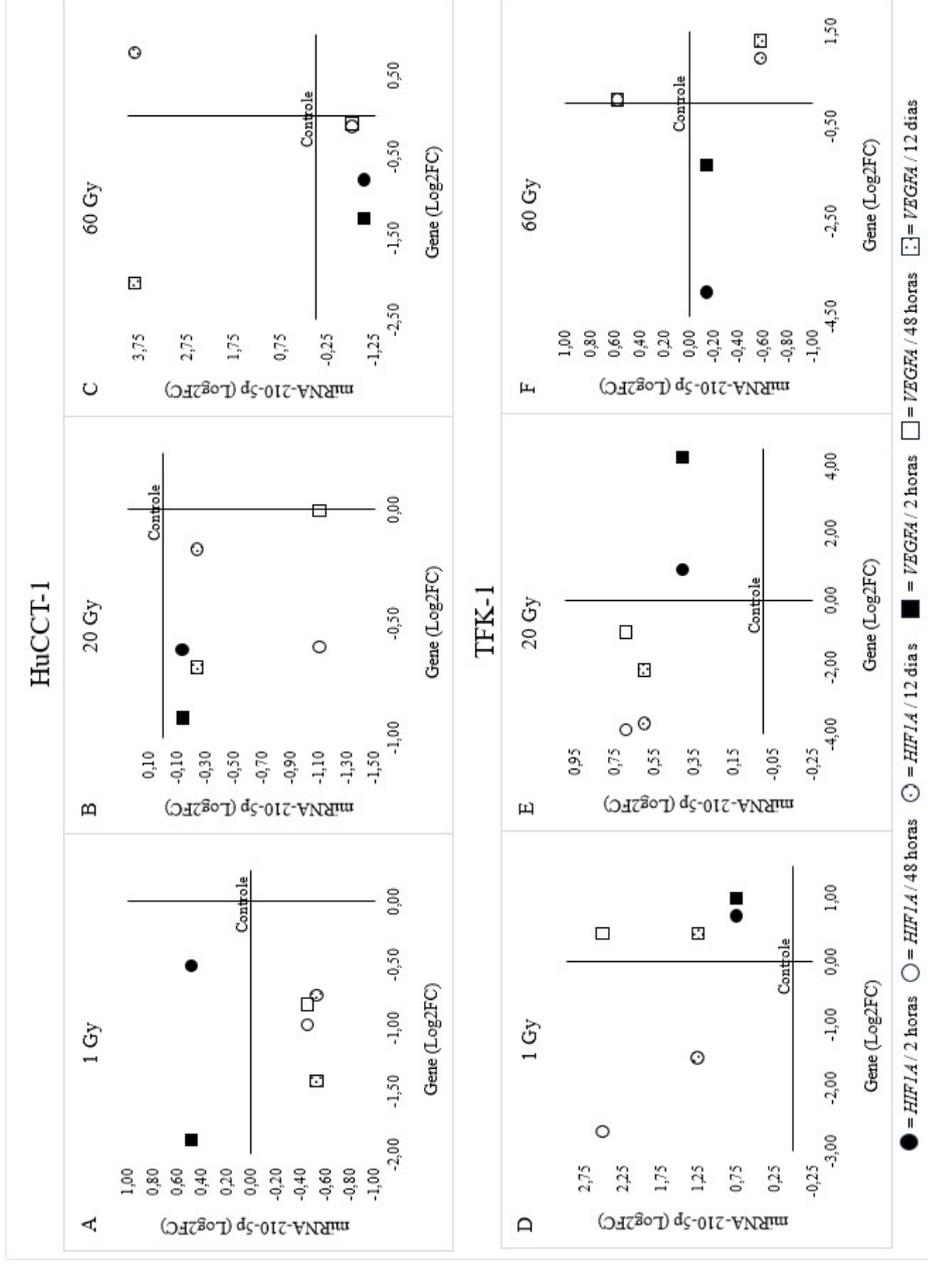


Figura 12. Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com miRNA-210-5p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) HuCCCT-1 (1 Gy), B) HuCCCT-1 (20 Gy), C) HuCCCT-1 (60 Gy), D) TFK-1 (1 Gy), E) TFK-1 (20 Gy) e F) TFK-1 (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

3.4.3 Expressão gênica e de miRNA-126-3p

Na linhagem HuCCT-1 (Figura 13A-C), miRNA-126-3p apresentou-se predominantemente superexpresso em todas as dosagens e tempos associado a subexpressão de ambos os genes, com exceção para a dosagem 1Gy, após 2 horas de exposição ao ^{131}I , em que o miRNA-126-3p mostrou-se subexpresso (-2,94), assim como, *HIF1A* (-0,52) e *VEGFA* (-1,89; Figura 13A). Destacou-se também a superexpressão de *HIF1A* na dosagem 60Gy após 12 dias (0,79; Figura 13C), em associação com superexpressão de miRNA-126-3p (2,34; Figura 13B-C). Por outro lado, na linhagem TFK-1 (Figura 13D-F) destacou-se a subexpressão de miRNA-126-3p, em todas as associações. Houve também subexpressão de *HIF1A* na dosagem 1Gy após 48 horas (-2,67) e 12 dias (-1,54; Figura 13D), e de *VEGFA* e *HIF1A* na dosagem 20Gy após, respectivamente, 48 horas (-0,92; -3,86) e 12 dias de exposição (-2,09; -3,70; Figura 13E), assim como, 60Gy após 2 horas (-1,32; -4,0; Figura 13F). Por outro lado, houve superexpressão de *VEGFA* na dosagem 1Gy, após 2 horas (1,01), 48 horas (0,45) e 12 dias (0,46), o mesmo ocorreu para *HIF1A*, após 2 horas (0,71; Figura 13D). Destacou-se também superexpressão de *VEGFA* e *HIF1A*, respectivamente, na dosagem 20Gy (4,28; 0,91; Figura 13E), após 2 horas de exposição, assim como, na dosagem 60Gy, após 48 horas (0,06; 0,08) e 12 dias (1,29; 0,90; Figura 13F).

