

Michele Patrícia Rode

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs NOS EXOSSOMOS
DERIVADOS DE LINHAGENS DE CÂNCER DE PRÓSTATA:
PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial para a obtenção do
Grau de Doutor em Farmácia
Orientadora: Prof.^a Dra. Tânia Beatriz Creczynski
Pasa

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rode, Michele Patrícia

Perfil de expressão de microRNAs nos exossomos
derivados de linhagens de câncer de próstata:
prospecção de biomarcadores / Michele Patrícia Rode
; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, 2019.
112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. câncer de próstata, exossomo,
microRNA, biomarcador. I. Pasa, Tânia Beatriz
Creczynski . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

**“Perfil de expressão de microRNAs nos exossomos
derivados de linhagens de câncer de próstata:
prospecção de biomarcadores”**

POR

Michele Patricia Rode

Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

Banca Examinadora:



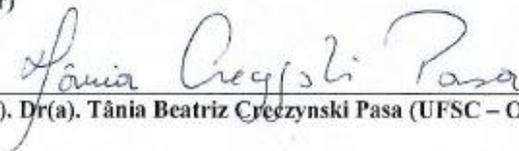
Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ricardo Castillo Garcez (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ionara Rodrigues Siqueira (UFRGS - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 02 de julho de 2019.

RESUMO

Atualmente, os principais métodos de detecção e prognóstico para o câncer de próstata são a concentração sérica de antígeno específico da próstata (PSA) e o toque retal acompanhados da análise histológica. Entretanto, o câncer de próstata é heterogêneo e a dosagem de PSA não é suficiente para diferenciar os cânceres indolentes e agressivos. Neste sentido, existe uma clara necessidade por novos marcadores que sejam capazes de identificar o câncer de próstata de maneira específica. Recentemente descobriu-se que os exossomos são componentes importantes na comunicação entre células tumorais e o microambiente do tumor, e que os microRNAs (miRNAs) exossomais vêm apresentando potencial de serem utilizados como biomarcadores de doenças. Neste contexto, este estudo avaliou o perfil de expressão de miRNAs presentes em exossomos derivados de linhagens celulares humanas de câncer de próstata, a fim de detectar novos biomarcadores ou alvos terapêuticos para a doença. Para isso, o RNA total obtido dos exossomos foi analisado pela técnica de microarranjo. Como resultado foram identificados 88 miRNAs que podem ser utilizados em estudos futuros como candidatos para o diagnóstico específico e não invasivo do câncer de próstata. Ainda, foi realizada a validação da expressão por RT-qPCR de 18 miRNAs, confirmando que os miRNAs miR-205-5p, miR-6893-5p, miR-148a-3p e miR-4286 são diferencialmente expressos entre os exossomos das linhagens tumorais em relação à linhagem não tumoral; os miRNAs miR-141-3p, miR-328-5p e miR-7845-5p são diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP; e por fim que os miRNAs miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-183-5p, miR-195-5p, miR-424-5p e miR-425-5p são diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral PC-3. Além disso, a análise de bioinformática identificou a relação dos miRNAs com expressão alterada nos exossomos das linhagens tumorais de próstata com vias que regulam a apoptose e a proliferação celular, além da relação dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral independente de andrógeno PC-3 com a via regulatória hipó. Em conclusão, este estudo identificou um painel de miRNAs exossomais diferenciais relacionados a importantes vias moleculares no câncer, e, portanto, com potencial valor como biomarcadores de diagnóstico para o câncer de próstata.

Palavras-chave: câncer de próstata, exossomo, microRNA, biomarcador.

ABSTRACT

Currently, the main tools for detection and prognosis of prostate cancer are the serum concentration of prostate specific antigen (PSA) and histological analysis. However, as a heterogeneous disease the PSA level of prostate cancer patients is not adequate to differentiate between indolent and aggressive cancers. Hence, it is important identifying a new specific diagnose markers for prostate cancer. Recently, exosomes have been described to play an important role in the communication between tumor cells and the tumor microenvironment; and exosomal microRNAs (miRNAs) are potential biomarkers of the disease. In this context, this study evaluated the expression profile of miRNAs present in exosomes derived from human cell lines of prostate cancer in order to detect new biomarkers or therapeutic targets for the disease. To do so, the total RNA obtained from the exosomes was analyzed by the microarray technique. As result, 88 miRNAs were identified and can be used in future studies as candidates for specific and noninvasive diagnosis of prostate cancer. The expression of 18 miRNAs was validated using RT-qPCR, which confirmed that miR-205-5p, miR-6893-5p, miR-148a-3p and miR-4286 are differentially expressed among exosomes of cancer and non-tumoral cell lines ; the miR-141-3p, miR-328-5p and miR-7845-5p miRNAs are differentially expressed by LNCaP exosomes; and miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-183-5p, miR-195-5p, miR-424-5p and miR-425-5p are differentially expressed by PC-3 exosomes. In addition, bioinformatics analysis identified the relationship between altered miRNAs in prostate cancer derived exosomes with pathways that regulate apoptosis and cell proliferation, as well as the relationship between altered miRNAs in the exosomes of the androgen independent cell line PC-3 and hippo regulatory pathway. In conclusion, this study identified a panel of differential miRNAs related to important molecular pathways in cancer with potential value as diagnostic biomarkers for prostate cancer.

Key words: prostate cancer, exosome, microRNA, biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia e organização celular da próstata.....	21
Figura 2. Divisão histológica e clínica da próstata.....	22
Figura 3. Estádios clínicos do câncer de próstata.....	24
Figura 4. Composição dos exossomos.	30
Figura 5. Biogênese dos exossomos.....	32
Figura 6. Biogênese dos miRNAs.....	35
Figura 7. Aparência e tamanho dos exossomos isolados.....	45
Figura 8. Qualidade do RNA total obtido dos exossomos e das células das linhagens RWPE-1, LNCaP e PC-3.	46
Figura 9. Diagrama de Venn do número de miRNAs detectados no microarranjo.	47
Figura 10. Correlação e variabilidade dos dados de microarranjo.	48
Figura 11. Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos de células tumorais e não-tumorais.	50
Figura 12. Vias KEGG enriquecidas relacionadas aos miRNAs <i>up-regulated</i> nos exossomos de linhagens tumorais.....	55
Figura 13. Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos derivados das linhagens RWPE-1, LNCaP e PC-3.	56
Figura 14. Intensidade e estabilidade de expressão dos miRNAs de referência.....	66
Figura 15. Diagrama de Venn dos miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo.	67
Figura 16. Perfil de expressão dos miRNAs alterados entre os exossomos da linhagem não tumoral e das linhagens tumorais.....	69
Figura 17. Perfil de expressão dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP.....	71
Figura 18. Perfil de expressão dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral PC-3.	72
Figura 19. miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem PC-3 e interações com a via KEGG de sinalização hippo.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das linhagens de próstata.....	39
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados na qPCR.....	43
Tabela 3. miRNAs alterados nos exossomos das linhagens tumorais em relação a linhagem não tumoral.....	50
Tabela 4. Vias KEGG enriquecidas relacionadas com os miRNAs mas expressos nos exossomos das linhagens tumorais.....	52
Tabela 5. Genes relacionados as vias KEGG de sinalização de p53, hippo, ErbB, proteoglicanos e câncer de próstata, e regulados por pelo menos três miRNAs up-regulated nos exossomos das linhagens tumorais.	53
Tabela 6. miRNAs alterados nos exossomos da linhagem LNCaP em relação a linhagem RWPE-1.	57
Tabela 7. miRNAs alterados nos exossomos derivados da linhagem PC-3 em relação a linhagem RWPE-1.	58
Tabela 8. miRNAs alterados nos exossomos derivados da linhagem LNCaP em relação a linhagem PC-3.....	60
Tabela 9. Valores de estabilidade dos miRNAs detectados em todas as amostras de exossomos e não significativos.	63
Tabela 10. Vias KEGG enriquecidas relacionadas com os miRNAs mais expressos nos exossomos da linhagem PC-3.....	74
Tabela 11. Genes relacionados a via KEGG de sinalização hippo e regulados por pelo menos três miRNAs up-regulated nos exossomos da linhagem PC-3.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ACTB – beta actina
AMOT – do inglês *Angiomotin*
BIRC5 - survivina
CALM1 - Calmodulina-1
CASP3 - Caspase-3
CBL - do inglês *E3 ubiquitin-protein ligase CBL*
CCNB1 - do inglês *G2/mitotic-specific cyclin-B1*
CCND1 - do inglês *G1/S-specific cyclin-D1*
CCND2 - do inglês *G1/S-specific cyclin-D2*
CD – Cluster de diferenciação
CDK6 - do inglês *Cyclin-dependent kinase 6*
CDKN1A - do inglês *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*
CDKN1B - do inglês *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B*
cDNA - DNA complementar
COP1 - do inglês *COP1 E3 Ubiquitin Ligase*
CREB3L2 - do inglês *CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 2*
CRISPR - do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CSNK1D - do inglês *Casein Kinase 1 Delta*
CTNNB1 - do inglês *Catenin Beta 1*
DLS - espalhamento dinâmico de luz, do inglês *dynamic light scattering*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DVL3 - do inglês *Dishevelled Segment Polarity Protein 3*
E2F1 - do inglês *E2F Transcription Factor 1*
ELOVL5 - do inglês *elongation of very long chain fatty acids-like 5*
ERBB2 - do inglês *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*
ERG - do inglês *ETS Transcription Factor ERG*
ESCRT - do inglês *endosomal sorting complexes required for transport*
ESE3/EHF - do inglês *ETS Homologous Factor*
EZR - do inglês *Ezrin*
FC - do inglês *fold change*
FDA - do inglês *Food and Drug Administration*
FDR - do inglês *False Discovery Rate*
fPSA - do inglês *free PSA*
FRMD6 - do inglês *FERM Domain Containing 6*
FZD3 - do inglês *Frizzled Class Receptor 3*

FZD6 - do inglês *Frizzled Class Receptor 6*
GSK3B - do inglês *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*
HEPES - Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico
HIF1A - do inglês *Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha*
hnRPs, do inglês heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HSP - proteína de choque térmico, do inglês *heat shock protein*
IGF1R - do inglês *Insulin Like Growth Factor 1 Receptor*
ISUP - do inglês *International Society of Urological Pathology*
ITGA5 - do inglês *Integrin Subunit Alpha 5*
KEGG - Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LAMP2 - do inglês *Lysosome-associated membrane protein 2*
LATS1 - do inglês *Large Tumor Suppressor Kinase 1*
LATS2 - do inglês *Large Tumor Suppressor Kinase 2*
LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LIMD1 - do inglês *LIM Domains Containing 1*
LncRNAs – RNAs longos, do inglês *long non-coding RNAs*
MAPK1 - do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase 1*
MDM2 - do inglês *murine double minute 2*
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MHC-II - Complexo de histocompatibilidade de classe II, do inglês *major histocompatibility complex*
miRNA – microRNAs
MOB1A - do inglês *MOB Kinase Activator 1A*
ncRNAs - RNAs não codificantes, do inglês *non-coding RNAs*
nSMase2 - esfingomielinase neutra 2, do inglês *neutral sphingomyelinase 2*
nt - nucleotídeos
PAK6 - proteína cinase 6 ativada por p21, do inglês *p21-activated protein kinase 6*
PARD6B - do inglês *Par-6 Family Cell Polarity Regulator Beta*
PBS - tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*
PCA - análises de componentes principais, do inglês: *principal component analysis*
PCA3 - do inglês, *prostate cancer antigen 3*
Pdi - índice de polidisperção, do inglês *Polydispersity index*
PHB - proibitina
PHI - do inglês *prostate health index*
piRNAs - do inglês *PIWI-interacting RNAs*

PMAIP1 - do inglês *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*
PPP1CC - do inglês *Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Gamma*
PPP2CA - do inglês *Protein Phosphatase 2 Catalytic Subunit Alpha*
PPP2R1A - do inglês *Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha*
PPP2R1B - do inglês *Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Beta*
pre-miRNA - precursores de miRNA
pri-miRNA - microRNA primário
PSA – antígeno específico da próstata, do inglês *prostate-specific antigen*
PTEN - do inglês *Phosphatase And Tensin Homolog*
RA – receptor de andrógeno
RIN - do inglês *RNA Integrity Number*
RISC - complexo de indução do silenciamento, do inglês *RNA-induced silencing complex*
RT-qPCR – do inglês *reverse transcription – quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*
SERPINE1 - do inglês *Serpin Family E Member 1*
SESN - do inglês *Sestrin*
SFB - soro fetal bovino
SMAD2 - do inglês *SMAD Family Member 2*
SMAD7 - do inglês *SMAD Family Member 7*
snRNAs - pequenos RNAs nucleares, do inglês *small nuclear RNAs*
SPINK1 - do inglês *Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 1*
SPOP - do inglês *Speckle Type BTB/POZ Protein*
SPRY2 - do inglês *Sprouty RTK Signaling Antagonist 2*
STAT3 - do inglês *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*
TAZ - do inglês *Tafazzin*
TEAD - do inglês *TEA Domain Transcription Factor*
TGFBRI - do inglês *Transforming Growth Factor Beta Receptor 1*
THBS1 - do inglês *Thrombospondin 1*
TNFRSF10B - do inglês *TNF Receptor Superfamily Member 10b*
TNM - do inglês *Tumor-Node-Metastasis*
TP53 - do inglês *Tumor Protein P53*
tPSA - PSA total
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UTR - do inglês *untranslated region*
WWTR1 - do inglês *WW Domain Containing Transcription Regulator 1*
YAP - do inglês *Yes Associated Protein 1*
YWHAB - do inglês *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Beta*

YWHAG – do inglês *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Gamma*

YWHAQ – do inglês *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Theta*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Próstata.....	21
2.2. Câncer de próstata.....	22
2.2.1. Epidemiologia e fatores de risco	22
2.2.2. Desenvolvimento e estadiamento do câncer de próstata	23
2.2.3. Mutações genéticas no câncer de próstata.....	25
2.2.4. Mecanismos moleculares no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata.....	25
2.3. Detecção do câncer de próstata	27
2.4. Vesículas extracelulares: microvesículas e exossomos	29
2.5. RNAs não codificantes.....	32
2.5.1. miRNA	33
2.5.1.1. miRNAs e o câncer de próstata	36
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Linhagens e cultura celular.....	39
4.2. Isolamento dos exossomos	39
4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
4.4. Espalhamento dinâmico de luz.....	40
4.5. Extração de RNA total	40
4.6. Avaliação da concentração e qualidade do RNA total	41
4.7. Microarranjo de miRNA	41
4.8. Síntese de cDNA e PCR quantitativo (qPCR).....	42
4.9. Análise de enriquecimento de vias KEGG.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Isolamento e caracterização dos exossomos.....	45
5.2. Análise de expressão de miRNAs pela técnica de microarranjo	47
5.3. Identificação de miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos	49
5.3.1. miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais e a linhagem não tumoral	49
5.3.1.1. Enriquecimento de vias KEGG	51
5.3.2. miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e PC-3.....	56
5.4. Validação da expressão por RT-qPCR.....	62

5.4.1. Seleção dos miRNAs	62
5.4.2. Validação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais e a linhagem não tumoral.....	67
5.4.3. Validação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na linhagem tumoral LNCaP.....	70
5.4.4. Validação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na linhagem tumoral PC-3	71
5.4.5. Enriquecimento de vias KEGG.....	73
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	89
8. PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO A – Estadiamento e descritores do câncer de próstata	111

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se para o ano de 2019 a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, sendo o câncer de próstata o mais incidente representando 31,7 % dos casos de câncer em homens, ou seja 68 mil casos (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018). O aumento dos registros de câncer de próstata nas últimas décadas tem relação direta com o maior acesso a informação e aos métodos de diagnóstico. Atualmente, os métodos disponíveis para a detecção de câncer de próstata são a dosagem sérica do antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*) e o toque retal, acompanhados da confirmação por análise histológica. A dosagem de PSA surgiu em 1990 como um teste promissor na detecção de câncer de próstata, porém este método apresenta sensibilidade e especificidade insuficientes para ser usado isoladamente. Devido a estas limitações, a dosagem de PSA mesmo quando associada aos outros métodos gera um alto índice de pacientes submetidos a biópsias e tratamentos desnecessários. Além disso, existem evidências de que o rastreamento do câncer de próstata não reduz a mortalidade em decorrência desta doença, e sim produz danos, tais como resultados falso-positivos, infecções resultantes de biópsias, ansiedade associada ao sobrediagnóstico e sobretratamento.