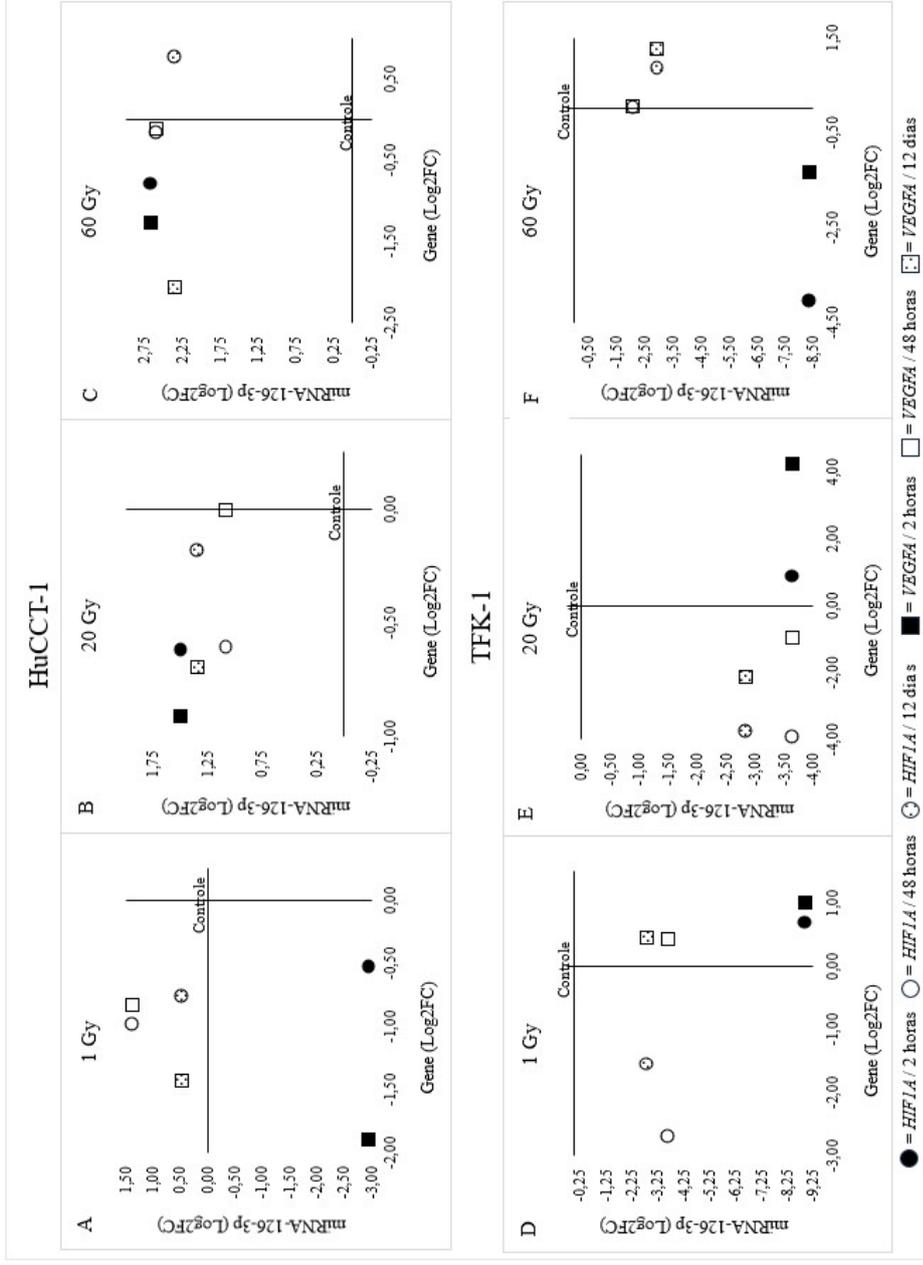


Figura 13. Associação de expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com miRNA-126-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) HuCCT-1 (1 Gy), B) HuCCT-1 (20 Gy), C) HuCCT-1 (60 Gy), D) TFK-1 (1 Gy), E) TFK-1 (20 Gy) e F) TFK-1 (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

3.4.4 Expressão gênica e de miRNA-145-3p

Evidenciou-se na linhagem HuCCT-1 (Figura 14A-C) superexpressão de miRNA-145-3p na dosagem 1Gy, após 2 horas (2,08) e 48 horas (4,72; Figura 14 A), assim como, 20Gy e 60Gy após, respectivamente, 48 horas (7,38) e 2 horas (2,91; Figura 14 B-C), valores associados com subexpressão de ambos os genes nas respectivas dosagens e períodos. Por outro lado, observou-se subexpressão de miRNA-145-3p na dosagem 1Gy (-2,09) após 12 dias, associada a subexpressão de *VEGFA* (-1,42) e *HIF1A* (-0,74; Figura 14A), assim como, 60Gy após 12 dias (-0,06), associada a subexpressão de *VEGFA* (-2,06) e superexpressão de *HIF1A* (0,79; Figura 14C).

Na linhagem TFK-1 (Figura 14D-F), para a dosagem de 1Gy e 20Gy, após 2 horas, respectivamente, a subexpressão de miRNA-145-3p (-3,40; -1,25) associou-se a superexpressão de *VEGFA* (1,01; 4,28) e *HIF1A* (0,71; 0,91; Figura 14D-E). No entanto, neste mesmo período, o inverso ocorreu para a dosagem 60Gy, com subexpressão de *VEGFA* (-1,32) e *HIF1A* (-4,0) e superexpressão de miRNA (1,30; Figura 14F). Para a dosagem de 1Gy, após 48 horas e 12 dias, respectivamente, observou-se também superexpressão de *VEGFA* (0,45; 0,46), mas subexpressão de *HIF1A* (-2,67; -1,54), valores associados, respectivamente, com subexpressão e aumento de miRNA-145-3p (-0,81; 2,26; Figura 14D). Subexpressão de *HIF1A* manteve-se na dosagem de 20Gy após 48 horas (-3,86) e 12 dias (-3,70), o mesmo ocorreu para *VEGFA* (-0,92; -2,09, respectivamente), esses valores associaram-se a subexpressão também de miRNA-145-3-p (-0,38; -0,02, respectivamente; Figura 14E). Por outro lado, na dosagem de 60Gy houve superexpressão de *VEGFA* e *HIF1A* após, respectivamente, 48 horas (0,06; 0,08) e 12 dias (1,29; 0,90) de exposição, valores associados a aumento (0,02) e subexpressão (-0,68) de miRNA-145-3p (Figura 14F).

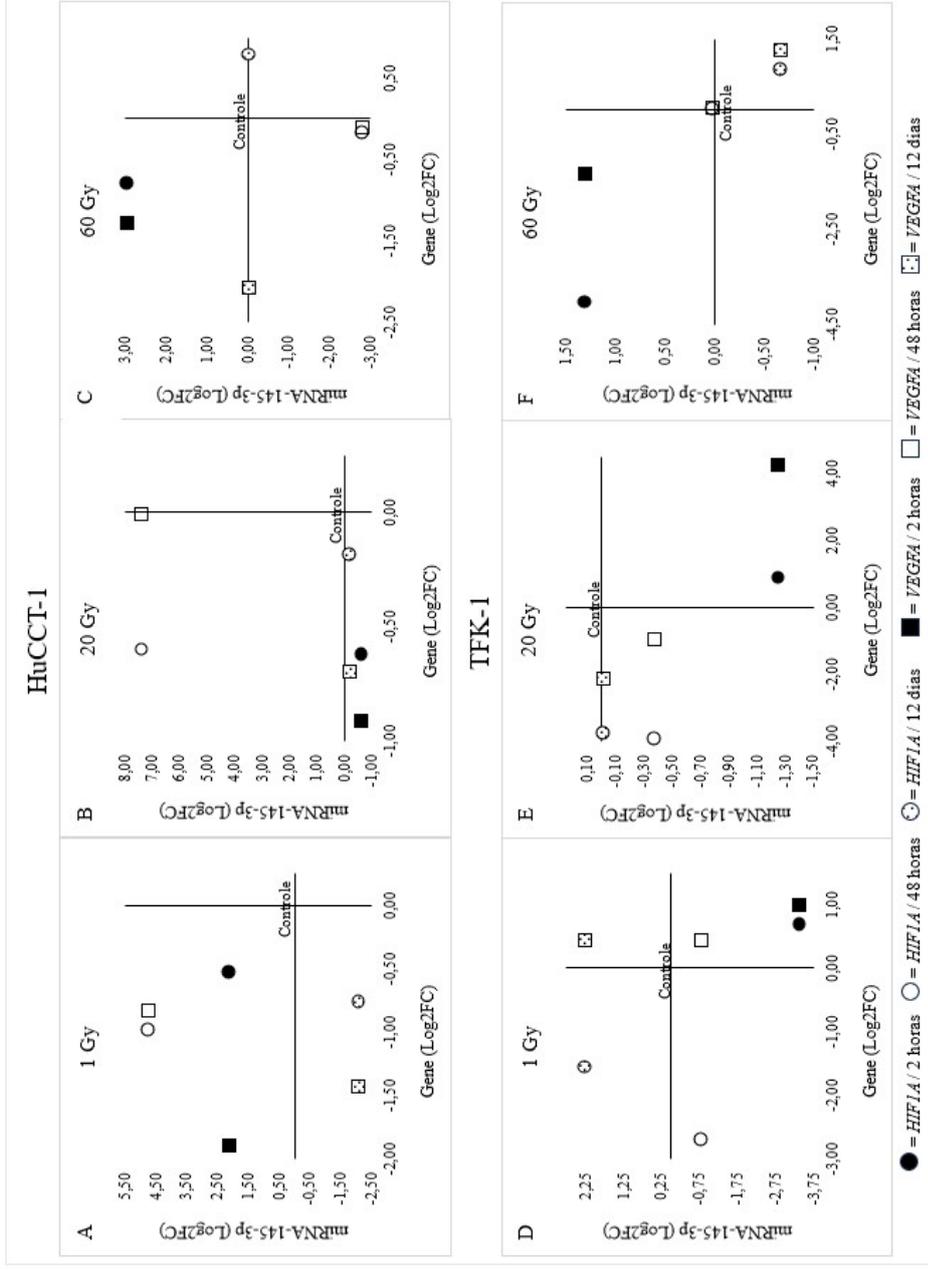


Figura 14. Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com miRNA-145-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) HuCCCT-1 (1 Gy), B) HuCCCT-1 (20 Gy), C) HuCCCT-1 (60 Gy), D) TFK-1 (1 Gy), E) TFK-1 (20 Gy) e E) TFK-1 (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

3.4.5 Expressão gênica e de miRNA-224-3p

Na linhagem HuCCT-1 para a dosagem 1Gy e 20Gy observou-se associação entre subexpressão de miRNA-224-3p e de *VEGFA* e *HIF1A*, em todos os tempos, principalmente, após 12 dias nas dosagens 1Gy (-1,54; -1,42; -0,74, respectivamente) e 20Gy (-0,74; -0,69; -0,17, respectivamente), e 2 horas para 60Gy (-1,69; -1,26; -0,77, respectivamente) (Figura 15A-B). A dosagem 60Gy também mostrou subexpressão para miRNA e *VEGFA*, em todos os periodos, mas superexpressão de *HIF1A* (0,79), após 12 dias de exposição ao ¹³¹I associado a subexpressão de miRNA-224-3p (-0,70; Figura 15C). Para a linhagem TFK-1 (Figura 15D-F), por outro lado, predominou superexpressão de miRNA-224-3-p, com valores mais elevados após 12 dias em todas as dosagens, associada com superexpressão de *VEGFA* na dosagem 1Gy em todos os periodos (1,01; 0,45; 0,46), 20Gy após 2 horas (4,28) e 60Gy após 48 horas (0,06) e 12 dias (1,29), cuja condição foi observada também para *HIF1A* (0,08; 0,90, respectivamente), assim como aumento da expressão também nas dosagens 1Gy e 20Gy após 2 horas (0,71; 0,91, respectivamente). Por outro lado, *HIF1A* mostrou-se subexpresso nas dosagens 1Gy e 20Gy, respectivamente, após 48 horas (-2,67; -3,86) e 12 dias de exposição (-1,54; -3,70), assim como, na dosagem 60Gy após 2 horas (-4,0).