Um dos maiores desafios no diagnóstico de câncer de próstata é a detecção específica, uma vez que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença ainda não foram totalmente esclarecidos. Além disso, mesmo quando detectado, atualmente não há teste diagnóstico que permita determinar quais destes tumores irão evoluir para um câncer agressivo. É, portanto, fundamental a identificação de novos biomarcadores específicos para o câncer de próstata. Neste contexto, a utilização de microRNAs (miRNAs) como biomarcadores de câncer vem despertando interesse no meio científico por exercerem um papel importante na iniciação, desenvolvimento e progressão de cânceres em diversos tecidos; e por estarem presentes em fluídos biológicos como sangue e urina permitindo um diagnóstico não invasivo. Além disso, recentemente descobriu-se que os exossomos são capazes de transportar proteínas, mRNAs, miRNAs e DNA de maneira estável, atuando como componentes importantes na comunicação entre células tumorais e o microambiente tumoral. Desta forma, miRNAs exossomais representam uma interessante classe de biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de câncer de próstata.

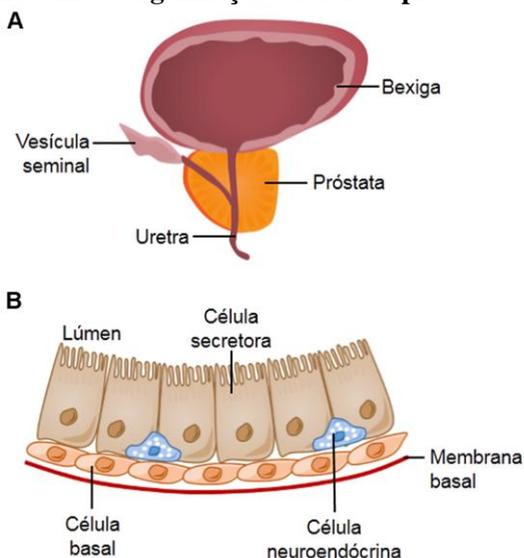
Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de miRNAs presentes em exossomos derivados de diferentes linhagens de câncer de próstata a fim de identificar novos e possíveis biomarcadores. Para isto, foi utilizada a técnica de microarranjo a fim de identificar o perfil de expressão em larga escala e posterior validação por RT-qPCR, além disso foram utilizadas ferramentas de bioinformática para correlacionar os dados de expressão com diferentes vias moleculares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Próstata

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que está situada logo abaixo da bexiga, em frente ao reto, envolvendo parte da uretra (Figura 1A). A função da glândula é produzir uma parte do fluido que compõe o sêmen, auxiliando na motilidade e viabilidade dos espermatozoides. A próstata apresenta em condições normais uma superfície luminal ondulada composta por duas camadas de células epiteliais (Figura 1B): a camada basal, que apresenta células epiteliais basais e células neuroendócrinas, e a camada luminal, que apresenta células colunares secretoras responsáveis pela produção do PSA, da fosfatase ácida prostática e da caliceína-2 humana que irão compor o líquido seminal (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

Figura 1. Anatomia e organização celular da próstata.

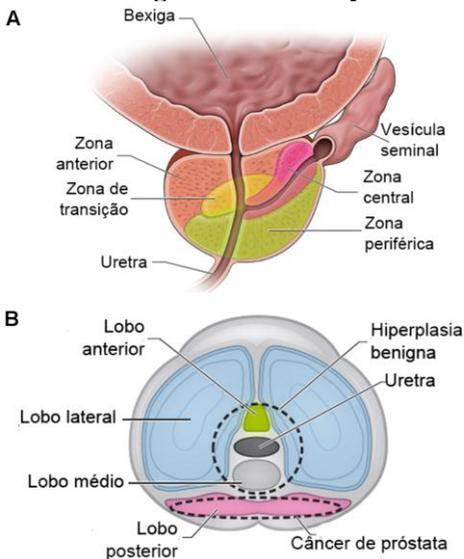


(A) Estrutura anatômica da próstata. (B) Organização celular do epitélio da próstata. Fonte: O autor.

A próstata pode ser dividida por dois sistemas: zonas e lobos. A divisão zonal classifica a próstata em três zonas glandulares em função das diferenças histológicas: zona central, zona de transição e a zona periférica (Figura 2A) (MCNEAL, 1981). Além das zonas glandulares,

também existe a zona anterior que é composta por músculo e tecido fibroso. Neste sentido, 70 % dos tumores de próstata tem origem na zona periférica enquanto que a zona de transição está mais frequentemente relacionada com a presença de hiperplasia benigna da próstata (CHENG et al., 2012). Na clínica, a próstata é dividida em lobos e esta divisão é baseada no aspecto macroscópico do órgão: lobo anterior, posterior, laterais e médio (Figura 2B) (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

Figura 2. Divisão histológica e clínica da próstata.



(A) Divisão zonal da próstata (B) Divisão clínica da próstata. As linhas tracejadas indicam o local onde ocorre com maior frequência a hiperplasia benigna da próstata e o câncer de próstata (Imagens adaptadas de CARTER; COUZENS, 2013).

2.2. Câncer de próstata

2.2.1. Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de próstata é o câncer mais incidente entre os homens em todas as regiões do Brasil, sem considerar o câncer de pele não melanoma (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018). Para o biênio 2018-2019, foi estimado 68,2 mil novos de casos de câncer de próstata. Esse alto índice está relacionado principalmente ao aumento da

expectativa de vida, melhoria da qualidade dos sistemas de informação e maior disponibilidade de métodos diagnósticos.

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata podem ser destacados: o envelhecimento, uma vez que 65 % dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em homens com 65 anos ou mais (MONTIRONI et al., 2016); o histórico familiar – homens com parentes de primeiro grau com câncer de próstata tem cerca de 3 vezes mais risco (KALISH; MCDUGAL; MCKINLAY, 2000); a etnia, pois o risco de câncer de próstata é 1,6 vezes maior em negros (KHEIRANDISH; CHINEGWUNDOH, 2011); o sedentarismo, a obesidade e o consumo de carnes processadas (BOSTWICK et al., 2004). Entretanto, sabe-se pouco sobre a maioria dos fatores de risco, uma vez que os resultados publicados são contraditórios, sendo que somente o envelhecimento, o histórico familiar e a etnia têm associações comprovadas.

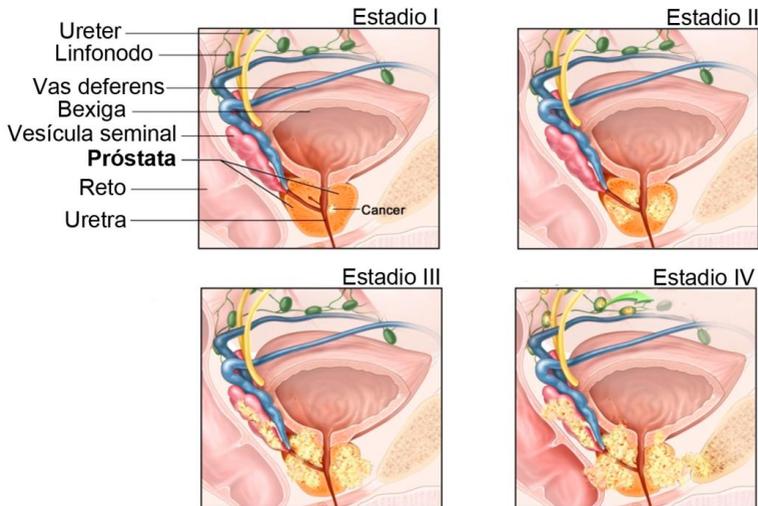
2.2.2. Desenvolvimento e estadiamento do câncer de próstata

O câncer de próstata mais comum é o adenocarcinoma acinar, definido como um tumor epitelial invasivo que consiste de células secretoras. Este tipo de tumor está localizado em maioria na zona periférica, embora 15-20 % ocorrem na zona de transição (EPSTEIN et al., 1994; GUO et al., 2009). O estadiamento clínico do câncer de próstata é baseado no sistema TNM (do inglês *Tumor-Node-Metastasis*) que considera a localização do tumor, a disseminação em linfonodos, a presença de metástases distante, a dosagem de PSA e o escore de Gleason ou grau da ISUP (do inglês *International Society of Urological Pathology*) (BUYOUNOUSKI et al., 2017).

De maneira resumida, durante o desenvolvimento do câncer de próstata (Figura 3) as células cancerosas inicialmente apresentam variação no tamanho e na forma, mas continuam semelhantes as células normais. Neste estadio, o câncer está localizado em um lobo e pode ou não ser detectado pelo exame de toque retal (Estadio I). No estadio II, as células cancerosas atingem mais de um lobo da próstata, podem ou não ser detectadas no exame de toque-retal ou de imagem, e os níveis séricos de PSA estão entre ≥ 10 e < 20 ng/mL. Em etapas posteriores as células tumorais podem invadir os tecidos adjacentes, como as vesículas seminais, e as células variam ainda mais no tamanho e na forma (Estadio III). No último estadio, a massa de células tumorais pode invadir órgãos e tecidos vizinhos, linfonodos ou apresentar metástases distantes (Estadio IV). Os locais de metástase mais comuns são ossos da pelve, dorso,

lombar, costelas, coluna cervical, fêmur, crânio, sacro e úmero (MONTIRONI et al., 2016). Neste estágio, o paciente pode apresentar qualquer nível sérico de PSA ou grau da ISUP. Os descritores completos de cada estágio estão listados no ANEXO A.

Figura 3. Estádios clínicos do câncer de próstata.



(Imagem adaptada de (PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2019)

O grau da ISUP consiste em uma atualização do escore de Gleason, ambos são sistemas de análise anatomopatológica dos tecidos de próstatas obtidos por biópsia. O escore de Gleason consiste da soma das gradações mais abundantes da amostra, com valores das gradações variando de 1 a 5 e escore final de 2 a 10. Sendo que os tumores com escore 2 são mais indolentes e os de escore 10 os mais agressivos. No novo sistema da ISUP, os tumores de grau 1 são bem diferenciados (escore de Gleason <6), os de grau 2 são moderadamente diferenciados (escore de Gleason 6-7), os de grau 3 e 4 são pouco diferenciados ou indiferenciados (escore de Gleason 7-8), e por fim os tumores de grau 5 são indiferenciados (escore de Gleason 9-10) (MONTIRONI et al., 2016).

Além disso, o câncer de próstata pode ser classificado em função da responsividade a andrógenos. Durante o desenvolvimento inicial do câncer de próstata, a proliferação das células cancerosas é dependente de andrógenos como a testosterona e a di-hidrotestosterona, sendo denominado como andrógeno-responsivo (CUNHA et al., 2004;

MARKER et al., 2003). Por causa disto, o câncer de próstata andrógeno responsivo pode ser tratado com fármacos que bloqueiam a produção de andrógenos ou a ligação do hormônio com o receptor (HEIDENREICH et al., 2014). Embora a maioria dos tumores regrida com esse tratamento, em alguns casos as células podem continuar proliferando. Nestes casos o câncer é denominado como castração resistente, andrógeno independente ou refratário a hormônio, não havendo terapia efetiva. Apesar de proliferar independentemente dos níveis de testosterona circulante, a maioria dos tumores independentes a andrógeno dependem da sinalização do receptor de andrógeno. O desequilíbrio da sinalização do receptor de andrógeno leva à proliferação das células tumorais, essa desregulação pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo mutações no gene, amplificação e/ou superexpressão (ZONG; GOLDSTEIN, 2013).

2.2.3. Mutações genéticas no câncer de próstata

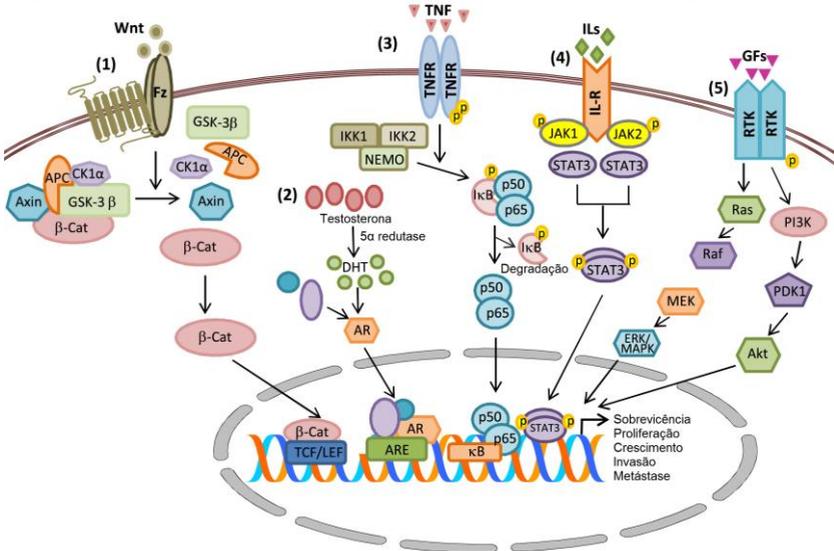
O tratamento de câncer de próstata é igual em todos os casos de metástase, porém os pacientes apresentam diferentes respostas, devido a heterogeneidade molecular. Uma vez entendidas as alterações moleculares pode-se desenvolver estratégias mais efetivas de tratamento. Tomlins e colaboradores (2015) mostraram que aproximadamente 50% dos tumores de próstata apresentam mutações envolvendo a família de fatores de transcrição Ets, sendo o mais comum no *ERG*. Em contrapartida os tumores sem mutações em Ets estão relacionados com a superexpressão do gene *SPINK1* (10%) e/ou mutações envolvendo o gene *SPOP* (6%) (BARBIERI et al., 2012; TOMLINS et al., 2008). Além disso, mutações no gene supressor tumoral *PTEN* são frequentes em tumores metastáticos levando a uma ativação aberrante da via PI3K/Akt (POURMAND et al., 2007; TAYLOR et al., 2010), bem como mutações no gene *TP53* que são associadas a metástases e resistência a quimioterápicos (BOOKSTEIN et al., 1993; EASTHAM et al., 1995; ECKE et al., 2010; HIENZ et al., 2017).

2.2.4. Mecanismos moleculares no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata

A sinalização via receptor de andrógeno, um fator de transcrição ativado por ligante, é central para a manutenção da próstata e já está bem estabelecida (CULIG; SANTER, 2014; GREEN; MOSTAGHEL; NELSON, 2012; LONERGAN; TINDALL, 2011). Na ausência de

ligante, o receptor de andrógeno está localizado no citoplasma, e quando ligado a andrógenos   translocado para o núcleo, onde induz a expressão de genes alvo, que levam a expressão de PSA e induzem a prolifera o e sobrevivência celular. Muta es no receptor de andrógeno são comuns no câncer de próstata, principalmente em tumores com prolifera o independente de andrógenos (LIU et al., 2008; TAYLOR et al., 2010). As muta es podem por exemplo gerar a ativa o da sinaliza o via receptor de andrógenos mesmo com baixas quantidades do ligante. Além desta sinaliza o, outras vias vem sendo relacionadas com o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata (Figura 4) (RAMALINGAM; RAMAMURTHY; NJAR, 2017).

Figura 4. Vias de sinaliza o envolvidas com o câncer de próstata.



Vias de sinaliza o envolvidas com o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. (1) Sinaliza o Wnt/β-catenina, (2) sinaliza o via receptor de andrógenos, (3) sinaliza o via NF-κB, (4) sinaliza o via JAK/STAT e (5) sinaliza o via receptor tirosina cinase. DHT: di-hidrotestosterona; GF: fatores de crescimento; AR: receptor de andrógeno; IL-R: receptor de interleucina; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral. (Imagem adaptada de RAMALINGAM; RAMAMURTHY; NJAR, 2017).

A via NF-κβ está frequentemente aumentada no câncer de próstata, devido ao aumento de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (SUH et al., 2002). Estudos recentes sugerem uma rela o entre a

sinalização do receptor de andrógeno e a via NF- κ B, sendo que a subunidade p65 do complexo de transcrição de NF- κ B pode aumentar a expressão do receptor de andrógeno e consequentemente dos genes alvo levando a proliferação e sobrevivência das células tumorais prostáticas (ZHANG et al., 2009).

Outra via relacionada ao câncer de próstata é a sinalização ErbB, referente aos receptores do fator de crescimento epidermal (EGF) (PERALDO-NEIA et al., 2011). A expressão aumentada do receptor de EGF já foi relacionada ao aumento da capacidade angiogênica e metastática no câncer de próstata, pois leva a ativação de genes relacionados ao receptor de andrógenos através da ativação da via PI3K/Akt (WOODS IGNATOSKI et al., 2003). A via PI3K/Akt regula a ativação do receptor de andrógenos através da fosforilação do receptor ou ainda através da respectiva transcrição (CARVER et al., 2011; LEE et al., 2015). Cerca de 30-50% dos paciente com câncer de próstata possuem a via PI3K/Akt aumentada, frequentemente esta ativação pode ser resultado das mutações no supressor tumoral PTEN, que regula negativamente esta via (RAMALINGAM; RAMAMURTHY; NJAR, 2017).

O aumento da expressão de β -catenina também é comum no câncer de próstata, devido a sinalização aberrante da Akt, que leva a inativação de GSK3 β , favorecendo a formação de β -catenina no citoplasma (SHARMA; CHUANG; SUN, 2002). A β -catenina faz parte da via canônica de Wnt e na presença de ligante leva a ativação dos fatores de transcrição LEF/TCF que estimulam a transcrição de vários genes como Myc e ciclinas D (HUELSKEN; BEHRENS, 2002). A ativação canônica de Wnt também pode levar a ativação dos fatores de transcrição YAP/TAZ, componentes da via de sinalização hippo (SALEM et al., 2019). Além disso, o receptor de andrógeno pode se associar a STAT3 e ativar a via promovendo efeitos proliferativos e anti-apoptóticos (BISHOP et al., 2014).

2.3. Detecção do câncer de próstata

Atualmente, para a detecção e o acompanhamento de câncer de próstata é utilizada a associação da dosagem do PSA e do exame de toque retal, e quando estes estão alterados o diagnóstico confirmatório é realizado por análise histológica do tecido prostático obtido por biópsia. Entretanto, a dosagem de PSA e o toque retal apresentam limitações quanto à especificidade e sensibilidade. No exame de toque retal, somente as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadas, enquanto

que a dosagem do PSA possui relação direta com a predição de câncer, ou seja, quanto mais alto o valor de PSA mais provável a existência de câncer de próstata. Entretanto, falta um consenso sobre o ponto de corte clinicamente significativo, tendo autores propondo valores que variam de 4 a 10 ng/mL (PASQUIÉ et al., 2004). Além disso, a dosagem de PSA não é conclusiva uma vez que apresenta baixa especificidade e sensibilidade, sendo que porcentagens significativas de homens com PSA abaixo de 4 ng/mL apresentaram câncer de próstata (THOMPSON et al., 2003, 2004).

Como o PSA é produzido também pelas células epiteliais secretoras normais da próstata e não especificamente pela célula tumoral, a dosagem pode estar alterada em função de outras doenças ou durante processos infecciosos e/ou inflamatórios. Ainda, o câncer de próstata pode estar presente em homens com valores normais de PSA, especialmente nos casos de homens com histórico familiar da doença (CANBY-HAGINO et al., 2007; MONTIRONI et al., 2016). As limitações descritas geram problemas de sobrediagnóstico e sobretratamento de cânceres clinicamente insignificantes (ETZIONI et al., 2002; LOEB et al., 2014).

Desde a década de 90, quando a dosagem de PSA começou a ser utilizada, houve um aumento expressivo nos registros do câncer de próstata (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). A utilização da dosagem de PSA também teve reflexos na taxa de sobrevivência em 5 anos, que no fim da década de 80 era de 83 % e passou a ser de 99 % em 2000. Apesar dos altos índices de incidência de câncer de próstata, a prevalência é ainda maior. Estudos baseados em autópsia indicam que cerca de 60 % dos homens acima de 79 anos tem câncer de próstata latente (BELL et al., 2015). Estes dados indicam que a grande maioria dos cânceres de próstata não é clinicamente significativo. Portanto, quanto mais específico for o diagnóstico de câncer de próstata, maior a redução de sobretratamentos com a realização de prostatectomia radical e radioterapia, os quais geram efeitos adversos frequentemente desnecessários. Atualmente, como forma de evitar o sobretratamento, recomenda-se vigilância ativa para casos de câncer de próstata com baixo risco, nestes casos o tumor é acompanhado anualmente através de biópsias, toque retal e dosagem de PSA, e tratado somente se a progressão for detectada (HEIDENREICH et al., 2014).

Desde a descoberta do PSA como biomarcador para o câncer de próstata muito tem sido estudado sobre novos métodos capazes de aumentar o valor diagnóstico da molécula. O PSA é encontrado no sangue

complexado a inibidores de protease ou na forma livre (fPSA, do inglês *free PSA*) sendo que esta última representa 5-35% do PSA total (tPSA). O fPSA pode ocorrer de três diferentes formas: pro-PSA, bPSA e iPSA. A razão entre o fPSA e o tPSA melhora a especificidade da detecção do câncer de próstata, entretanto devido à instabilidade do fPSA este teste apresenta variabilidades. Mais recentemente o teste de saúde da próstata (PHI, do inglês *prostate health index*) foi aprovado em 2012 pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*). O PHI combina informações de três testes sanguíneos (PSA, PSA livre e o P2PSA – uma forma de pro-PSA) (LE et al., 2010). Este teste permite uma melhor definição em relação à necessidade de uma biópsia em pacientes com níveis de PSA entre 2 e 10 ng/mL e resultado normal do exame de toque retal (GUAZZONI et al., 2011).

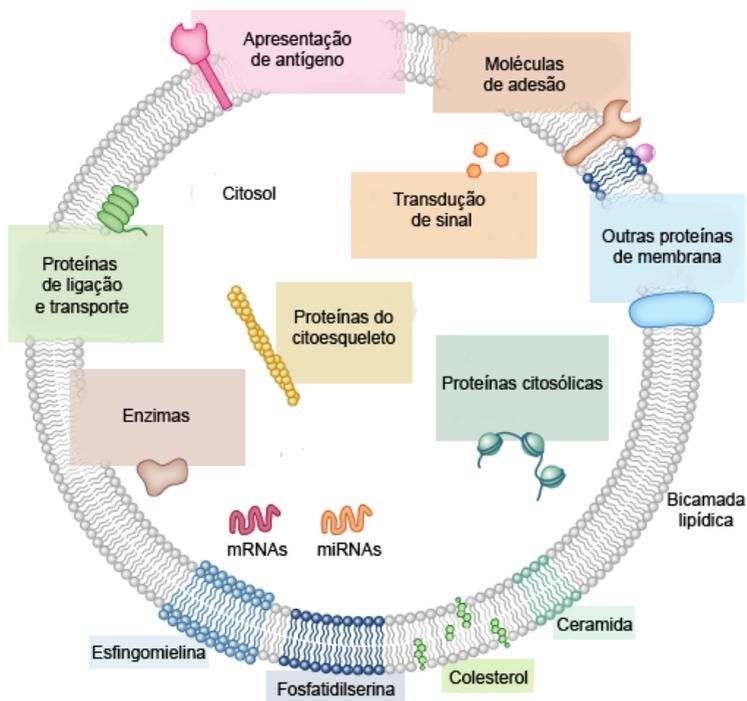
No mesmo ano da aprovação do PHI também foi aprovado pelo US FDA o teste ProgenSA PCA3 (SAINI, 2016). Este teste tem sido utilizado para detecção de câncer de próstata em homens com PSA elevado e biópsia negativa. O gene 3 do câncer de próstata (PCA3 do inglês, *prostate cancer antigen 3*) é transcrito em um RNA longo não codificante altamente expresso em células tumorais e pode ser detectado em amostras de urina (DURAND et al., 2011). Um dos maiores desafios para o diagnóstico mais específico do câncer próstata é a falta de conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Assim como, a falta de marcadores que identifiquem os cânceres que podem evoluir para formas mais agressivas (BAZINET et al., 1992, ARORA et al., 2004).

2.4. Vesículas extracelulares: microvesículas e exossomos

As vesículas extracelulares, tais como os exossomos e as microvesículas, são secretadas no ambiente extracelular por diversas células e apresentam grande importância na comunicação parácrina celular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). São pequenas vesículas que contêm fatores bioativos como lipídios, proteínas, RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA), mas diferem no tamanho e na biogênese. Entretanto, a distinção entre exossomos e microvesículas não é clara em muitos trabalhos publicados na literatura, sendo que a maioria identifica os exossomos como vesículas nanométricas. Enquanto as microvesículas apresentam tamanho entre 100 e 350 nm e tem origem na membrana plasmática (LI et al., 2017), os exossomos apresentam

tamanho entre 30 e 150 nm e tem origem nos corpos multivesiculares. Estruturalmente, os exossomos consistem de uma bicamada lipídica semelhante às membranas plasmáticas celulares e carregam proteínas, mRNA, miRNA e DNA (Figura 5) (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; THAKUR et al., 2014).

Figura 5. Composição dos exossomos.



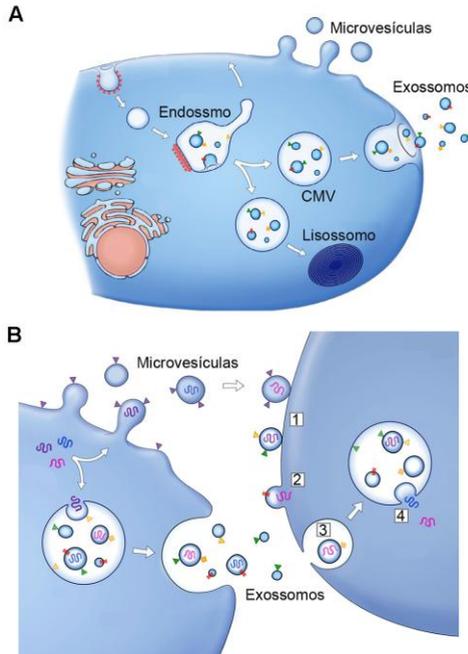
(Imagem adaptada de COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

A biogênese dos exossomos tem início com a via endocítica da célula e posterior formação dos corpos multivesiculares (Figura 6A). Na maioria das células, o destino principal dos corpos vesiculares é a degradação do conteúdo após a fusão com os lisossomas. Entretanto, alguns corpos multivesiculares fundem-se à membrana plasmática liberando o conteúdo de vesículas, denominadas de exossomos, no ambiente extracelular. O direcionamento para a membrana plasmática está relacionado à presença de certas moléculas como colesterol, cluster de diferenciação 9 (CD9), complexo de histocompatibilidade de classe II

(MHC-II, do inglês *major histocompatibility complex*) e o complexo de proteínas ESCRT (do inglês *endosomal sorting complexes required for transport*) (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

Uma vez no ambiente extracelular os exossomos podem interagir com receptores, serem endocitados ou fusionados à membrana plasmática de células alvo, induzindo alterações moleculares e fisiológicas (Figura 6B). Inicialmente, os exossomos foram descritos como responsáveis por eliminar componentes inúteis para as células (HARDING; HEUSER; STAHL, 1983). Somente em 1996 foi descrito o papel dos exossomos na comunicação celular (RAPOSO et al., 1996), e atualmente, os mesmos têm sido descritos como componentes importantes na comunicação entre células tumorais e o microambiente, através da transferência horizontal de informações (MARTINS; DIAS; HAINAUT, 2013). Recentemente, foi descrito que os exossomos derivados de células tumorais direcionam e preparam o futuro nicho metastático através da transferência de proteínas e genes oncogênicos para células não tumorais (COSTA-SILVA et al., 2015; HOSHINO et al., 2015; PEINADO et al., 2012). A comunicação intercelular via exossomos é de grande importância na tumorigênese do câncer de próstata, não só em relação ao processo de metástase (KARLSSON et al., 2016), mas também na resistência a fármacos (CORCORAN et al., 2012), na angiogênese (CHOWDHURY et al., 2015), na proliferação (HOSSEINI-BEHESHTI et al., 2016) e no escape do sistema imune (ABUSAMRA et al., 2005).

Figura 6. Biogênese dos exossomos.



(A) Liberação de microvesículas e exossomos. As microvesículas são formadas a partir da membrana plasmática, enquanto os exossomos são formados nos corpos multivesiculares (CMV). (B) Transferência de proteínas e RNAs por vesículas extracelulares. As microvesículas e os exossomos podem interagir com a membrana das células alvo através de proteínas (1). Além disso, podem se fundir (2) ou serem endocitadas (3), liberando o conteúdo de proteínas e RNA no citoplasma da célula alvo (4). Imagem adaptada de (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

No que diz respeito ao uso de exossomos e microvesículas na clínica, diversos trabalhos os relatam como potenciais biomarcadores pouco invasivos (GUAY; REGAZZI, 2013; MELO et al., 2015). Estudos mostram que, tanto proteínas, quanto miRNAs derivados de exossomos encontrados na urina de pacientes com câncer de próstata, tem potencial como biomarcadores (LV et al., 2013; ØVERBYE et al., 2015).