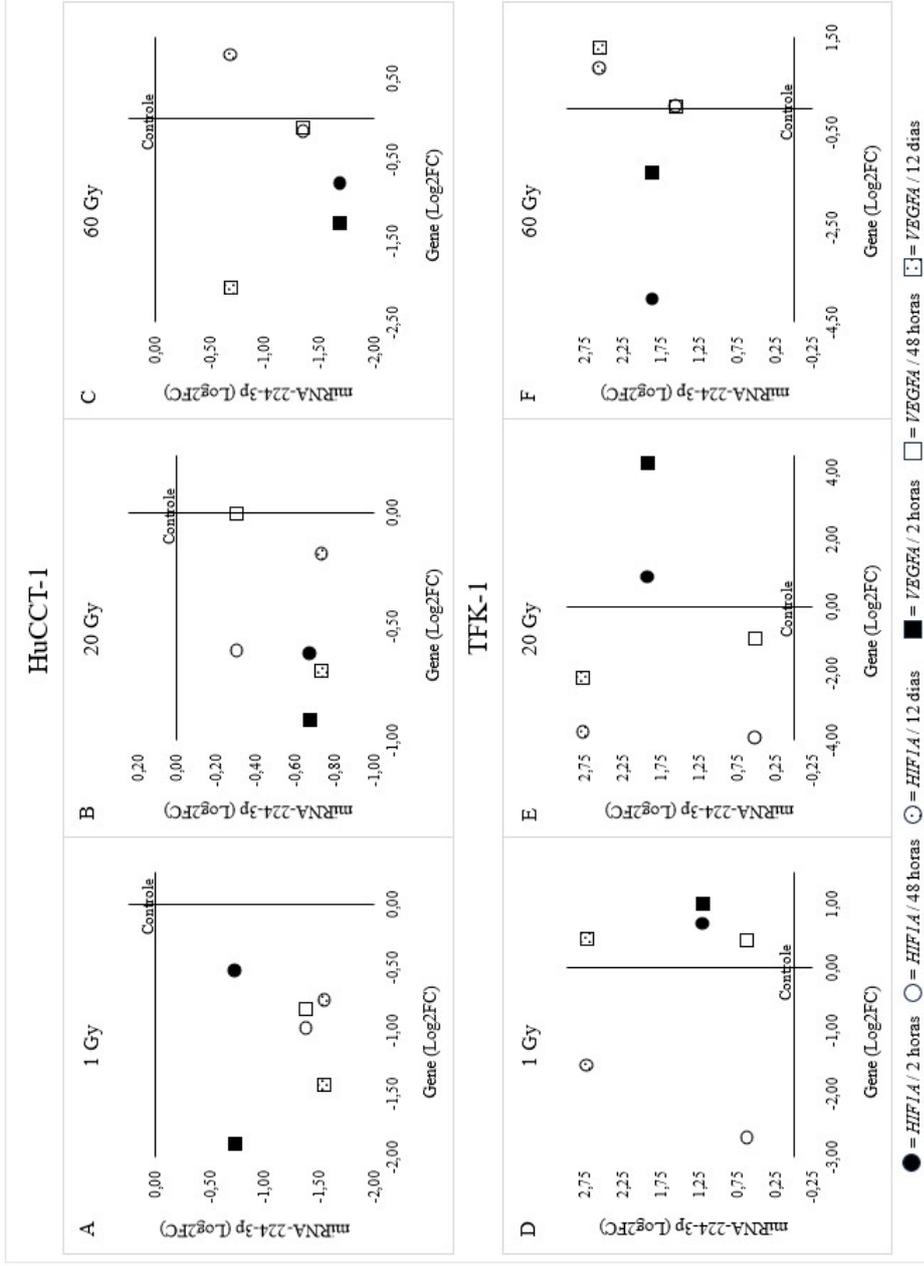


Figura 15. Associação de expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com miR-224-3p em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1Gy, 20Gy e 60Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) HuCCT-1 (1 Gy), B) HuCCT-1 (20 Gy), C) HuCCT-1 (60 Gy), D) TFK-1 (1 Gy), E) TFK-1 (20 Gy) e F) TFK-1 (60 Gy), Log2FC = log2 fold change.

3.4.6 Expressão gênica e de miRNA-101-3p

O padrão demonstrado em miRNA-224-3p na linhagem HuCCT-1 (Figura 16A-C) foi semelhante ao observado para miRNA-101-3p. Nesse caso, houve subexpressão de ambos os genes e de miRNA para todas as dosagens e tempo de exposição ao ^{131}I , exceto para *HIF1A*, com superexpressão após 12 dias na dosagem de 60Gy em associação à subexpressão do miRNA-101-3-p (0,79 e -8,34, respectivamente; Figura 16C). Para a linhagem TFK-1 (Figura 16D-F), como ocorreu para miRNA-224-3-p, predominou superexpressão de miRNA-101-3-p, mas com valores mais elevados após 48 horas em todas as dosagens, principalmente 1Gy (4,87), associada com superexpressão de *VEGFA* e *HIF1A* nas dosagens 1Gy e 20Gy, respectivamente, após 2 horas (1,01; 0,91) e 60Gy após 12 dias de exposição (1,29; 0,09), assim como também para *VEGFA* após 48 horas e 12 dias, respectivamente, na dosagem de 1Gy (0,45; 0,46) e 60Gy após 48 horas (0,06). Por outro lado, *HIF1A* mostrou-se subexpresso na dosagem 1Gy e 20Gy, respectivamente, após 48 horas (-2,67; -3,86) e 12 dias (-1,54; -3,70), o mesmo ocorreu para *VEGFA* na dosagem 20Gy após 48 horas (-0,92) e 12 dias (-2,09; Figura 16E).