2.5. RNAs não codificantes

Cerca de 2% do genoma humano é codificado em proteínas, o restante é formado por regiões transcritas em RNAs não codificantes

(ncRNAs, do inglês *non-coding RNAs*) (TAFT et al., 2010). A família de ncRNAs desempenha funções importantes nos organismos tais como auxiliar na síntese de DNA ou no rearranjo cromossômico, no processamento e tradução do RNA, na regulação da expressão gênica e na proteção contra ácidos nucleicos de patógenos (CECH; STEITZ, 2014). Os ncRNAs desempenham um papel importante no desenvolvimento e na fisiologia normal dos organismos e quando alterados estão relacionados a diversas doenças tais como câncer, desordens neurológicas e cardiovasculares (ESTELLER, 2011). Os ncRNAs são particularmente importantes no câncer podendo atuar como oncogenes ou supressores tumorais (ANASTASIADOU; JACOB; SLACK, 2017).

Até a década de 90 eram conhecidas somente as classes de RNA transportador e de RNA ribossomal, porém o avanço das técnicas de sequenciamento tem mostrado uma diversidade cada vez maior de ncRNAs. Fazem parte da família de ncRNAs classes como o CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que atua como mecanismo de defesa contra DNA exógeno em bactérias, os ncRNAs longos (lncRNAs, do inglês *long non-coding RNAs*) envolvidos na regulação epigenética, os microRNAs (miRNAs) responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica, os PIWI-interacting RNAs (piRNAs) envolvidos na modificação da cromatina, os pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs, do inglês *small nucleolar RNAs*) responsáveis por realizar modificações em outros RNAs e os pequenos RNAs nucleares (snRNAs, do inglês *small nuclear RNAs*) envolvidos no processo de *splicing* (CECH; STEITZ, 2014).

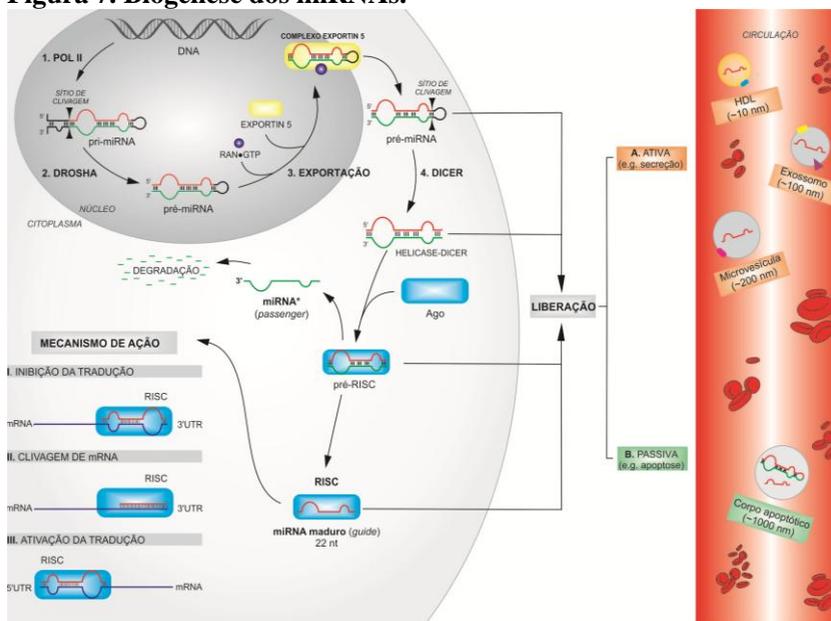
2.5.1. miRNA

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes de 19-23 nucleotídeos, que atuam na modulação fina dos mRNA celulares, com papéis fundamentais nos mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose (LIN; GREGORY, 2015; WINTER et al., 2009). Até 2018, 2694 miRNAs foram identificados em humanos, embora a função de muitos ainda não tenha sido identificada (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019). Cada miRNA tem múltiplos mRNA como alvos e cada mRNA tem múltiplos miRNAs reguladores (CHI et al., 2009).

A biogênese dos miRNAs consiste em um processo complexo envolvendo múltiplas proteínas (Figura 7) (WINTER et al., 2009; HA;

KIM, 2014). Inicialmente os genes são transcritos no núcleo pela RNA polimerase II, formando uma longa cadeia com 70-110 nucleotídeos (nt), denominada como miRNA primário (pri-miRNA). Ainda, no núcleo o pri-miRNA é processado pela endonuclease Drosha (uma RNase III) para formar os precursores de miRNA (pre-miRNA) com aproximadamente 70 nucleotídeos em forma de grampo (*hairpin*). Uma vez formado, o pre-miRNA é exportado ativamente do núcleo para o citoplasma pelo complexo exportina-5 e Ran-GTP. No citoplasma, o pre-miRNA é processado pela Dicer (uma RNase III citoplasmática) para retirada da alça (região não pareada) e formação de uma dupla fita de miRNA com aproximadamente 22 pares de nucleotídeos. A dupla fita é desenrolada por uma helicase e uma das fitas (miRNA maduro) é incorporada a um complexo de indução do silenciamento denominado RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*). Uma vez formado, o complexo liga-se por complementariedade na região não traduzida 3'UTR do mRNA alvo. O grau de complementariedade da ligação do miRNA com o mRNA determina se o mRNA alvo será degradado ou se a tradução será inibida ou estimulada (BARTEL, 2004).

Figura 7. Biogênese dos miRNAs.



(Imagem adaptada de DO AMARAL et al., 2018).

Os miRNAs também podem ser liberados no ambiente extracelular de diferentes formas, podendo estar associados a proteínas, lipídios ou incorporados em pequenas vesículas como os exossomos (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). A detecção de miRNAs em exossomos representa uma metodologia com potencial uso no prognóstico, diagnóstico e na busca de biomarcadores envolvidos no desenvolvimento do câncer.

Neste contexto, a detecção de miRNAs vem despertando interesse por exercerem um papel importante na iniciação, desenvolvimento e progressão de cânceres em diversos tecidos. A literatura descreve a detecção de miRNAs como marcadores para vários cânceres incluindo câncer colorretal (OKUGAWA; TOIYAMA; GOEL, 2014), linfomas (JARDIN; FIGEAC, 2013), câncer de pulmão (ZHANG; YANG; WANG, 2014; MACDONAGH et al., 2015; KANG; LEE, 2014) e câncer de mama (TAVAZOIE et al., 2008; PARK et al., 2014; ZHONG et al., 2015).

Além disso, outra característica de grande interesse no uso de miRNAs como marcadores de diagnóstico é que são encontrados em diversos fluidos biológicos tais como soro, urina e saliva, de forma

estável, resistindo a degradação por ribonucleases e a alterações físico-químicas severas. Devido a estas características, os miRNAs estão atraindo fortemente a atenção da comunidade científica, uma vez que apresentam a maioria dos requisitos necessários para um biomarcador, considerando critérios clínicos e analíticos.

2.5.1.1. miRNAs e o câncer de próstata

O primeiro estudo utilizando miRNA como possível biomarcador de câncer de próstata mostrou que homens com câncer em estágio avançado apresentam maior expressão do miR-141, estando correlacionado a concentrações elevadas de PSA no sangue (MITCHELL et al., 2008). Em estudo de 2011, foi descrita a alteração na expressão dos miR-26a, -195 e let7i no soro de pacientes com câncer de próstata quando comparado a pacientes com hiperplasia benigna, entretanto apresentavam expressão igual aos de indivíduos saudáveis (MAHN et al., 2011). Outro estudo descreveu que em estadios iniciais, o miR-125b está *down-regulated* e o miR-22 está *up-regulated*, e juntamente parecem estar relacionados com a progressão do câncer de próstata (BUDD et al., 2015). Em trabalho descrito por Fu em 2015 foi observado que a expressão do miR-631 é capaz de diminuir a capacidade de invasão e migração das células do câncer de próstata (FU et al., 2015). Em trabalho de Guzel foi descrito pela primeira vez a presença de miRNAs em amostras de secreção prostática, sendo que os miRNAs miR-361-3p, -133b e -221 estão *down-regulated* e o miR-203 *up-regulated* em pacientes com câncer de próstata (GUZEL et al., 2015).

Os estudos citados mostram a expressão de miRNAs alterados em pacientes com câncer de próstata, entretanto não são conclusivos, uma vez que as amostras analisadas entre os estudos eram diferentes e os pacientes avaliados apresentavam estadios da doença e tratamentos variados. Sendo assim, novos estudos são necessários para a caracterização do perfil de expressão dos miRNAs envolvidos no desenvolvimento e na regulação gênica do câncer de próstata, possibilitando a confirmação e/ou descoberta de alvos terapêuticos e biomarcadores.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão de miRNAs exossomais derivados de linhagens celulares de câncer de próstata com diferentes perfis de responsividade a andrógenos e identificar possíveis biomarcadores de diagnóstico.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar os exossomos derivados das linhagens humanas de câncer de próstata LNCaP, PC-3 e da linhagem não-tumoral de células epiteliais de próstata RWPE-1;
- Confirmar a identidade dos exossomos liberados por cada linhagem celular;
- Avaliar, por meio da técnica de microarranjo, o perfil de expressão dos miRNAs presentes nas células e nos exossomos de cada linhagem celular;
- Validar a expressão dos principais miRNAs alterados pela técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR);
- Associar a expressão dos principais miRNAs alterados com vias alteradas no câncer de próstata.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens e cultura celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram cedidas pela professora Dr. Flávia K. Delella do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista e estão descritas na Tabela 1. As três linhagens foram cultivadas em meio RPMI-1640 acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10 % (v/v), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES. As culturas foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C, em atmosfera de 5 % de dióxido de carbono (CO₂).

Tabela 1. Características das linhagens de próstata.

Linhagem	Origem	PSA	Responsividade a andrógeno	Mutações
RWPE-1	Próstata sadia	Sim	Sim	-
LNCaP	Câncer de próstata - sítio metastático no linfonodo supraclavicular	Sim	Sim	RA, PTEN
PC-3	Câncer de próstata - sítio metastático no tecido ósseo	Não	Não	TP53, PTEN

4.2. Isolamento dos exossomos

O isolamento dos exossomos foi realizado da mesma forma para as três linhagens conforme descrito por Théry e colaboradores (2006), com modificações. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 175 cm² e após atingirem 90% de confluência foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), e então cultivadas em meio RPMI suplementado com 2 % de SFB depletado de vesículas. Após 24 h, o sobrenadante da cultura celular foi centrifugado a 300 × g por 5 min para remoção de células, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 2.000 × g por 10 min para remover *debris* celulares e a 10.000 × g por 20 min para remoção de corpos apoptóticos. Para o isolamento das vesículas, o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 × g por 70 min a 4°C, descartado e as vesículas suspensas em PBS e armazenadas a 4°C. Este procedimento foi realizado durante três dias consecutivos e ao final, as vesículas foram suspensas em 10 mL de PBS e centrifugadas novamente a 100.000 × g por 70 min a 4°C para remoção

de proteínas contaminantes. Por fim, as vesículas foram ressuspensas em pequenos volumes de PBS e armazenadas a -80°C até serem utilizadas.

Para esta etapa foram utilizadas a centrífuga Sorvall Evolution RC e o rotor SS-34 disponível no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (CCS, UFSC) e a ultracentrífuga Optima XE-100 com o rotor SW41Ti disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB I) da UFSC.

4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para determinar a forma e o tamanho das vesículas isoladas, as amostras foram analisadas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (JEM-1011) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para isto, a suspensão de exossomos foi diluída (1:1) em água destilada e fixada com paraformaldeído 2 %. Em seguida, grades de 200 *mesh* recobertas com Formar-carbono amorfo foram depositadas sobre as amostras de exossomos durante 20 min. As grades foram retiradas, lavadas em água destilada e depositadas sobre glutaraldeído 1 % em água durante 5 min. Após esta etapa as grades foram lavadas em água destilada, contrastadas com acetato de uranila 5 % durante 5 min, novamente lavadas e deixadas para secar ao ar.

4.4. Espalhamento dinâmico de luz

O tamanho médio das vesículas isoladas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS. As medições foram realizadas em amostras diluídas em PBS (índice de refração: 1,330; viscosidade: 0,88 e temperatura 25°C) utilizando cubeta de quartzo (ZEN2112).

4.5. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o kit mirVana PARIS (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A extração foi iniciada a partir da adição de 300 μL de tampão de lise celular em 200 μL da suspensão de exossomos, seguido de agitação. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de solução desnaturante, seguido de agitação e incubação em gelo por 5 min. Em seguida foi adicionado 1 mL de ácido-fenol:clorofórmio, seguido de agitação em

vórtex por 1 min e centrifugação a $12.000 \times g$ por 5 min. Após esta etapa, 500 μL da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo e adicionados 625 μL de etanol absoluto. Esta mistura foi aplicada em uma coluna com filtro de sílica e centrifugada a $9.000 \times g$ por 1 min. Na sequência, foram realizadas três etapas de lavagem, seguidas da eluição do RNA com 60 μL de água livre de RNase a 95°C . O RNA total obtido foi armazenado em freezer -80°C até utilização.

4.6. Avaliação da concentração e qualidade do RNA total

As análises de qualidade e concentração do RNA total foram realizadas no espectrofotômetro NanoVue Plus e por eletroforese microfluídica utilizando o *kit* RNA 6000 Pico (Agilent Technologies) no equipamento 2100 Bioanalyzer. Amostras de RNA das células com *RNA Integrity Number* (RIN) maiores do que 6 foram consideradas com qualidade para as análises seguintes.

4.7. Microarranjo de miRNA

Para avaliação do perfil de miRNAs foram utilizadas lâminas de microarranjo, *G3 Human miRNA Microarray, Release 21* (Agilent Technologies) que permitem a detecção de 2549 sequências de miRNAs humanos e 21 controles internos (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014). Todas as etapas foram realizadas conforme orientação do fabricante. Nesta análise foram utilizadas duas replicatas biológicas.

Inicialmente, o RNA total foi concentrado em SpeedVac em temperatura ambiente e pressão à vácuo de aproximadamente 10 Torr. Após esta etapa, o RNA foi eluído em água livre de RNase na concentração de 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Em seguida, foi iniciada a etapa de desfosforilação, e para isto, foram adicionados 2 μL do *mix* contendo enzima fosfatase, tampão e o controle interno, em 2 μL de RNA. A mistura foi incubada em termobloco a 37°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram desnaturadas com adição de DMSO, incubadas a 100°C por 7 min e após, mantidas em banho com água e gelo. Por fim, foi realizada a etapa de ligação da cianina-3. Nesta etapa, foi adicionado o *mix* de ligação contendo a enzima ligase, a cianina-3 e o tampão. A mistura foi incubada a 16°C por 2 h. Após o tempo de incubação, as amostras foram secas em SpeedVac com aquecimento de 50°C , por 3 h e pressão de aproximadamente 10 Torr. As amostras secas foram solubilizadas em 17 μL de água livre de RNase, e adicionado o controle

interno, um agente de bloqueio e o tampão de hibridização. As amostras foram incubadas a 100°C por 5 min, e imediatamente transferidas para banho de água e gelo por 5 min. A mistura foi aplicada na lâmina de microarranjo e incubada no forno de hibridização com temperatura de 55°C, sob agitação, durante 20 h. Após a etapa de hibridização, as lâminas foram lavadas e rapidamente lidas no equipamento *SureScan Microarray Scanner*. Os dados foram extraídos utilizando o *software Feature Extraction* e os arquivos gerados foram analisados no *software GeneSpring*.

Para a análise foram considerados apenas os miRNAs detectados nas duas replicatas biológicas. Os miRNAs com *Fold Change* (FC) > 2 foram analisados quanto a diferença estatística utilizando o teste-t moderado com correção de Benjamin-Hochberg ou Anova de uma via no *software* GeneSpring. Valores de $P < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.8. Síntese de cDNA e PCR quantitativo (qPCR)

As reações de poliadenilação e transcrição reversa foram realizadas utilizando o kit miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis (Agilent Technologies), conforme instruções do fabricante. As reações de poliadenilação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 5 ng de RNA das amostras de exossomos. Às amostras de RNA foram adicionados 4 µL de tampão, 1 µL de rATP e 1 µL da enzima poliA polimerase. Após, as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 min e 95°C por 5 min. Em seguida, para síntese de cDNA, foram adicionados os seguintes componentes: 4 µL de RNA poliadenilado, 2 µL de tampão, 0,8 µL de dNTP, 1 µL do iniciador adaptador, 1 µL da enzima AffinityScript RT/RNase e 11,2 µL de água livre de RNase. As amostras foram incubadas a 55°C por 5 min, 25°C por 15 min, 42°C por 30 min e 95°C por 5 min. As amostras de cDNA foram diluídas 1:4 em água livre de RNase e armazenadas a -20°C.

A reação de qPCR foi realizada utilizando o kit miRNA QPCR *master mix* (Agilent Technologies), conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 1 µL de cDNA, 12,5 µL de *master mix*, 0,375 µL do corante de referência (diluído 1:50; v/v), 3,125 µM do iniciador universal antisense, 3,125 µM do iniciador senso específico e 9,125 µL de água livre de RNase. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems com o seguinte programa: denaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40

ciclos de denaturação a 95°C por 10 s, hibridização a 53°C por 15 s e extensão a 72°C por 20 s. Por fim, a especificidade das reações foi analisada através das curvas de dissociação (53-95°C; 0,3°C/s).

As sequências dos iniciadores específicos estão listadas na Tabela 2. Para a determinação da eficiência dos iniciadores foi utilizado o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os miRNAs de referência foram selecionados após análise de estabilidade da expressão utilizando o algoritmo normFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOF, 2004). A expressão dos miRNAs alvo foi normalizada pela combinação da expressão dos miRNAs de referência miR-197-5p e miR-6800-5p. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas e biológicas. A análise estatística foi realizada nos dados de expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As análises estatísticas foram realizadas no *software* Graphpad Prism® versão 6.00 utilizando o teste-t não pareado. As diferenças na expressão relativa foram consideradas significativas quando as variações foram superiores a 2,0 vezes e o $p < 0,05$. Os valores de FC foram calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados na qPCR.

miRNA	Sequência dos iniciadores (5'-3')
miR-125b-5p	CCCTGAGACCCTAACTTGTGA
miR-141-3p	GTAACACTGTCTGGTAAAGATGG
miR-148a-3p	GTCAGTGCACACTACAGAACTTTGT
miR-150-3p	TACAGGCCTGGGGGACAG
miR-183-5p	GTATGGCACTGGTAGAATTCCT
miR-195-5p	GTAGCAGCACAGAAATATTGGC
miR-197-5p	AGAGAGGGCAGTGGGAGG
miR-205-5p	CTTCATTCCACCGGAGTCTG
miR-24-3p	GCTCAGTTCAGCAGGAACAG
miR-27a-3p	CACAGTGGCTAAGTTCCGC
miR-29a-3p	GTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
miR-328-5p	CAGGAGGGGCTCAGGG
miR-424-5p	GGCAGCAGCAATTCATGTTTTGAA
miR-425-5p	GACACGATCACTCCCCTTGA
miR-4286	GACCCCACTCCTGGTACC
miR-4655-5p	GGGATGGCAGAGGGTCCG
miR-6510-5p	AGGGGAGAGAGAGGAGTC
miR-6800-5p	GTGACAGTCAGGGGCGG
miR-6893-5p	GCAGGTGTAGGGTGGAGC
miR-7107-5p	CTGGGGAGGAGGAAGGG
miR-7845-5p	GACAGGGAGGGTCCGTGG

Os iniciadores foram desenhados conforme recomendação do kit miRNA QPCR *master mix*.

4.9. Análise de enriquecimento de vias KEGG

A partir dos resultados obtidos no microarranjo e na análise do perfil de expressão por RT-qPCR, foram realizadas análises de enriquecimento das vias KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto) utilizando a ferramenta DIANA miRPath ver.3 (VLACHOS et al., 2015b). KEGG é uma base de dados integrada, que reúne informações sobre funções e mecanismos moleculares formando uma representação computacional de diferentes sistemas biológicos (KANEHISA; GOTO, 2000). A análise foi realizada com base nos dados de interações entre miRNAs e mRNAs da base de dados Diana-Tarbase v7.0 no modo intersecção de genes de dois ou três miRNAs e correção FDR (*False Discovery Rate*) (VLACHOS et al., 2015a).

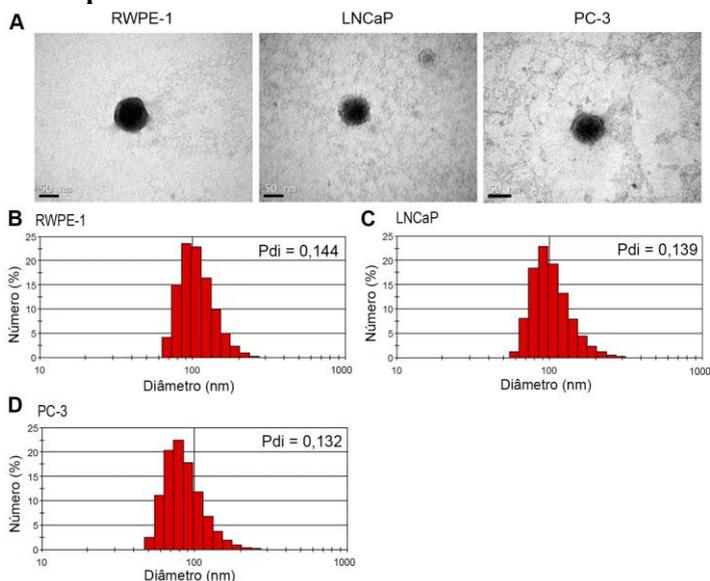
5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e caracterização dos exossomos

Para identificar o perfil de miRNAs exossomais de linhagens de câncer de próstata, foram isolados exossomos do sobrenadante da cultura celular da linhagem de células epiteliais RWPE-1, da linhagem de câncer de próstata dependente de andrógeno LNCaP e da linhagem de câncer de próstata independente de andrógeno PC-3. Os exossomos foram isolados utilizando o método baseado em centrifugações seriadas e ultracentrifugações e posterior avaliação de tamanho por MET e DLS.

As imagens de MET mostram que as vesículas isoladas apresentam formato arredondado e aparência *cup-shaped* (depressão central) característica de exossomos (Figura 8A). Os resultados obtidos nas análises de DLS mostram que o tamanho das vesículas variou entre 50 e 300 nm, com picos entre 80 e 100 nm e distribuição homogênea de tamanho (Pdi 0,132 - 0,144) (Figura 8B-D). Com estes resultados pode-se confirmar a identidade e a presença majoritária de exossomos na população de vesículas isoladas das três linhagens.

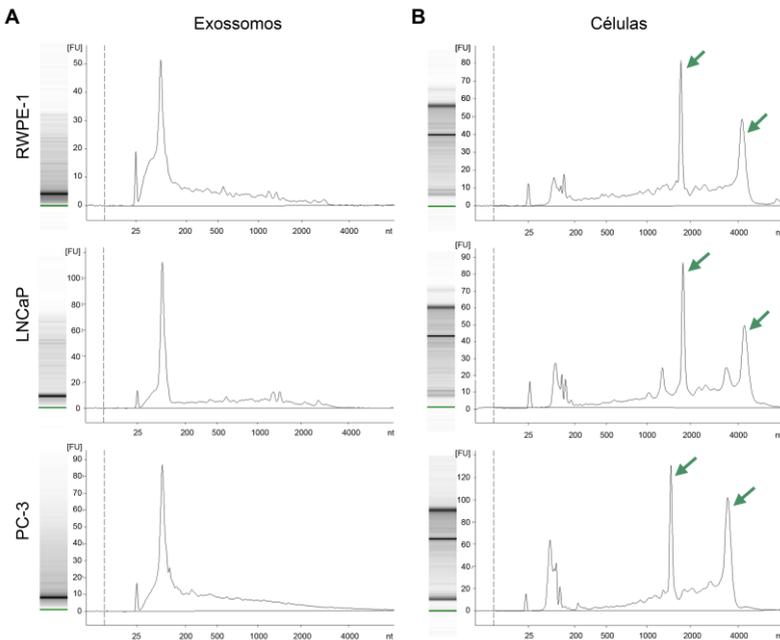
Figura 8. Aparência e tamanho dos exossomos isolados.



(A) Imagens dos exossomos por microscopia eletrônica de transmissão. Barra de escala: 50 nm. (B-D) Distribuição do tamanho e índice de polidispersão (Pdi) dos exossomos determinados por DLS.

Após a etapa de caracterização inicial, foi realizada a extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNA total dos exossomos e das células das três linhagens de próstata. A análise realizada no equipamento Nanovue indicou ausência de contaminação por solventes, DNA e proteínas (dados não apresentados). Porém não foi possível quantificar as amostras de RNA exossomal, por estarem abaixo do limite de detecção do equipamento que é de 5ng/μL. Por esta razão foram utilizados os dados de quantificação obtidos no equipamento Bioanalyzer. A análise de qualidade realizada no Bioanalyzer mostrou que o conteúdo de RNA dos exossomos é composto majoritariamente por pequenos RNAs (<250 nt) e ausência e/ou pequenas quantidades de RNA ribossomais (rRNA) 18S e 28S (Figura 9A), enquanto que nos eletroferogramas das células é possível identificar os picos referentes aos RNAs ribossomais, indicando alta integridade do RNA celular (Figura 9B).

Figura 9. Qualidade do RNA total obtido dos exossomos e das células das linhagens RWPE-1, LNCaP e PC-3.



(A) Géis virtuais e eletroferogramas obtidos no Bioanalyzer para as amostras de RNA isolados dos exossomos. (B) Géis virtuais e eletroferogramas obtidos no Bioanalyzer para as amostras de RNA isolados das células. As setas verdes indicam os picos referentes aos RNA ribossomais 18S e 28S, respectivamente.

5.2. Análise de expressão de miRNAs pela técnica de microarranjo

A avaliação do perfil de expressão de miRNAs nos exossomos e células das linhagens de próstata foi realizada utilizando a técnica de miRNA microarranjo. Foram avaliados 2549 miRNAs, referentes a versão 21 da base de dados de miRNAs. A análise inicial da correlação entre as replicatas biológicas indicou uma alta correlação ($> 0,9$) e, portanto, todas as amostras foram incluídas no estudo. Em seguida, foram realizadas as análises de componentes principais (ACP, do inglês: *principal component analysis* - PCA); de clusterização hierárquica e correlação de Spearman. Para a análise da correlação das replicatas biológicas e PCA foram utilizados os dados de expressão dos 2549 miRNAs, enquanto que para as demais análises foram considerados somente os miRNAs detectados nas duas origens (Figura 10A). Foram detectados 181 miRNAs nas amostras das células e 441 miRNAs nos exossomos, sendo que 169 miRNAs foram encontrados nas amostras de ambas origens (Figura 10A). Todas as linhagens apresentaram miRNAs únicos, mas a grande maioria dos miRNAs está presente nas três linhagens (Figura 10B-C).

Figura 10. Diagrama de Venn do número de miRNAs detectados no microarranjo.

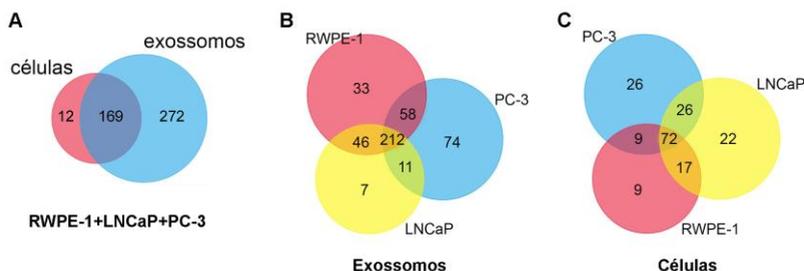
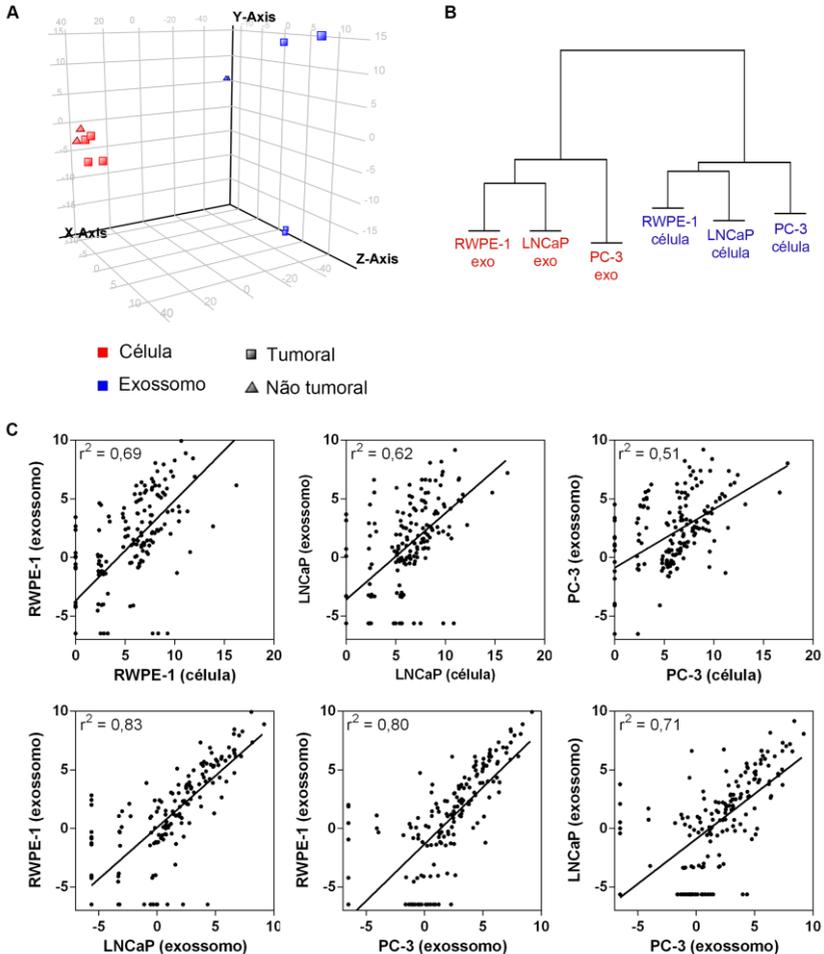


Diagrama de Venn ilustrando o número de miRNAs únicos e compartilhados entre as listas de miRNAs detectados nas duas replicatas biológicas quando comparado a origem celular ou exossomal (A) e as linhagens (B-C).

Os resultados obtidos na PCA e na clusterização hierárquica mostram que os dados do microarranjo são agrupados de acordo com a origem, celular ou exossomal, e ainda mostram que o perfil de miRNAs dos exossomos é mais variável do que o das células (Figura 11A-B). A baixa similaridade no perfil de miRNAs entre os exossomos e as células correspondentes, bem como a maior correlação entre os exossomos das

diferentes linhagens também pode ser observada na Figura 11C. Interessantemente, a linhagem LNCaP apresenta maior semelhança com a linhagem não tumoral RWPE-1 independente da origem (célula e exossomo) (Figura 11B).