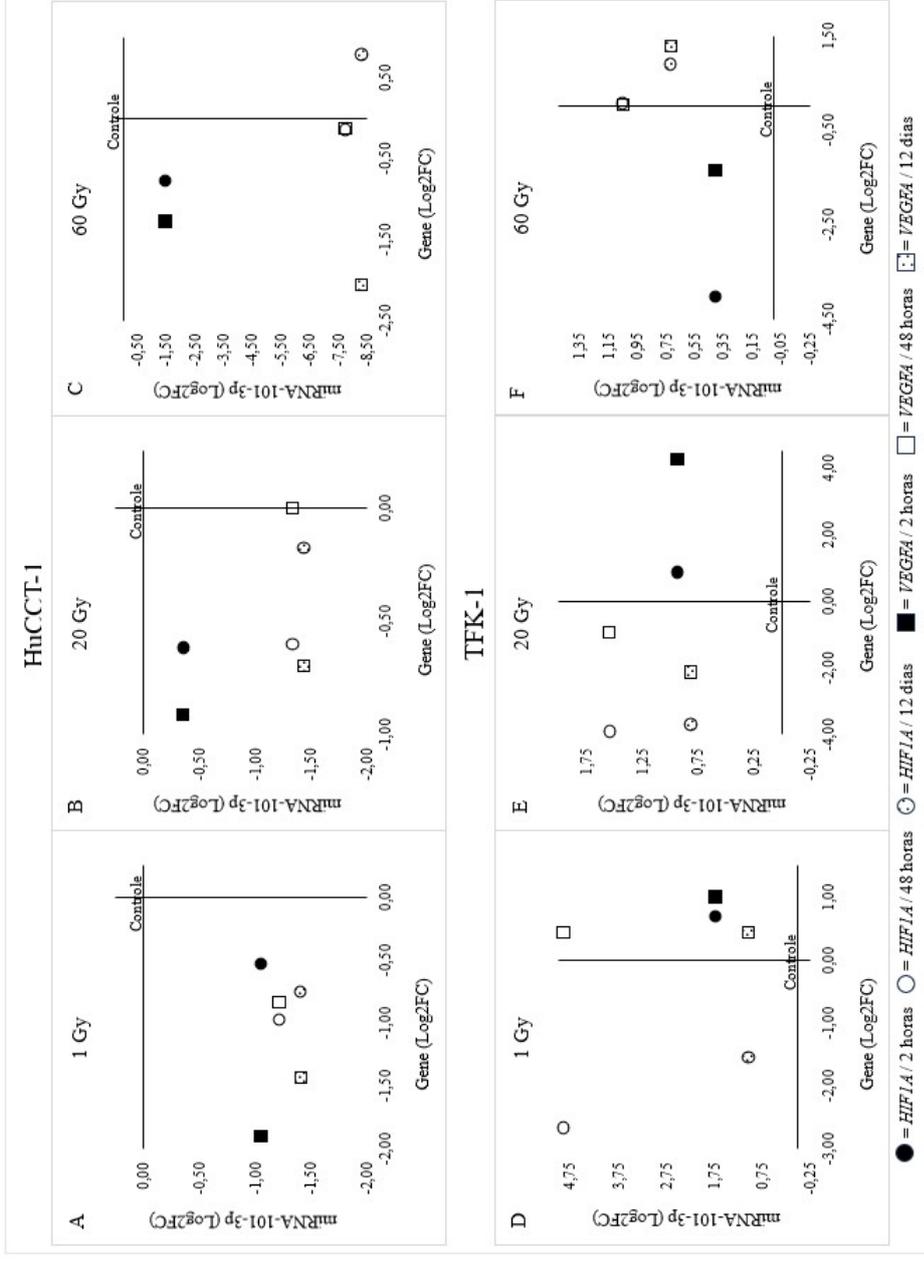


Figura 16. Associação de expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFA*) e fator induzido por hipóxia (*HIF1A*) com *miRNA-101-3p* em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra (HuCCT-1) e extra-hepático (TFK-1), considerando a exposição a doses de 1 Gy, 20 Gy e 60 Gy de iodo-131 por período de 2 horas 48 horas e 12 dias: A) HuCCT-1 (1 Gy), B) HuCCT-1 (20 Gy), C) HuCCT-1 (60 Gy), D) TFK-1 (1 Gy), E) TFK-1 (20 Gy) e F) TFK-1 (60 Gy), Log₂FC = log₂ fold change.

4. DISCUSSÃO

Em vista do aumento da incidência de CCA, da alta taxa de mortalidade,^(3,7) e das limitadas opções terapêuticas, devido ao diagnóstico tardio,⁽⁶⁾ tornam-se necessários esforços para o diagnóstico precoce e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Modelos pré-clínicos que consideram a localização específica do tumor destacam-se, pois aceleraram o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.^(50,51) Apesar dos avanços consideráveis no entendimento das bases moleculares relacionado à patogênese do CCA na última década, ainda há muito a ser elucidado.⁽⁵¹⁾

O tratamento com o ^{131}I destaca-se como alvo chave para nova abordagem terapêutica de CCA.⁽⁶⁾ No estudo conduzido por Brito et al. (2020) foi observada acentuada expressão de NIS em células de CCA, cuja exposição à radiação reduziu a viabilidade celular. Há evidências que vários miRNAs têm como alvo a região 3'UTR do NIS e regulam negativamente sua expressão, com base em análises *in silico* e evidências experimentais.⁽⁵²⁾

Nesse contexto, observamos que a radioterapia pode regular negativamente a expressão dos genes *HIF1A* e *VEGFA* na linhagem HuCCT-1, após tratamento com diferentes doses e tempos de irradiação em relação ao controle, com exceção à dose de 60Gy após 12 dias, mostrando valores aumentados de *HIF1A* nas linhagens HuCCT-1 e TFK-1. A escolha ideal da dosagem é imprescindível, tendo em vista, que doses inferiores a 0,8Gy promoveram o processo da angiogênese, facilitando a invasão e tumoral metástase.⁽⁵³⁾ A subexpressão desses genes observadas neste estudo demonstram importante achado, evidenciando o potencial de inibição da expressão gênica desta opção terapêutica, o que poderia levar a redução da massa tumoral e promover a regressão do tumor.⁽⁴¹⁾

Contudo, o aumento da expressão de *HIF1A* na dose de 60Gy, após 12 dias de exposição ao ^{131}I pode estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse caso, possibilitam a indução da atividade do *HIF1A* e, conseqüentemente, a expressão de fatores de crescimento angiogênicos, ressaltando a importância da terapêutica combinada para inibição da angiogênese com radiação.⁽⁵⁴⁾

A regulação positiva do *HIF1A* pode também estar associada ao diâmetro do tumor intra-hepático, bem como à infiltração de vasos e formação de metástases.^(55,56) Além disso, um estudo envolvendo o tratamento da hipóxia em células TFK-1 e HuCCT-1 mostrou elevação significativa da proteína HIF-1 α , após 6 horas com posterior redução em até 24 horas e retorno aos níveis basais em 48 horas. Esse fator se destaca, portanto, como importante regulador no processo de adaptação tumoral à hipóxia.⁽⁵⁷⁾ Adicionalmente, em estudo de metanálise, observou-se superexpressão de *VEGF* em CCA intra-hepático, indicando possível influência na invasão tumoral e metástase.⁽⁵⁸⁾

Por outro lado, neste estudo, a linhagem TFK-1 mostrou superexpressão de *HIF1A* e *VEGFA* nas dosagens 1Gy e 20Gy, após 2 horas de exposição, seguido de decréscimo, após 48 horas, mantendo apenas a superexpressão de *VEGFA* na dosagem 1Gy. Para 60Gy ficou evidente o aumento da expressão associado ao tempo de exposição a radioterapia. Ressalta-se a ação de HIF-1 α como fator importante para a transcrição de genes como o *VEGFA*.⁽⁵⁹⁾ Nesse contexto, um estudo mostrou a expressão de *VEGF* associada à metástase em pacientes com CCA intra-hepático.⁽⁶⁰⁾

Em relação à expressão de miRNAs, inúmeros estudos têm mostrado sua eficiência como biomarcadores prognósticos e diagnósticos para diversos tipos de câncer.⁽⁶¹⁾ Evidenciou-se neste estudo, a superexpressão do miRNA-142-3p para as duas linhagens de CCA em todas as doses, após 48 horas de tratamento. Além disso, na

linhagem TFK-1 ressaltar-se aumento expressivo do nível, que inicialmente reduzido mostrou-se aumentado após 48 horas nas doses 1Gy e 60Gy. Por outro lado, estudo de He et al. (2018) mostrou expressão desse miRNA significativamente inferior em células de CHC, comparado àquelas não tumorais, correlacionado com invasão vascular e tamanho do tumor.⁽²⁶⁾ No entanto, metanálise conduzida por Liu et al. (2021) ressaltar resultados conflitantes sobre o miRNA-142-3p, algumas vezes desempenhando um papel de onco-mir e outras como miRNA supressor tumoral, que se mostrou associado à proliferação tumoral, metástase, invasão e apoptose.⁽¹⁹⁾ Apesar de resultados conflitantes, é indiscutível a importância do papel desse gene para a progressão tumoral e como efetivo marcador prognóstico para pacientes com tumores sólidos.⁽¹⁹⁾

Ao avaliar a ação do miRNA-142-3p em associação aos genes, na linhagem HuCCT-1, notou-se que, independente de o miRNA estar sub ou superexpresso, houve subexpressão de *VEGFA* e *HIF1A*, com exceção de *HIF1A* para a dosagem 60Gy, após 12 dias. Na dosagem de 1Gy, o miRNA mostrou-se subexpresso após 2 horas, mas superexpresso após 48 horas, com redução expressiva após 12 dias, cuja redução foi observada também em 20Gy, indicando possível feedback de resposta ao dano celular. Estes resultados evidenciam um cenário crítico, com necessidade de ajustes considerando o tempo e dose ideal de radioterapia com ¹³¹I. Ressaltando-se que estudos apontam o papel inibidor deste miRNA na migração e crescimento tumoral, invasão celular e angiogênese.⁽²⁵⁾ A subexpressão acentuada de miRNA-142-3p também foi observada na linhagem TFK-1 nas dosagens 1Gy e 60Gy, após 2 horas. Embora em 60Gy *VEGFA* e *HIF1A* também estivessem subexpressos, associados à subexpressão do miRNA após 2 horas, mostraram aumento da expressão nos períodos seguintes, sugerindo uma resposta aguda de estresse celular. Por outro lado, a dosagem de 20Gy mostrou melhor cenário,

com redução da expressão de ambos os genes associados ao aumento de miRNA-142-3p, nos períodos de 48 horas e 12 dias, indicando possíveis mecanismos adaptativos. Neste caso, corrobora o estudo cuja expressão reprimida do miRNA-142-3p em CHC, viabilizou o crescimento celular, bem como, a redução da apoptose.⁽⁶²⁾

Para o miRNA-210-5p, em HuCCT-1, observou-se aumento exacerbado na dosagem de 60Gy após 12 dias de exposição ao ¹³¹I, o que sugere uma resposta adaptativa desse oncomiR ao tratamento. A linhagem TFK-1 mostrou aumento nas dosagens 1Gy e 20Gy em todos os períodos, porém, houve decréscimo na dosagem 60Gy, após 2 horas e 12 dias de exposição ao ¹³¹I, o que pode indicar perspectivas, tendo em vista o potencial terapêutico. Nesse contexto, ressalta-se os resultados observados na linhagem HuCCT-1, com predominância de subexpressão de miRNA-210-5p associada a valores reduzidos de expressão de *VEGFA* e *HIF1A* nas dosagens 1Gy, 20Gy e 60Gy. A propósito, é sugerido que miRNA-210-5p desempenha efeito pró-câncer, capaz de promover a invasão, migração e proliferação celular em CHC, porém, inibindo a apoptose.⁽²⁸⁾

Em estudo conduzido por Farhat et al. (2022), peixes submetidos à hipóxia mostraram aumento de transcrição do miRNA-210-5p em tecido hepático, após uma e quatro semanas de hipóxia, em comparação às condições de normóxia, destacando seu papel em relação à hipóxia.⁽⁶³⁾ A regulação positiva anormal de miRNA-210-3p e 5p sob hipóxia também foi evidenciada em CHC, bem como, a inibição da migração celular diante da inibição desses miRNAs.⁽²⁷⁾

Por outro lado, o efeito supressor tumoral é esperado para o miRNA-224-3p, pois mostra correlacionado com a redução da expressão de fator de necrose tumoral-alfa, quimiocina derivada de queratinócitos e proteína inflamatória de macrófagos-2, sugerindo o seu papel na regulação da produção de citocinas inflamatórias.^(64,65) Ressalta-

se a superexpressão deste miRNA em todas as condições analisadas na linhagem de TFK-1 em relação ao H69. Contudo, desempenhando um efeito oposto para a outra linhagem. Essa diversidade pode ser justificada pela heterogeneidade do CCA, sustentada por múltiplos fatores, incluindo alterações em vias inflamatórias, produção contínua de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo, aumento da renovação celular e inibição do reparo do DNA, bem como, o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e fatores ambientais. O recente foco na caracterização molecular tem sugerido opções para identificação de alvos terapêuticos exclusivos para os subtipos de CCA, resultando em abordagens personalizadas e eficazes para o tratamento.^(6,32,66)

Ao associar os genes com este miRNA, na linhagem HuCCT-1, evidenciou-se que independente da dosagem ambos estiveram subexpressos, com exceção para *HIF1A*, superexpresso após 12 dias na dosagem do 60Gy. Este comportamento é consistente em estudos que examinam a expressão de *HIF1A* sob condições de hipóxia, nos quais foi relatado aumento progressivo da expressão de *HIF1A* ao longo do tempo, enquanto a expressão do miRNA-224-3p exibiu expressão inversa, diminuindo em resposta à hipóxia prolongada nessa condição.⁽⁶⁷⁾ Por outro lado, na linhagem TFK-1, a superexpressão de *HIF1A* e miRNA-224-3p foi observada após 2 horas, mas com o passar do tempo e em doses de 1Gy e 20Gy, houve subexpressão de *HIF1A*, e do gene *VEGFA* enquanto o miRNA-224-3p permaneceu superexpresso. É notável a dosagem de 60Gy, com subexpressão do *HIF1A* associado à superexpressão do miRNA, após 2 horas de exposição ao ¹³¹I.

Em relação ao miRNA-101-3p, na linhagem HuCCT-1, houve subexpressão consistente em todos os tempos e dosagens, comparado ao H69, destacando a expressiva redução do miRNA em 60Gy, em comparação às demais. Diante disso, sugere-se uma

resposta relacionada a mecanismos de regulação negativa e danos celulares mais intensos e prolongados. Por outro lado, observou-se na outra linhagem aumento da expressão em relação ao H69, principalmente para doses após 48 horas, possivelmente indicando um mecanismo de regulação de sobrevivência ou reparo. O miRNA-101-3p mostrou-se envolvido na proliferação, diferenciação e apoptose de células tumorais, regulando negativamente como supressor tumoral em alguns tipos de câncer como o de fígado, pulmão, endométrio e glioma.^(17,18,68) Adicionalmente, o miRNA-101-3p pode inibir a proliferação e invasão de células de câncer gástrico e promove também a apoptose.⁽¹⁷⁾ De forma notável, Chang et al. (2014) sugeriram que o miRNA-101 inibe a autofagia e metástase em osteosarcoma promovendo assim, a eficácia quimioterápica.⁽⁶⁹⁾

Em relação à hipóxia, Calastri et al. (2022) não encontraram associação na expressão de *VEGFA* e do miRNA-101-3p em pacientes com CCA, bem como, diferenças entre CCA intra e extra-hepáticos.⁽³²⁾ Contudo, observamos associação de subexpressão de *VEGFA*, *HIF1A* e miRNA-101-3p, em todas as dosagens e tempos para a linhagem HuCCT-1, exceto para aumento de *HIF1A* na dosagem 60Gy, após 12 dias. Por outro lado, na linhagem TFK-1 houve superexpressão de *VEGFA* e miRNA-101-3p, na dosagem 1Gy o que contrasta com a subexpressão observada na linhagem HuCCT-1. A propósito, estudo em células do endotélio de veia umbilical humana indicou que este miRNA pode estimular a angiogênese intensificando a produção do *VEGFA*.⁽⁷⁰⁾

Já o miRNA-126-3p foi identificado como um fator biológico supressor para o desenvolvimento de certas malignidades como CCA, câncer de pulmão e de ovário, associado à angiogênese, proliferação e invasão celular e metástase.^(21,35,71,72) Liu et al. (2024) observaram a regulação negativa significativa no CCA em comparação a tecidos normais, utilizando métodos de predição de alvos.⁽⁷³⁾ Como evidenciado, neste estudo, a

linhagem TFK-1 mostrou valores reduzidos de miRNA-126-3p em todas as dosagens e tempos, diferentemente da linhagem HuCCT-1, cujos valores se mantiveram relativamente mais elevados.

Quanto à associação do miRNA-126-3p com a hipóxia, um estudo observou menor expressão em tecidos de CCA, em comparação à condição saudável, sugerindo regulação positiva do *VEGFA* diante da subexpressão do miRNA-126-3p.⁽³⁵⁾ De fato, neste estudo observou-se aumento de miRNA-126-3p associado à redução de *VEGFA* e *HIF1A*, assim como a condição inversa, o que pode ter sido potencializado pela radioterapia com ¹³¹I, em ambas as linhagens. Gondaliya et al. (2024) destacam a importância de explorar o potencial terapêutico de miRNAs, uma vez que a restauração do miRNA-126-3p em células tumorais pode aumentar a lise celular mediada por células NK e, conseqüentemente, inibir a neo-angiogênese e a disseminação do tumor.⁽³⁶⁾

O efeito de supressor tumoral é citado também para o miRNA-145-3p, atuando como um silenciador alvo para vários genes específicos.⁽⁷⁴⁾ Este miRNA apresentou aumento de expressão considerável principalmente na linhagem HuCCT-1 nas dosagens de 1Gy e 20Gy, após 48 horas de exposição. É possível que ocorra uma resposta inicial de adaptação, em que doses menores ativam mecanismos compensatórios sem induzir efeitos citotóxicos imediatos. Esse miRNA pode participar da regulação do processo de invasão celular, metástase, proliferação, diferenciação e apoptose. Foi observado que a isoforma miRNA-145-5p pode regular a apoptose de células de osteossarcoma, sendo assim um potencial alvo terapêutico para interferir nos processos biológicos da doença. No entanto, a regulação da apoptose e da autofagia necessita esclarecimento.⁽⁷⁵⁾

Ainda, Calastri et al. (2022), notaram expressão reduzida desse miRNA e superexpressão do *VEGFA* em pacientes com CCA, em relação ao grupo sem a doença,

no entanto, sem associação significativa.⁽³²⁾ Expressões opostas do miRNA-145-3p e *VEGFA* também foram evidenciadas neste estudo, principalmente, após 2 horas de exposição ao ¹³¹I, exceto pela dosagem de 20Gy na linhagem HuCCT-1. Ainda, notou-se expressões semelhantes com a progressão do tempo, principalmente após 12 dias de exposição, com exceção da dosagem 60Gy. Há referência de regulação negativa do miRNA-145-3p também em carcinoma espinocelular, sugerindo sua relevância em diferentes contextos tumorais.⁽⁷⁶⁾

Este estudo apresenta algumas limitações, incluindo o delineamento experimental descritivo impossibilitando a análise estatística dos dados e a indicação de doses e tempos ideais no tratamento de CCA com radioterapia metabólica utilizando ¹³¹I. Entretanto, para nortear estudos futuros o compilado das melhores condições para modulação de marcadores envolvidos na angiogênese é apresentada em forma de quadro (APÊNDICE I). Porém, a qualidade foi mantida, permitindo avaliar o efeito da radiação em caráter de estudo piloto, a ser ampliado com réplicas experimentais, além de controlar a condição de hipóxia para esclarecer o efeito dessa radioterapia metabólica no perfil molecular do CCA.