Figura 11. Correlação e variabilidade dos dados de microarranjo.



(A) Análise de componentes principais dos dados de intensidade normalizada. Os eixos representam os três principais componentes da análise de microarranjo em relação à variabilidade dos dados. (B) Clusterização hierárquica dos dados de intensidade normalizada por origem (célula e exossomo) e por linhagem celular. RWPE-1, linhagem não-tumoral de próstata; LNCaP e PC-3, linhagens de câncer

de próstata (C) Correlação de Spearman entre os dados de intensidade normalizada das amostras de exossomos versus célula e entre os exossomos de cada linhagem.

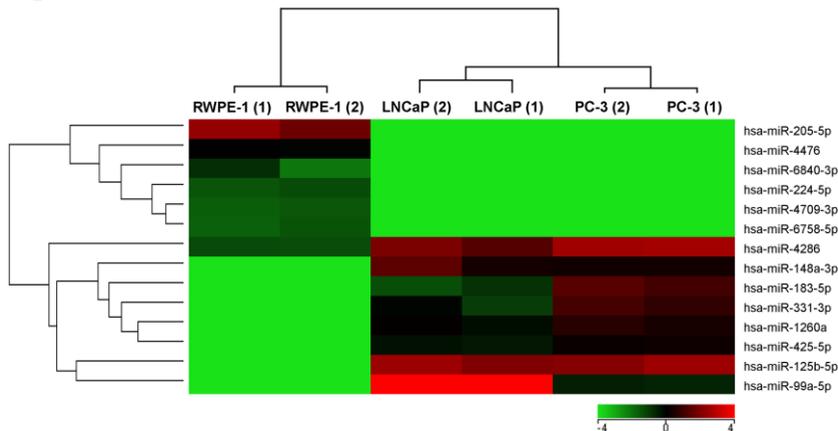
5.3. Identificação de miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos

5.3.1. miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais e a linhagem não tumoral

Após a análise inicial dos dados foi realizada a identificação de miRNAs com FC > 2 e expressão diferencial entre os exossomos da linhagem não-tumoral (RWPE-1) e das linhagens tumorais (LNCaP e PC-3) utilizando o teste-t moderado no *software* GeneSpring ($p < 0,001$). Os resultados desta análise estão apresentados na forma de mapa de calor (*heatmap*) na Figura 12 e mostram 2 grupos de miRNAs separados conforme a regulação da expressão, sendo 6 miRNAs *down-regulated* e 8 miRNAs *up-regulated* nos exossomos das linhagens tumorais.

O primeiro grupo inclui miRNAs detectados exclusivamente nos exossomos da linhagem não-tumoral. Entre estes, o miR-205-5p apresentou a maior intensidade de expressão, sendo agrupado separadamente dos demais miRNAs (miR-4476, miR-6840-3p, miR-224-5p, miR-4709-3p e miR-6758-5p). O segundo grupo inclui o miR-4286, detectado em todas amostras, além dos miRNAs miR-148a-3p, miR-183-5p, miR-331-3p, miR-1260a, miR-425-5p, miR-125b-5p e miR-99a-5p detectados exclusivamente nas amostras de exossomos das duas linhagens tumorais. Os valores de *fold change* e os valores de *p* estão listados na Tabela 3.

Figura 12. Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos de células tumorais e não-tumorais.



No *heatmap* estão apresentados os valores de intensidade de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos com valor de $p < 0,001$ e $FC > 2$. A cor verde indica ausência de expressão, a cor preta indica baixa expressão e a cor vermelha indica alta expressão. O número após o nome da linhagem indica a replicata biológica.

Tabela 3. miRNAs alterados nos exossomos das linhagens tumorais em relação a linhagem não tumoral.

Linhagens tumorais (LNCaP e PC-3) x não-tumoral (RWPE-1)					
Regulação <i>UP</i>			Regulação <i>DOWN</i>		
miRNA	FC	Valor de p	miRNA	FC	Valor de p
miR-125b-5p	425,54	5,04E ⁻⁰⁶	miR-4709-3p	22,32	0,0014
miR-99a-5p	331,52	0,0031	miR-6758-5p	22,54	0,0014
miR-148a-3p	134,31	2,48E ⁻⁰⁵	miR-6840-3p	24,76	0,0016
miR-1260a	105,04	2,48E ⁻⁰⁵	miR-224-5p	25,47	0,0012
miR-331-3p	102,10	0,0001	miR-4476	66,26	0,0001
miR-183-5p	93,24	0,0005	miR-205-5p	273,75	2,48E ⁻⁰⁵
miR-425-5p	85,13	2,78E ⁻⁰⁵			
miR-4286	10,51	0,0070			

FC: *fold change*.

5.3.1.1. Enriquecimento de vias KEGG

Os miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos da linhagem não tumoral RWPE-1 e das linhagens tumorais LNCaP e PC-3 foram analisados em função do enriquecimento de vias KEGG utilizando a ferramenta DIANA miRPath ver.3. A análise foi realizada com base nos dados de interações entre miRNAs e mRNAs da base de dados Diana-Tarbase v7.0. Do grupo de miRNAs menos expressos, apenas três miRNAs apresentam dados de interações com mRNA (miR-205-5p, miR-4476 e miR-224-5p). Estes três miRNAs apresentam duas vias KEGG enriquecidas (modo intersecção de genes; 2 miRNAs). A primeira está relacionada a biossíntese de ácidos graxos insaturados ($p = 0,04$), na qual os miRNAs miR-205-5p e miR-224-5p interagem com o gene alvo *ELOVL5* (gene que codifica a elongase de ácidos graxos de cadeia longa 5), e a segunda relacionada ao glioma ($p = 0,04$) na qual os mesmos miRNAs interagem com os genes alvo *E2F1* (gene que codifica o fator de transcrição E2F1) e *CALM1* (gene que codifica a proteína calmodulina 1).

A análise de enriquecimento de vias KEGG dos 8 miRNAs mais expressos nos exossomos das linhagens tumorais resultou em uma lista com 25 vias (modo intersecção de genes; 3 miRNAs), sendo que todos os miRNAs apresentam dados de interação com mRNA (Tabela 4). Entre as vias enriquecidas estão vias relacionadas com a sinalização de p53, hippo e ErbB, bem como vias que regulam proteoglicanos e relacionadas ao câncer de próstata (Tabela 4 e Figura 13A). Considerando estas 4 vias, 37 genes alvo são regulados por pelo menos 3 miRNAs, os quais estão descritos na tabela 5. Entre estes, o gene *SESN2* (gene que codifica a proteína sestrina 2), relacionado a respostas em condições de estresse, destaca-se, pois é regulado pelo maior número de miRNAs (6/8 miRNAs). Além disso, todas as vias têm em comum a interação com o oncogene ciclina D1 (*CCND1*), sendo regulado pelos miRNAs miR-4286, miR-183-5p, miR-425-5p e miR-99a-5p.

Tabela 4. Vias KEGG enriquecidas relacionadas com os miRNAs mas expressos nos exossomos das linhagens tumorais.

Via KEGG	Valor de p	Genes	miRNAs
<i>Fatty acid biosynthesis (hsa00061)</i>	9,19E-22	1	3
<i>Fatty acid metabolism (hsa01212)</i>	1,40E+02	2	5
<i>p53 signaling pathway (hsa04115)</i>	8,14E+05	13	8
<i>Proteoglycans in câncer (hsa05205)</i>	5,01E+06	15	8
<i>Hippo signaling pathway (hsa04390)</i>	0,0002	14	8
<i>Chronic myeloid leucemia (hsa05220)</i>	0,0005	10	8
<i>Glioma (hsa05214)</i>	0,0025	8	8
<i>ErbB signaling pathway (hsa04012)</i>	0,0032	8	8
<i>Lysine degradation (hsa00310)</i>	0,0040	4	7
<i>MicroRNAs in cancer (hsa05206)</i>	0,0040	19	8
<i>Prostate cancer (hsa05215)</i>	0,0040	10	8
<i>Melanoma (hsa05218)</i>	0,0040	8	8
<i>Bladder cancer (hsa05219)</i>	0,0046	7	8
<i>Hepatitis B (hsa05161)</i>	0,0054	15	8
<i>FoxO signaling pathway (hsa04068)</i>	0,0055	14	8
<i>Viral carcinogenesis (hsa05203)</i>	0,0055	16	8
<i>Adherens junction (hsa04520)</i>	0,0177	8	8
<i>Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption (hsa04961)</i>	0,0194	4	5
<i>Thyroid hormone signaling pathway (hsa04919)</i>	0,0219	10	8
<i>AMPK signaling pathway (hsa04152)</i>	0,0226	12	8
<i>Insulin signaling pathway (hsa04910)</i>	0,0239	12	7
<i>Colorectal cancer (hsa05210)</i>	0,0239	6	7
<i>Central carbon metabolism in cancer (hsa05230)</i>	0,0239	6	7
<i>HIF-1 signaling pathway (hsa04066)</i>	0,0312	10	8
<i>PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)</i>	0,0376	19	8

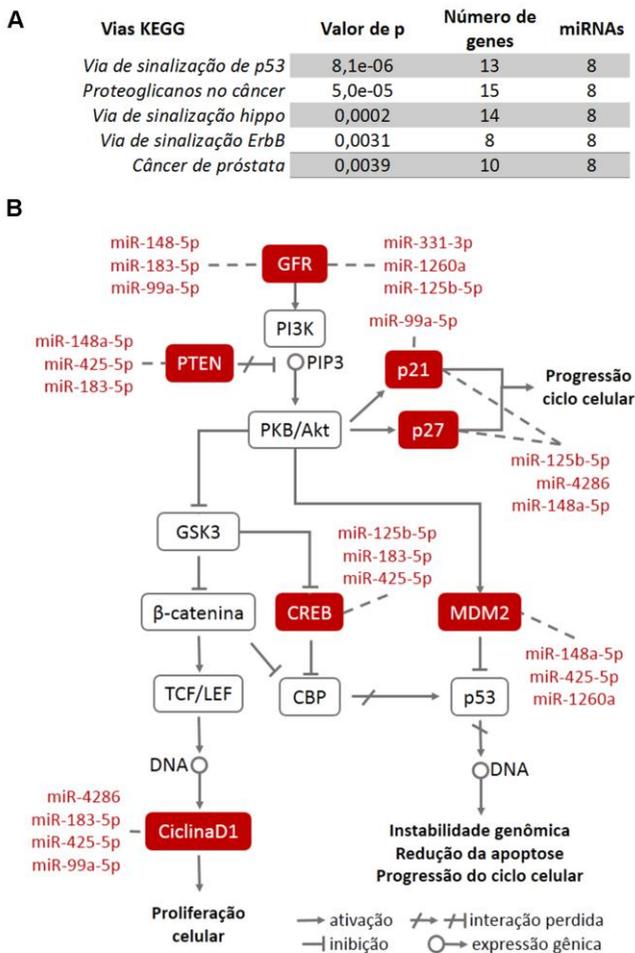
Tabela 5. Genes relacionados as vias KEGG de sinalização de p53, hippo, ErbB, proteoglicanos e câncer de próstata, e regulados por pelo menos três miRNAs up-regulated nos exossomos das linhagens tumorais.

Gene	miRNAs
<i>ACTB</i>	miR-331-3p, miR-425-5p, miR-183-5p
<i>AMOT</i>	miR-4286, miR-148a-5p, miR-1260a
<i>CASP3</i>	miR-1260a, miR-425-5p, miR-99a-5p, miR-1260a
<i>CBL</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-425-5p
<i>CCNB1</i>	miR-425-5p, miR-148a-5p, miR-183-5p
<i>CCND1</i>	miR-425-5p, miR-99a-5p, miR-183-5p, miR-4286
<i>CDK6</i>	miR-331-3p, miR-99a-5p, miR-148a-5p
<i>CDKN1A</i>	miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-4286, miR-148a-5p
<i>CDKN1B</i>	miR-148a-5p, miR-125b-5p, miR-4286
<i>CREB3L2</i>	miR-125b-5p, miR-183-5p, miR-425-5p
<i>ERBB2</i>	miR-125b-5p, miR-331-3p, miR-1260a
<i>EZR</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-125b-5p
<i>FRMD6</i>	miR-148a-5p, miR-1260a, miR-183-5p
<i>HIF1A</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-1260a
<i>IGF1R</i>	miR-99a-5p, miR-148a-5p, miR-183-5p
<i>ITGA5</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-331-3p
<i>LATS2</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-425-5p
<i>MAPK1</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-331-3p
<i>MDM2</i>	miR-148a-5p, miR-425-5p, miR-1260a
<i>MOB1A</i>	miR-148a-5p, miR-1260a, miR-425-5p, miR-125b-5p
<i>NRAS</i>	miR-148a-5p, miR-183-5p, miR-425-5p, miR-125b-5p
<i>PMAIP1</i>	miR-331-3p, miR-99a-5p, miR-125b-5p
<i>PPP1CC</i>	miR-148a-5p, miR-1260a, miR-331-3p, miR-183-5p, miR-125b-5p
<i>PPP2CA</i>	miR-183-5p, miR-425-5p, miR-125b-5p
<i>PTEN</i>	miR-148a-5p, miR-425-5p, miR-183-5p
<i>SERPINE1</i>	miR-425-5p, miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-125b-5p, miR-148a-5p
<i>SESN2</i>	miR-331-3p, miR-1260a, miR-425-5p, miR-99a-5p, miR-183-5p, miR-148a-5p
<i>SESN3</i>	miR-99a-5p, miR-148a-5p, miR-425-5p

<i>SMAD7</i>	miR-183-5p, miR-125b-5p, miR-99a-5p
<i>TGFBR1</i>	miR-1260a, miR-331-3p, miR-425-5p, miR-148a-5p
<i>THBS1</i>	miR-425-5p, miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-148a-5p
<i>TNFRSF10B</i>	miR-1260a, miR-148a-5p, miR-125b-5p, miR-183-5p
<i>YWHAB</i>	miR-148a-5p, miR-425-5p, miR-125b-5p
<i>YWHAG</i>	miR-331-3p, miR-425-5p, miR-183-5p, miR-125b-5p, miR-148a-5p
<i>YWHAQ</i>	miR-148a-5p, miR-425-5p, miR-125b-5p
<i>ACTB</i>	miR-331-3p, miR-425-5p, miR-183-5p
<i>AMOT</i>	miR-4286, miR-148a-5p, miR-1260a

Além destes genes, os miRNAs mais expressos nos exossomos das linhagens tumorais interagem com outros genes importantes na sinalização do câncer de próstata, sendo que todos estão relacionados com as vias de sinalização que regulam a proliferação celular (Figura 13B). O gene do receptor do fator de crescimento de insulina 1 (*IGFRI*) é regulado pelos miRNAs miR-148-5p, miR-183-5p e miR-99a-5, enquanto que os miRNAs miR-331-3p, miR-1260a e miR-125b-5p regulam o gene do receptor HER2 (*ERBB2*). Os genes das proteínas inibitórias p21 e p27 (*CDKN1A* e *CDKN1B* respectivamente), do fator de transcrição bZIP (*CREB3L2*), do supressor tumoral PTEN (*PTEN*) e do inibidor de p53 (*MDM2*) também são regulados por pelo menos três miRNAs (Figura 13B).