De fato, o câncer é uma doença multifatorial com influências tanto genéticas como ambientais, que contribuem para a heterogeneidade e, conseqüentemente, divergências, dificultando análises comparativas diretas e concretas. Ainda, interações entre vias de sinalização e fatores epigenéticos contribuem para disparidade, tornando-se necessário explorar e identificar vias moleculares envolvidas na patogênese do CCA. Compreender essas interações é essencial para promover melhor prognóstico, desenvolvimento de tratamentos personalizados e otimizar sua eficácia.^(32,77) Embora a utilização de moléculas teranósticas seja promissor, torna-se um desafio. É necessário avaliar diversos fatores

como o acúmulo da molécula no tumor e em tecidos normais, a meia-vida diagnóstica e terapêutica ideal e a morte celular direcionada. Nesse contexto, ressalta-se a necessidade de identificar possíveis efeitos induzidos pelo ^{131}I no CCA, sob influência de todas essas variáveis, e o potencial diagnóstico e terapêutico de miRNAs.^(6,54,73,78)

Em conclusão, a terapia com o ^{131}I pode modular de forma negativa a atividade de genes importantes para o câncer, principalmente de *VEGFA* na linhagem HuCCT-1, relevante para a formação de novos vasos sanguíneos. Pode também, aumentar a atividade do miRNA-142-3p, nesta mesma linhagem, cuja ação poderia influenciar negativamente a tumorigênese. Por outro lado, essa radioterapia metabólica mostrou regulação antagônica de expressão dos miRNAs 101-3p, 126-3p, 224-3p e 210-3p entre as linhagens celulares, bem como, comportamento variável na expressão dos genes quando associados aos miRNAs, em decorrência da dosagem e do tempo de exposição. Esses achados evidenciam que a modalidade terapêutica utilizando o ^{131}I pode afetar de forma diferente genes e miRNAs, o que contribui para demonstrar a heterogeneidade de respostas envolvendo mecanismos, e a possibilidade de um tratamento direcionado e personalizado.

5. CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

1. A modulação negativa do gene *HIF1A*, importante para a manutenção da homeostase do oxigênio, em linhagens celulares de CCA intra e extra-hepático submetidas à Radioterapia metabólica com ^{131}I , assim como, de *VEGFA* regulador na formação de vasos sanguíneos e permeabilidade celular, pode se mostrar promissora para prevenção de respostas adaptativas como a angiogênese, destacando a relevância dessa modalidade terapêutica para controlar a progressão do CCA.

2. A Radioterapia com ^{131}I modula positivamente a expressão dos miRNAs supressores tumorais 126-3p, 142-3p e 145-3p, principalmente na linhagem celular de CCA intra-hepático, enquanto os miRNAs 101-3p e 224-3p destacam-se na linhagem extra-hepática, por outro lado, reduz a expressão do oncomiR 210-5p, notada especialmente na linhagem intra-hepática, confirmando sua influência na expressão de miRNAs envolvidos em processos de tumorigênese.

3. A associação entre a expressão de *VEGFA* e *HIF1A* e miRNAs nas linhagens celulares HuCCA-1 e TFK-1 varia de acordo com as dosagens e tempo de exposição à terapia metabólica com ^{131}I , destacando-se em HuCCT-1 redução da expressão de ambos os genes, e associada ao aumento da expressão dos miRNAs supressores tumorais 126-3p, 142-3 e 145-3p e, por outro lado, com a redução dos miRNAs 101-3p e 224-3p, e do oncomiR 210-5p. Para a linhagem de CCA extra-hepático ressalta-se a superexpressão dos miRNAs 101-3p, 142-3p e 145-3p, assim como do oncomiR 210-5p, mas redução de miRNA-126-3p, associada com subexpressão de ambos os genes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17:557–88. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0310-z>.
2. Brindley PJ, Bachini M, Ilyas SI, Khan SA, Loukas A, Sirica AE, et al. Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:65. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00300-2>.
3. Turati F, Bertuccio P, Negri E, Vecchia CL. Epidemiology of cholangiocarcinoma. *Hepatoma Res*. 2022;8:19. <https://dx.doi.org/10.20517/2394-5079.2021.130>.
4. Qurashi M, Vithayathil M, Khan SA. Epidemiology of cholangiocarcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2023;107064. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2023.107064>.
5. Elvevi A, Laffusa A, Scaravaglio M, Rossi RE, Longarini R, Stagno AM. Clinical treatment of cholangiocarcinoma: an updated comprehensive Review. *Ann of Hepatol*. 2022;27:100737. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100737>.
6. Brito AF, Abrantes AM, Teixo R, Pires AS, Ribeiro AC, Ferreira RF, et al. Iodine-131 metabolic radiotherapy leads to cell death and genomic alterations through NIS overexpression on cholangiocarcinoma. *Int J Oncol*. 2020;56(3):709-27. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.4957>
7. Baj J, Brylinski L, Wolinski F, Granat M, Kostelecka K, Duda P, et al. Biomarkers and genetic markers of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma—what do we already know. *Cancers (Basel)*. 2022;14:1493. <https://doi.org/10.3390/cancers14061493>.
8. Fan Z, Zou X, Wang G, Liu Y, Jiang Y, Wang H, et al. A transcriptome based molecular

- classification scheme for cholangiocarcinoma and subtype-derived prognostic biomarker. *Nat Commun.* 2024;15(1):484. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44748-8>
9. Ricci AD, Rizzo A, Schirizzi A, D'Alessandro R, Frega G, Brandi G, et al. Tumor Immune Microenvironment in Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Regulatory Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel).* 2024;16(20):3542. <https://doi.org/10.3390/cancers16203542>
10. Chang YJ, Chang YJ, Chen LJ. Prognostic factors in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep.* 2024;14(1):19084. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70124-z>
11. Olthof PB, Erdmann JI, Alikhanov R, Charco R, Guglielmi A, Hagendoorn J, et al. Higher Postoperative Mortality and Inferior Survival After Right-Sided Liver Resection for Perihilar Cholangiocarcinoma: Left-Sided Resection is Preferred When Possible. *Ann Surg Oncol.* 2024;31(7):4405-12. <https://doi.org/10.1245/s10434-024-15115-0>
12. Sarcognato S, Sacchi D, Fassan M, Fabris L, Cadamuro M, Zanusi G, et al. Cholangiocarcinoma. *Pathologica.* 2021;113(3):158-69. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-252>
13. Moriondo G, Scioscia G, Soccio P, Tondo P, De Pace CC, Sabato R, et al. Effect of hypoxia-Induced micro-RNAs expression on oncogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:6294. <https://doi.org/10.3390/ijms23116294>.
14. Diener C, Keller A, Meese E. The miRNA-target interactions: an underestimated intricacy. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(4):1544-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1142>.
15. Suszynska M, Machowska M, Fraszczyk E, Michalczyk M, Philips A, Galka-Marciniak P, et al. CMC: Cancer miRNA Census - a list of cancer-related miRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(4):1628-44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae017>.

16. Otmani K, Rouas R, Berehab M, Lewalle P. The regulatory mechanisms of oncomiRs in cancer. *Biomed Pharmacother.* 2024;171:116165. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116165>.
17. Wu F, Huang W, Yang L, Xu F. MicroRNA-101-3p regulates gastric cancer cell proliferation, invasion and apoptosis by targeting PIM 1 expression. *Cell Mol Biol.* 2019;65(7):118-22. <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2019.65.7.20>.
18. Deng R, Zhang J and Chen J. lncRNA SNHG1 negatively regulates miRNA-101-3p to enhance the expression of ROCK1 and promote cell proliferation, migration and invasion in osteosarcoma. *Int J Mol Med.* 2019;43(3):1157-66. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4039>.
19. Liu R, Zheng S, Yu K, Yu Y, Yu C, Shi W, et al. Prognostic value of miR-142 in solid tumors: a meta-analysis. *Biosc Rep.* 2021;41:BSR20204043. <https://doi.org/10.1042/BSR20204043>.
20. Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M and Song SJ. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1723. Published 2020 Mar 3. <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>.
21. Chen SW, Lu HP, Chen G, Yang J, Huang WY, Wang XM, et al. Downregulation of miRNA-126-3p is associated with the progression of and poor prognosis for lung squamous cell carcinoma. *FEBS Open Bio.* 2020;10(8):1624-41. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12920>.
22. Roy S, Glaser S and Chakraborty S. Inflammation and progression of cholangiocarcinoma: role of angiogenic and lymphangiogenic mechanisms. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:293. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00293>.

23. Zhuang Y, Liu K, He Q, Gu X, Jiang C and Wu J. Hypoxia signaling in cancer: Implications for therapeutic interventions. *MedComm* (2020). 2023;4(1):e203. <https://doi.org/10.1002/mco2.203>.
24. Chen Z, Li H, Li Z, Chen S, Huang X, Zheng Z, et al. SHH/GLI2-TGF- β 1 feedback loop between cancer cells and tumor-associated macrophages maintains epithelial-mesenchymal transition and endoplasmic reticulum homeostasis in cholangiocarcinoma. *Pharmacol Res.* 2023;187:106564. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106564>.
25. Xu T, He BS, Pan B, Pan YQ, Sun HL, Liu XX, et al. MiR-142-3p functions as a tumor suppressor by targeting RAC1/PAK1 pathway in breast cancer. *J Cell Physiol.* 2020; 235(5):4928-40. <https://doi.org/10.1002/jcp.29372>.
26. He C, Liu Z, Jin L, Zhang F, Peng X, Xiao Y, et al. lncRNA TUG1-mediated miR-142-3p downregulation contributes to metastasis and the epithelial-to-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting ZEB1. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(5):1928-41. <https://doi.org/10.1159/000492517>.
27. Li X, Wu H, Wu M, Feng Y, Wu S, Shen X, et al. Hypoxia-related miR-210-5p and miR-210-3p regulate hypoxia-induced migration and epithelial-mesenchymal transition in hepatoma cells. *Int J Clin Exp Med.* 2019;12(5):5096-104.
28. Bi S, Zhang Y, Zhou J, Yao Y, Wang J, Fang M, et al. MiR-210 promotes hepatocellular carcinoma progression by modulating macrophage autophagy through PI3K/AKT/mTOR signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023;662:47-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.04.055>.
29. Xie Y, Wang Y, Li J, Hang Y, Jaramillo L, Wehrkamp CJ, et al. Cholangiocarcinoma therapy with nanoparticles that combine downregulation of microRNA-210 with

- inhibition of cancer cell invasiveness. *Theranostics*. 2018;8(16):4305-20. <https://doi.org/10.7150/thno.26506>.
30. Zhao Y, Xing C, Deng Y, Ye C, Peng H. HIF-1 α signaling: essential roles in tumorigenesis and implications in targeted therapies. *Genes Dis*. 2023;11(1):234-51. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.039>.
31. Wang J, Chen Y, Wang Q, Xu H, Jiang Q, Wang M, et al. LncRNA SPRY4-IT1 facilitates cell proliferation and angiogenesis of glioma via the miR-101-3p/EZH2/VEGFA signaling axis. *Cancer Med*. 2023;12(6):7309-26. <https://doi.org/10.1002/cam4.5517>.
32. Calastri MCJ, Ferreira RF, Tenani GD, Spinola LP, Vieira GF, Rabaça Roque Botelho MF, et al. Investigating VEGF, miR-145-3p, and miR-101-3p Expression in Patients with Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23(7):2233-41. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.7.2233.
33. Liu N, Yang C, Gao A, Sun M, Lv D. MiR-101: an important regulator of gene expression and tumor ecosystem. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5861. <https://doi.org/10.3390/cancers14235861>.
34. Cui G, Wang H, Liu W, Xing J, Song W, Zeng Z, et al. Glycogen phosphorylase B is regulated by miR101-3p and promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:566494. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.566494>.
35. Poleto Spinola L, F Vieira G, Fernandes Ferreira R, Calastri MCJ, D Tenani G, Aguiar FL, et al. Underexpression of miR-126-3p in patients with cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(2):573-9. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.2.573.

36. Gondaliya P, Driscoll J, Yan IK, Ali Sayyed A, Patel T. Therapeutic restoration of miR-126-3p as a multi-targeted strategy to modulate the liver tumor microenvironment. *Hepatol Commun.* 2024;8(3):e0373. doi: 10.1097/HC9.0000000000000373.
37. Garrido MP, Torres I, Avila A, Chnaiderman J, Valenzuela-Valderrama M, Aramburo J, et al. NGF/TRKA decrease miR-145-5p levels in epithelial ovarian cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7657. <https://doi.org/10.3390/ijms21207657>.
38. Hu C, Liu T, Zhang W, Sun Y, Jiang D, Zhang X, et al. miR-145 inhibits aerobic glycolysis and cell proliferation of cervical cancer by acting on MYC. *The FASEB Journal.* 2023; 37:e22839. <https://doi.org/10.1096/fj.202201189RR>.
39. Konoshenko MY, Bryzgunova OE, Laktionov PP. MiRNAs and radiotherapy response in prostate cancer. *Andrology.* 2021;9(2):529-45. <https://doi.org/10.1111/andr.12921>.
40. Ciarallo A and Rivera J. Radioactive iodine therapy in differentiated thyroid cancer: 2020 Update. *AJR Am J Roentgenol.* 2020;215(2):285-91. <https://doi.org/10.2214/AJR.19.2262>.
41. Pathak A, Pal AK, Roy S, Nandave M and Jain K. Role of Angiogenesis and its biomarkers in development of targeted tumor therapies. *Stem Cells Int.* 2024;2024:9077926. <https://doi.org/10.1155/2024/9077926>.
42. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, Sun LP and Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Sig Transduct Target Ther.* 2023;8:198. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>.
43. Sadri N and Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers (Basel).* 2013;5(2):320-33. <https://doi.org/10.3390/cancers5020320>.

44. Akkoub ZZ and Khabour O. Association between P582S HIF-1A gene polymorphism and hematological parameters among women: A cross-sectional study. *Electron J Gen Med.* 2023;20(5):em508. <https://doi.org/10.29333/ejgm/13288>.
45. Nemashkalova EL, Shevelyova MP, Machulin AV, Lykoshin DD, Esipov RS, Deryusheva EI. Heparin-Induced changes of vascular endothelial growth factor (VEGF165) structure. *Biomolecules.* 2023;13(1):98. <https://doi.org/10.3390/biom13010098>.
46. Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.
47. Shaw P, Dwivedi SKD, Bhattacharya R, Mukherjee P and Rao G. VEGF signaling: Role in angiogenesis and beyond. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2024;1879(2):189079. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189079>.
48. Hohenester S, Wenniger LM, Paulusma CC, van Vliet SJ, Jefferson DM, Elferink RP, et al. A biliary HCO₃⁻ umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology.* 2012;55(1):173-83. <https://doi.org/10.1002/hep.24691>.
49. GOMES
50. Junking M, Rattanaburee T, Panya A, Budunova I, Haegeman G and Yenchitsomanus PT. Anti-proliferative effects of compound A and its effect in combination with cisplatin in cholangiocarcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(9):2673-81. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.9.2673.
51. Calvisi DF, Boulter L, Vaquero J, Saborowski A, Fabris L, Rodrigues PM, et al. Criteria for preclinical models of cholangiocarcinoma: scientific and medical

relevance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20:462–80.
<https://doi.org/10.1038/s41575-022-00739-y>.

52. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P and De la Vieja A. The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues. *Endocr Relat Cancer.* 2021;28(10):T141-T165. <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0217>.

53. Vala IS, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, et al. Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One.* 2010;5(6):e11222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011222>.

54. Magnon C, Opolon P, Ricard M, Connault E, Ardouin P, Galaup A, et al. Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1 α -mediated tumor apoptotic switch. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1844-55. <https://doi.org/10.1172/JCI30269>.

55. Lai HC, Lee MS, Lin KT, Chan SM, Chen JY, Lin YT, et al. Propofol-based total intravenous anesthesia is associated with better survival than desflurane anesthesia in intrahepatic cholangiocarcinoma surgery. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(51):e18472. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000018472>.

56. Sardar M and Shroff RT. Biliary cancer: gateway to comprehensive molecular profiling. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2021;19(1):27-34. PMID: 33493146.