Figura 13. Vias KEGG enriquecidas relacionadas aos miRNAs *up-regulated* nos exossomos de linhagens tumorais.

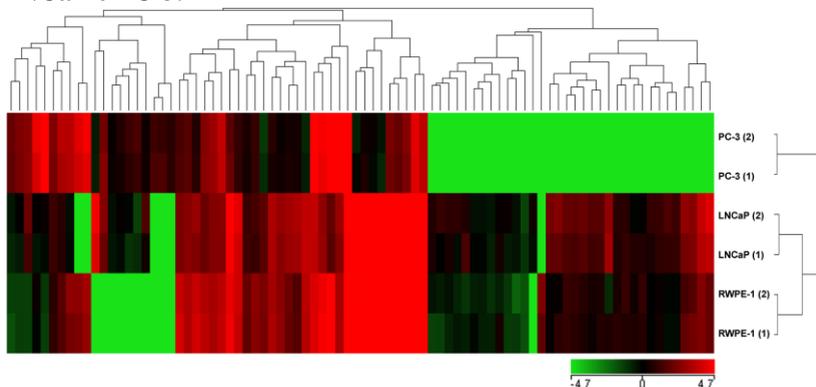


(A) Análise de enriquecimento das vias KEGG utilizando a ferramenta DIANA miRPath e a base de interações Diana-TarBase. Na tabela estão apresentadas as 10 vias KEGG mais enriquecidas, o valor de p e o número de genes alvo e de miRNAs envolvidos na via. (B) Via KEGG de sinalização no câncer de próstata e interações miRNA-mRNA. Caixa vermelha: gene alvo de três ou mais miRNAs. Linha pontilhada: interação miRNA:mRNA. GFR: receptor de fator de crescimento; PI3K: enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKB/Akt: proteína cinase B; GSK3: glicogênio sintase cinase 3; TCF/LEF: fatores de transcrição; CBP: proteína ativadora de CREB.

5.3.2. miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens RWPE-1, LNCaP e PC-3

Em seguida foi realizada a identificação de miRNAs com $FC > 2$ e expressão diferencial comparando os exossomos de cada linhagem, utilizando o teste estatístico Anova de uma via no *software* GeneSpring ($p < 0,001$). Foram identificados 30 miRNAs mais expressos e 12 miRNAs menos expressos nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP em relação aos da linhagem não tumoral RWPE-1; 21 miRNAs mais expressos e 55 miRNAs menos expressos nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 em relação aos da linhagem não tumoral RWPE-1; e 52 miRNAs mais expressos e 20 miRNAs menos expressos nos exossomos da linhagem LNCaP em relação aos da linhagem PC-3. A intensidade de expressão dos 83 miRNAs diferencialmente expressos estão apresentadas em forma de *heatmap* na Figura 14 e os valores de *fold change* e valores de p estão listados nas tabelas 6, 7 e 8.

Figura 14. Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos derivados das linhagens RWPE-1, LNCaP e PC-3.



As intensidades de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos estão plotados no *heatmap*. A cor verde indica ausência de expressão, a cor preta indica baixa expressão e a cor vermelha indica alta expressão. O número após o nome da linhagem indica a replicata biológica.

Tabela 6. miRNAs alterados nos exossomos da linhagem LNCaP em relação a linhagem RWPE-1.

LNCaP x RWPE-1			
miRNA	Regulação	Fold change	Valor de p
miR-99a-5p	<i>up</i>	1813,3	3,13E ⁻⁰⁵
miR-125b-5p	<i>up</i>	417,9	8,8 E ⁻⁰⁵
miR-148a-3p	<i>up</i>	165,7	0,0009
miR-195-5p	<i>up</i>	91,1	0,0002
miR-1260a	<i>up</i>	86,4	6,1E ⁻⁰⁵
miR-425-5p	<i>up</i>	70,8	1,4E ⁻⁰⁵
miR-331-3p	<i>up</i>	60,7	0,0007
miR-183-5p	<i>up</i>	41,7	0,0001
miR-6874-5p	<i>up</i>	7,8	0,0013
miR-4286	<i>up</i>	7,6	0,0014
miR-7845-5p	<i>up</i>	5,4	0,0003
miR-4655-5p	<i>up</i>	4,7	0,0004
miR-141-3p	<i>up</i>	3,7	0,0001
miR-8089	<i>up</i>	3,6	0,0002
miR-6851-5p	<i>up</i>	3,5	7,5E ⁻⁰⁵
miR-365b-5p	<i>up</i>	3,4	0,0007
miR-200c-3p	<i>up</i>	3,0	0,0004
miR-150-3p	<i>up</i>	2,9	0,0002
miR-1234-3p	<i>up</i>	2,7	0,0019
miR-3180	<i>up</i>	2,6	0,0008
miR-500a-3p	<i>up</i>	2,5	0,0001
miR-1250-5p	<i>up</i>	2,3	0,0012
miR-100-5p	<i>up</i>	2,3	0,0001
miR-3621	<i>up</i>	2,2	3,7E ⁻⁰⁵
miR-502-3p	<i>up</i>	2,2	0,0002
miR-4754	<i>up</i>	2,2	7,9E ⁻⁰⁵
miR-6726-5p	<i>up</i>	2,1	2,3E ⁻⁰⁵
miR-6721-5p	<i>up</i>	2,0	0,0001
miR-4433a-5p	<i>up</i>	2,02	0,0005

miR-151a-5p	<i>up</i>	2,0	0,0011
miR-7110-5p	<i>down</i>	2,0	0,0008
miR-4497	<i>down</i>	2,2	0,0014
miR-328-5p	<i>down</i>	2,6	0,0015
miR-8072	<i>down</i>	2,6	0,0013
miR-6893-5p	<i>down</i>	2,9	0,0010
miR-4505	<i>down</i>	3,4	0,0012
miR-1587	<i>down</i>	3,4	0,0015
miR-1275	<i>down</i>	6,1	0,0008
miR-6785-5p	<i>down</i>	10,5	8,9E ⁻⁰⁵
miR-205-5p	<i>down</i>	199,8	0,0015
miR-27a-3p	<i>down</i>	268,3	0,0009
miR-24-3p	<i>down</i>	352,6	0,0008

Tabela 7. miRNAs alterados nos exossomos derivados da linhagem PC-3 em relação a linhagem RWPE-1.

PC-3 X RWPE-1			
miRNA	Regulação	<i>Fold change</i>	Valor de p
miR-125b-5p	<i>up</i>	433,2	8,8E ⁻⁰⁵
miR-424-5p	<i>up</i>	210,3	0,0015
miR-183-5p	<i>up</i>	208,0	0,0001
miR-221-3p	<i>up</i>	207,2	0,0017
miR-331-3p	<i>up</i>	171,5	0,0007
miR-196b-5p	<i>up</i>	154,6	0,0017
miR-1260a	<i>up</i>	127,5	6,1E ⁻⁰⁵
miR-148a-3p	<i>up</i>	108,8	0,0009
miR-425-5p	<i>up</i>	102,2	1,4E ⁻⁰⁵
miR-100-5p	<i>up</i>	86,1	0,0001
miR-99a-5p	<i>up</i>	60,6	3,1E ⁻⁰⁵
miR-29b-3p	<i>up</i>	17,2	0,0008
miR-4286	<i>up</i>	14,4	0,0014
miR-151a-5p	<i>up</i>	11,3	0,0014
miR-1273g-3p	<i>up</i>	9,7	0,0008
miR-92a-3p	<i>up</i>	9,5	0,0009
miR-22-3p	<i>up</i>	3,3	0,0008

miR-27a-3p	<i>up</i>	2,9	0,0009
miR-24-3p	<i>up</i>	2,8	0,0008
miR-6831-5p	<i>up</i>	2,7	0,0009
miR-7107-5p	<i>up</i>	2,1	0,0006
miR-150-3p	<i>down</i>	2,2	0,0002
miR-6789-5p	<i>down</i>	2,5	0,0012
miR-6858-5p	<i>down</i>	2,8	0,0003
miR-328-5p	<i>down</i>	2,9	0,0015
miR-3652	<i>down</i>	3,0	2,1E ⁻⁰⁵
miR-6124	<i>down</i>	3,9	8,6E ⁻⁰⁵
miR-6086	<i>down</i>	5,2	0,0006
miR-6893-5p	<i>down</i>	5,2	0,0010
miR-4430	<i>down</i>	5,5	0,0014
miR-939-5p	<i>down</i>	5,6	0,0007
miR-4487	<i>down</i>	5,7	0,0017
miR-3124-5p	<i>down</i>	6,8	0,0005
miR-4497	<i>down</i>	8,4	0,0014
miR-4513	<i>down</i>	9,3	0,0003
miR-6829-5p	<i>down</i>	11,9	0,0005
miR-4485-5p	<i>down</i>	13,6	0,0011
miR-4271	<i>down</i>	16,0	2,1E ⁻⁰⁵
miR-4257	<i>down</i>	16,7	4,8E ⁻⁰⁵
miR-550a-5p	<i>down</i>	28,6	0,0002
miR-1250-5p	<i>down</i>	30,3	0,0012
miR-8089	<i>down</i>	34,7	0,0002
miR-3138	<i>down</i>	39,5	3,8E ⁻⁰⁵
miR-7845-5p	<i>down</i>	40,6	0,0003
miR-4433a-5p	<i>down</i>	41,1	0,0005
miR-1234-3p	<i>down</i>	48,1	0,0019
miR-3180	<i>down</i>	50,6	0,0008
miR-365b-5p	<i>down</i>	51,7	0,0007
miR-3646	<i>down</i>	52,9	0,0001
miR-1238-3p	<i>down</i>	61,7	0,0012
miR-4274	<i>down</i>	62,3	6,8E ⁻⁰⁵
miR-502-3p	<i>down</i>	64,5	0,0002
miR-6892-5p	<i>down</i>	71,5	0,0002
miR-500a-3p	<i>down</i>	82,7	0,0001

miR-6874-5p	<i>down</i>	82,9	0,0013
miR-3621	<i>down</i>	83,8	3,7E ⁻⁰⁵
miR-198	<i>down</i>	85,6	0,0011
miR-6766-3p	<i>down</i>	91,5	0,0001
miR-6851-5p	<i>down</i>	100,4	7,5E ⁻⁰⁵
miR-345-3p	<i>down</i>	111,3	4,1E ⁻⁰⁵
miR-6721-5p	<i>down</i>	115,8	0,0001
miR-4632-5p	<i>down</i>	125,6	0,0004
miR-200c-3p	<i>down</i>	127,8	0,0004
miR-3065-3p	<i>down</i>	136,0	6,8E ⁻⁰⁵
miR-7114-5p	<i>down</i>	140,1	6,5E ⁻⁰⁵
miR-4754	<i>down</i>	140,2	7,9E ⁻⁰⁵
miR-6754-5p	<i>down</i>	161,8	0,0001
miR-1343-5p	<i>down</i>	163,2	0,0002
miR-4660	<i>down</i>	164,4	0,0001
miR-513b-3p	<i>down</i>	181,3	8,4E ⁻⁰⁵
miR-4655-5p	<i>down</i>	195,9	0,0004
miR-584-5p	<i>down</i>	263,7	0,0001
miR-5196-5p	<i>down</i>	333,2	0,0001
miR-141-3p	<i>down</i>	339,9	0,0001
miR-205-5p	<i>down</i>	375,0	0,0015
miR-6726-5p	<i>down</i>	482,7	2,3E ⁻⁰⁵

Tabela 8. miRNAs alterados nos exossomos derivados da linhagem LNCaP em relação a linhagem PC-3.

LNCaP X PC-3			
miRNA	Regulação	Fold change	Valor de p
miR-141-3p	<i>up</i>	1263,6	0,0001
miR-6726-5p	<i>up</i>	1044,6	2,3E ⁻⁰⁵
miR-4655-5p	<i>up</i>	933,0	0,0004
miR-6874-5p	<i>up</i>	647,5	0,0013
miR-584-5p	<i>up</i>	496,9	0,0001
miR-5196-5p	<i>up</i>	493,3	0,0001
miR-200c-3p	<i>up</i>	394,3	0,0004
miR-6851-5p	<i>up</i>	354,3	7,5E ⁻⁰⁵
miR-4754	<i>up</i>	311,2	7,9E ⁻⁰⁵

miR-513b-3p	<i>up</i>	287,0	8,4E ⁻⁰⁵
miR-4660	<i>up</i>	276,6	0,0001
miR-3065-3p	<i>up</i>	253,9	6,8E ⁻⁰⁵
miR-6721-5p	<i>up</i>	241,4	0,0001
miR-7845-5p	<i>up</i>	222,7	0,0003
miR-500a-3p	<i>up</i>	208,4	0,0001
miR-3621	<i>up</i>	188,3	3,7E ⁻⁰⁵
miR-365b-5p	<i>up</i>	178,4	0,0007
miR-345-3p	<i>up</i>	176,4	4,1E ⁻⁰⁵
miR-6754-5p	<i>up</i>	165,5	0,0001
miR-6766-3p	<i>up</i>	151,1	0,0001
miR-7114-5p	<i>up</i>	148,0	6,5E ⁻⁰⁵
miR-502-3p	<i>up</i>	143,7	0,0002
miR-3180	<i>up</i>	136,2	3,8E ⁻⁰⁵
miR-1234-3p	<i>up</i>	133,0	0,0019
miR-8089	<i>up</i>	128,1	0,0002
miR-1343-5p	<i>up</i>	118,1	0,0002
miR-1238-3p	<i>up</i>	114,5	0,0012
miR-4632-5p	<i>up</i>	111,8	0,0004
miR-198	<i>up</i>	110,0	0,001
miR-195-5p	<i>up</i>	93,7	0,0002
miR-4433a-5p	<i>up</i>	82,9	0,0005
miR-6892-5p	<i>up</i>	81,5	0,0002
miR-4274	<i>up</i>	80,5	6,8E ⁻⁰⁵
miR-3138	<i>up</i>	74,4	3,8E ⁻⁰⁵
miR-1250-5p	<i>up</i>	72,5	0,0012
miR-3646	<i>up</i>	64,1	0,0001
miR-550a-5p	<i>up</i>	39,4	0,0002
miR-99a-5p	<i>up</i>	29,9	3,1E ⁻⁰⁵
miR-4271	<i>up</i>	21,9	2,1E ⁻⁰⁵
miR-4485-5p	<i>up</i>	20,6	0,0011
miR-6829-5p	<i>up</i>	20,1	0,0005
miR-4257	<i>up</i>	19,0	4,8E ⁻⁰⁵
miR-4430	<i>up</i>	9,7	0,0014
miR-3124-5p	<i>up</i>	8,6	0,0005
miR-4487	<i>up</i>	7,7	0,0017
miR-150-3p	<i>up</i>	6,4	0,0002

miR-4513	<i>up</i>	6,3	0,0003
miR-939-5p	<i>up</i>	5,9	0,0007
miR-6858-5p	<i>up</i>	5,5	0,0003
miR-6086	<i>up</i>	5,2	0,0006
miR-6124	<i>up</i>	3,7	8,6E ⁻⁰⁵
miR-4497	<i>up</i>	3,7	0,0014
miR-7110-5p	<i>down</i>	2,1	0,0008
miR-6831-5p	<i>down</i>	2,2	0,0009
miR-331-3p	<i>down</i>	2,8	0,0007
miR-7107-5p	<i>down</i>	3,0	0,0006
miR-1587	<i>down</i>	3,3	0,0015
miR-183-5p	<i>down</i>	4,9	0,0001
miR-4505	<i>down</i>	5,0	0,0012
miR-92a-3p	<i>down</i>	5,3	0,0009
miR-151a-5p	<i>down</i>	5,6	0,0011
miR-22-3p	<i>down</i>	5,7	0,0008
miR-6785-5p	<i>down</i>	9,7	8,9E ⁻⁰⁵
miR-1275	<i>down</i>	11,6	0,0008
miR-1273g-3p	<i>down</i>	13,4	0,0008
miR-29b-3p	<i>down</i>	20,5	0,0008
miR-100-5p	<i>down</i>	37,4	0,0001
miR-196b-5p	<i>down</i>	84,7	0,0017
miR-221-3p	<i>down</i>	113,6	0,0017
miR-424-5p	<i>down</i>	115,3	0,0015
miR-27a-3p	<i>down</i>	783,1	0,0009
miR-24-3p	<i>down</i>	1011,5	0,0008