57. Bhuria J, Xing T, Scholta KC, Bui MLT, Nguyen NP, Malek P, et al. Hypoxia induced Sonic Hedgehog signaling regulates cancer stemness, epithelial-to-mesenchymal transition, and invasion in cholangiocarcinoma. *Experimental Cell Research.* 2019;385(2):111671. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111671>.

58. Cai C, Wang X, Fu Q and Chen A. The VEGF expression associated with prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2022;20(1):40. <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02511-7>.
59. Yachi T, Yoshizawa T, Kimura N, Seino H, Morohashi S, Goto S, et al. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts recurrence and histological grade of extrahepatic bile duct cancer. *Oncol Lett.* 2023;25(3):125. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13711>.
60. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer.* 2008;98(2):418-25. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604129>.
61. Li C, Zhou T, Chen J, Li R, Chen H, Luo S, et al. The role of exosomal miRNAs in cancer. *J Transl Med.* 2022;20(1):6. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03215-4>.
62. Feng T, Yao Y, Luo L, Zou H, Xiang G, Wei L, et al. ST8SIA6-AS1 contributes to hepatocellular carcinoma progression by targeting miR-142-3p/HMGA1 axis. *Sci Rep.* 2023;13(1):650. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26643-8>.
63. Farhat E, Talarico GGM, Grégoire M, Weber JM and Mennigen JA. Epigenetic and post-transcriptional repression support metabolic suppression in chronically hypoxic goldfish. *Sci Rep.* 2022;12(1):5576. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09374-8>.
64. El-Rifae AA, Naguib R, Ibrahim HA and Rashed LA. Expression of microRNA-224-3p in vitiligo. *J Pak Assoc Dermatol.* 2021;31(4):680-4.
65. Naguib RM, Ibrahim HA, Rashed LA and El-Rifaie AA. The importance of microRNA 224-3p in pathogenesis of NonSegmental Vitiligo. *Egypt. j. Dermatol. venerol.* 2022;42(3):151-4. doi: 10.4103/ejdv.ejdv_35_21.

66. Spencer K, Pappas L, Baiev I, Maurer J, Bocobo AG, Zhang K, et al. Molecular profiling and treatment pattern differences between intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2023;115(7):870-80. <https://doi.org/10.1093/jnci/djad046>.
67. Huang S, Qi P, Zhang T, Li F and He X. The HIF-1 α /miR-224-3p/ATG5 axis affects cell mobility and chemosensitivity by regulating hypoxia-induced protective autophagy in glioblastoma and astrocytoma. *Oncol Rep.* 2019;41(3):1759-68. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6929>.
68. Bai L, Liu G, Dou G, He X, Gong C, Zhang H, et al. Identification of positive cofactor 4 as a diagnostic and prognostic biomarker associated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma. *ILIVER.* 2023;2(4):188–201. <https://doi.org/10.1016/j.iliver.2023.08.007>.
69. Chang Z, Huo L, Li K, Wu Y and Hu Z. Blocked autophagy by miR-101 enhances osteosarcoma cell chemosensitivity in vitro. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:794756. <https://doi.org/10.1155/2014/794756>.
70. Kim JH, Lee KS, Lee DK, Kim J, Kwak SN, Ha KS, et al. Hypoxia-responsive microRNA-101 promotes angiogenesis via heme oxygenase-1/vascular endothelial growth factor axis by targeting cullin 3. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(18):2469-82. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5856>.
71. Xiang G and Cheng Y. MiR-126-3p inhibits ovarian cancer proliferation and invasion via targeting PLXNB2. *Reprod Biol.* 2018;18(3):218-24. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.07.005>.
72. Chen P, Gu YY, Ma FC, He RQ, Li ZY, Zhai GQ, et al. Expression levels and co-targets of miRNA-126-3p and miRNA-126-5p in lung adenocarcinoma tissues: an

exploration with RT-qPCR, microarray and bioinformatic analyses. *Oncol Rep.* 2019;41(2):939-53. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6901>.

73. Liu X, Nishikubo K, Ohgaki R, Okanishi H, Okuda S, Xu M, et al. Identification of tumor-suppressive miRNAs that target amino acid transporter LAT1 and exhibit anti-proliferative effects on cholangiocarcinoma cells. *J Pharmacol Sci.* 2024;154(4):301-11. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2024.02.012>.

74. Xu L, Zhang Y, Tang J, Wang P, Li L, Yan X, et al. The prognostic value and regulatory mechanisms of microRNA-145 in various tumors: a systematic review and meta-analysis of studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(5):867–81. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0570>.

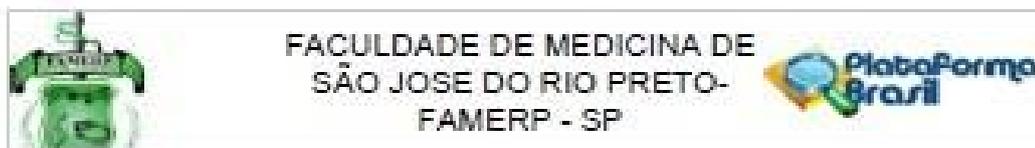
75. Wu G, Yu W, Zhang M, Yin R, Wu Y and Liu Q. MicroRNA-145-3p suppresses proliferation and promotes apoptosis and autophagy of osteosarcoma cell by targeting HDAC4. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup2):579-86. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1464459>.

76. Mataka H, Seki N, Mizuno K, Nohata N, Kamikawaji K, Kumamoto T, et al. Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) coordinately targeted MTDH in lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(44):72084-98. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12290>.

77. Idris R, Chaijaroenkul W and Na-Bangchang K. Molecular targets and signaling pathways in cholangiocarcinoma: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2023;24(3):741-51. doi: 10.31557/APJCP.2023.24.3.741.

78. Zoi V, Giannakopoulou M, Alexiou GA, Bouziotis P, Thalasselis S, Tzakos AG, et al. Nuclear medicine and cancer theragnostics: basic concepts. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(19):3064. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13193064>.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)



Continuação do Parecer 1-113.827

5. Analisar níveis séricos de NIS, VEGF-A, HIF, PIK3CA e PTEN em animais xenotransplantados e pacientes com CC. 6. Analisar polimorfismos genéticos de NIS (rs34705139, rs73520743), VEGF-A (rs1570360, rs833061 e rs3025039), HIF (rs1154946, rs11549465, rs115494657, rs11549467), PIK3CA (rs11784907) e PTEN (rs10490920, rs532678, rs701848) em pacientes com CC e sua relação com seus níveis séricos e expressão gênica no tecido tumoral.

7. Caracterizar os pacientes com CC considerando perfil epidemiológico, antropométrico, clínico e bioquímico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pendências sanadas.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitações atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado.

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5418
 Bairro: VILA SÃO PEDRO CEP: 15.090-000
 UF: SP Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
 Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cep@famerp@famerp.br

APÊNDICE I - Compilado de melhores condições da radioterapia metabólica utilizando iodo-131, para modulação de genes e microRNAs em linhagens celulares de colangiocarcinoma intra e extra-hepático.

| Marcador | Classificação | Expressão Desejada | Melhor Condição HuCCT-1 | Melhor Condição TFK-1 |
|-----------------|-----------------------|---------------------------|--|---|
| <i>HIF1A</i> | Oncogene | Reduzida | - 1Gy e 20Gy, independente do tempo - 60Gy, após 2h | - 1Gy e 20Gy, após 48h e 12d - 60Gy, após 2h |
| <i>VEGFA</i> | Oncogene | Reduzida | - 2h e 12d, independente da dosagem | - 20Gy, após 48h e 12d |
| miRNA-101-3p | miR Supressor Tumoral | Elevada | - 2h, independente da dosagem | - 20Gy, após 48h e 12d - 60Gy, após 2h |
| miRNA-126-3p | miR Supressor Tumoral | Elevada | - 48h, independente da dosagem | - 20Gy, após 48h e 12d |
| miRNA-142-3p | miR Supressor Tumoral | Elevada | - 48h, independente da dosagem | - 20Gy, após 48h e 12d |
| miRNA-145-3p | miR Supressor Tumoral | Elevada | - 2h e 24h, independente da dosagem | - 60Gy, após 2h |
| miRNA-210-5p | OncomiR | Reduzida | - 48h, independente da dosagem | - 60Gy, após 2h |
| miRNA-224-3p | miR Supressor Tumoral | Elevada | - 2h, independente da dosagem | - 20Gy, após 48h e 12d - 60Gy, após 2h |

HIF1A= Fator de transcrição induzido por hipóxia; *VEGFA*= Fator de crescimento endotelial vascular; HuCCT-1= Linhagem celular de colangiocarcinoma intra-hepático; TFK-1= Linhagem celular de colangiocarcinoma extra-hepático; Gy= gray; d= dias; h= horas.