5.4. Validação da expressão por RT-qPCR

5.4.1. Seleção dos miRNAs

Para a análise de expressão por RT-qPCR foi inicialmente realizada a escolha do miRNA de referência. Esta escolha levou em consideração os valores de estabilidade calculados pelo algoritmo normFinder a partir dos dados de intensidade normalizada obtida no microarranjo. Os valores de estabilidade dos 165 miRNAs detectados no microarranjo e que não apresentaram diferença estatística entre os grupos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de estabilidade dos miRNAs detectados em todas as amostras de exossomos e não significativos.

miRNA	Valor de estabilidade
miR-197-5p	0,114
miR-2861	0,122
miR-6749-5p	0,135
miR-6763-5p	0,151
miR-135a-3p	0,159
miR-4634	0,160
miR-4499	0,164
miR-4721	0,167
miR-6800-5p	0,201
miR-6510-5p	0,209
miR-6085	0,221
miR-3909	0,240
miR-3679-5p	0,241
miR-6722-3p	0,269
miR-26b-5p	0,269
miR-5703	0,271
miR-6724-5p	0,274
miR-6125	0,278
miR-6728-5p	0,288
miR-4516	0,290
miR-630	0,292
miR-188-5p	0,293
miR-1207-5p	0,300
miR-4687-3p	0,300
miR-4463	0,301
miR-4478	0,307
miR-134-5p	0,311
miR-4739	0,313
miR-3656	0,329
miR-5001-5p	0,330
miR-3665	0,342

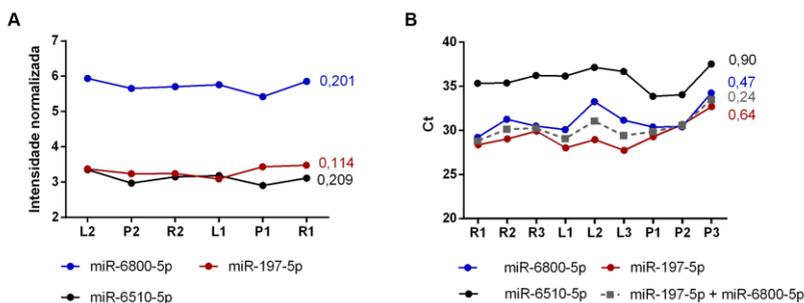
miRNA	Valor de estabilidade
miR-1224-5p	0,343
miR-3196	0,343
miR-6127	0,345
miR-937-5p	0,347
miR-3141	0,347
miR-16-5p	0,348
miR-671-5p	0,357
miR-6165	0,364
miR-4433b-3p	0,389
miR-1229-5p	0,391
miR-4433a-3p	0,392
miR-4646-5p	0,393
miR-483-5p	0,393
miR-3960	0,396
miR-4281	0,397
miR-4763-3p	0,399
miR-6891-5p	0,400
miR-6089	0,410
miR-762	0,413
miR-1225-5p	0,419
miR-4417	0,421
miR-6812-5p	0,424
miR-4787-5p	0,427
miR-6087	0,428
miR-4270	0,433
miR-5006-5p	0,440
miR-6740-5p	0,440
miR-1268a	0,443
miR-5787	0,444
miR-1915-3p	0,459
miR-320d	0,467

miRNA	Valor de estabilidad
miR-4442	0,468
miR-4700-5p	0,482
miR-6867-5p	0,494
miR-200b-3p	0,497
miR-6850-5p	0,502
miR-638	0,502
miR-6756-5p	0,506
miR-5739	0,510
miR-642b-3p	0,512
let-7g-5p	0,512
miR-6826-5p	0,522
miR-4466	0,526
miR-3663-3p	0,543
miR-6821-5p	0,544
miR-365a-3p	0,544
let-7d-5p	0,546
miR-3648	0,552
miR-7847-3p	0,554
miR-940	0,563
miR-6791-5p	0,565
miR-4515	0,586
miR-6088	0,588
miR-200a-3p	0,592
miR-4669	0,592
miR-3162-5p	0,596
miR-654-5p	0,598
let-7b-5p	0,605
miR-3188	0,618
miR-4707-5p	0,632
miR-6775-5p	0,636
miR-6076	0,637
miR-572	0,640
miR-7704	0,643
miR-3940-5p	0,644
miR-4298	0,647

miRNA	Valor de estabilidad
miR-3195	0,649
miR-6794-5p	0,664
miR-765	0,666
miR-6068	0,696
miR-130a-3p	0,706
let-7f-5p	0,717
miR-1227-5p	0,731
miR-1185-1-3p	0,736
miR-662	0,755
miR-4459	0,762
miR-642a-3p	0,765
miR-8069	0,775
miR-8063	0,780
miR-15b-5p	0,798
miR-20a-5p	0,810
miR-7108-5p	0,828
miR-4665-3p	0,833
miR-1202	0,848
miR-6126	0,850
miR-4530	0,855
miR-601	0,856
miR-106b-5p	0,864
miR-6780b-5p	0,877
let-7a-5p	0,880
miR-6090	0,883
miR-15a-5p	0,887
miR-19b-3p	0,893
miR-1246	0,898
miR-7975	0,926
let-7e-5p	0,927
miR-4532	0,937
miR-4788	0,950
miR-6769b-5p	0,957
miR-4734	0,961
miR-107	0,966

Baseando-se nos valores de estabilidade e de intensidade, os miRNAs miR-197-5p, miR-6510-5p e miR-6800-5p foram selecionados para validação por RT-qPCR (Figura 15A). Nesse sentido, a estabilidade dos 3 miRNAs, bem como a combinação (média) dos miRNAs, foram analisadas utilizando os valores de Cq obtidos na qPCR. Como resultado, a combinação entre o miR-197-5p e o miR-6800-5p apresentou o menor valor de estabilidade (Figura 15B) e, portanto, foi utilizada para os cálculos de expressão relativa dos miRNAs de interesse.

Figura 15. Intensidade e estabilidade de expressão dos miRNAs de referência.



(A) Valores intensidade e estabilidade de expressão com base nos dados de microarranjo. (B) Valores de Ct e estabilidade de expressão com base nos dados de qPCR. R1, R2 e R3: replicadas da linhagem RWPE-1; L1, L2 e L3: replicadas da linhagem LNCaP; P1, P2 e P3: replicadas da linhagem PC-3.

Além disso, foram selecionados os miRNAs de interesse capazes de diferenciar os exossomos de cada linhagem. Esta escolha utilizou a combinação das 4 listas de miRNAs diferencialmente expressos nos dados de microarranjo que resultou na identificação de 88 miRNAs alterados (Figura 16). Com base neste resultado, foram selecionados 18 miRNAs de interesse para a etapa de validação da expressão pelo método de RT-qPCR. A seleção dos miRNAs levou em consideração 5 aspectos: a capacidade de diferenciação das linhagens através da intersecção das listas de miRNAs diferencialmente expressos; a intensidade de expressão; a regulação (*up* ou *down*); a análise de de bioinformática; e os dados da literatura.

A partir desta análise foram selecionados 8 miRNAs capazes de diferenciar os exossomos da linhagem não tumoral RWPE-1 das demais linhagens tumorais (miR-125b-5p, miR-148a-3p, miR-183-5p, miR-205-5p, miR-328-5p, miR-425-5p, miR-4286 e miR-6893-5p); 5 miRNAs

capazes de diferenciar os exossomos da linhagem tumoral LNCaP (miR-141-3p, miR-150-3p, miR-195-5p, miR-4655-5p e miR-7845-5p); e 5 miRNAs capazes de diferenciar os exossomos da linhagem tumoral PC-3 (miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-424-5p e miR-7107-5p).

Figura 16. Diagrama de Venn dos miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo.

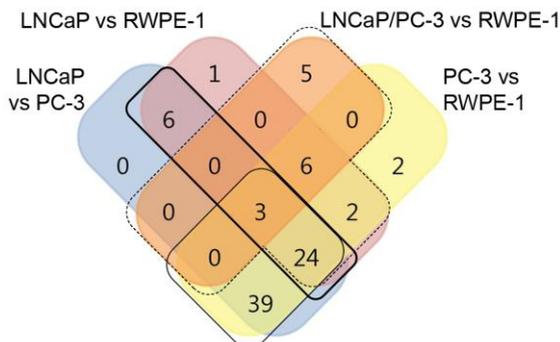


Diagrama de Venn ilustrando o número de miRNAs únicos e compartilhados entre as listas de miRNAs diferencialmente expressos no microarranjo. Linha pontilhada: intersecção dos miRNAs das listas LNCaP e/ou PC-3 vs RWPE-1. Linha cheia fina: intersecção dos miRNAs das listas LNCaP vs PC-3 e PC-3 vs RWPE-1. Linha cheia grossa: intersecção dos miRNAs das listas LNCaP vs PC-3 e LNCaP vs RWPE-1.

5.4.2. Validação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais e a linhagem não tumoral

Os resultados da análise de expressão relativa por RT-qPCR e os valores de intensidade obtidos do microarranjo dos 8 miRNAs validados entre os exossomos da linhagem não tumoral e das linhagens tumorais estão apresentados na Figura 17. A partir da lista de miRNAs menos expressos nos exossomos das linhagens tumorais foram validados dois miRNAs: o miR-205-5p e o miR-6893-5p. A expressão do miR-205-5p está 72 e 41 vezes aumentada nos exossomos da linhagem não tumoral RWPE-1 em relação as linhagens LNCaP e PC-3, respectivamente (Figura 17A). Da mesma forma, o miR-6893-5p apresenta uma expressão 4 e 3 vezes maior nos exossomos da linhagem não tumoral RWPE-1 do que nas linhagens LNCaP e PC-3, respectivamente (Figura 17B).

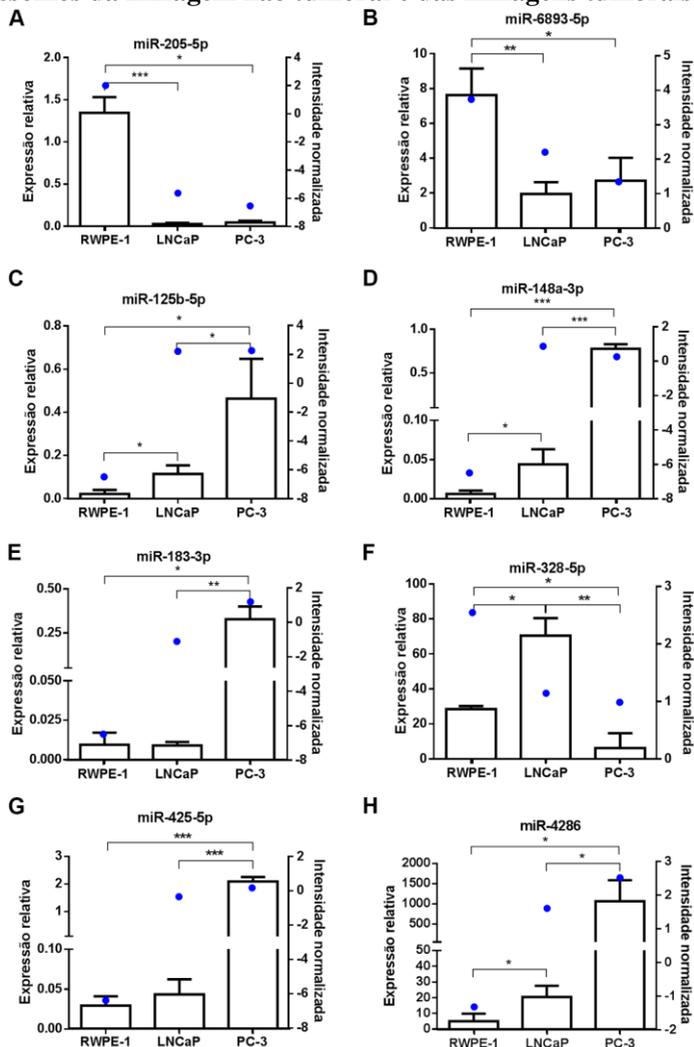
Entre a lista de miRNAs mais expressos nos exossomos das linhagens tumorais foram selecionados 6 miRNAs para a etapa de

validação. A expressão do miR-125b-5p está 6 e 46 vezes aumentada nos exossomos das linhagens tumorais LNCaP e PC-3, respectivamente (Figura 17C). Além disso, os exossomos da linhagem LNCaP apresentam uma expressão 7 vezes maior do miR-148a-3p em relação a linhagem RWPE-1, enquanto os exossomos da linhagem PC-3 apresentam uma expressão 141 vezes maior (Figura 17D). A expressão do miR-183-5p se mostrou aumentada apenas nos exossomos da linhagem PC-3, com um aumento de 42 vezes (Figura 17E).

A expressão do miR-328-5p apresentou um perfil diferente do encontrado nos dados de microarranjo, estando aumentado 2 vezes nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP e diminuído 12 vezes nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 (Figura 17F). A expressão do miR-425-5p mostrou-se aumentada apenas nos exossomos da linhagem PC-3, com um aumento de 75 vezes (Figura 17G). Por fim, a expressão do miR-4286 está 5 e 265 vezes aumentada nos exossomos das linhagens tumorais LNCaP e PC-3, respectivamente (Figura 17H).

A partir desta análise foi possível confirmar que 5 dos 8 miRNAs selecionados para validação apresentam diferença de expressão ($FC > 2$ e $p < 0,05$) entre os exossomos da linhagem não tumoral RWPE-1 e das linhagens tumorais LNCaP e PC-3. Além disso, dois miRNAs (miR-183-5p e miR-425-5p) estão diferencialmente expressos na linhagem PC-3 e um miRNA (miR-328-5p) está diferencialmente expresso na linhagem LNCaP.

Figura 17. Perfil de expressão dos miRNAs alterados entre os exossomos da linhagem não tumoral e das linhagens tumorais.



Perfil de expressão dos miRNAs miR-205-5p (A), miR-6893-5p (B), miR-125b-5p (C), miR-148a-3p (D), miR-183-3p (E), miR-328-5p (F), miR-425-5p (G) e miR-4286 (H). As colunas representam a média \pm desvio padrão dos valores de expressão relativa obtidos por RT-qPCR. Os pontos azuis representam a média dos valores de intensidade normalizada obtidos por microarranjo. Os asteriscos indicam a diferença estatística entre os grupos. (Teste-t não pareado; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4.3. Validação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na linhagem tumoral LNCaP

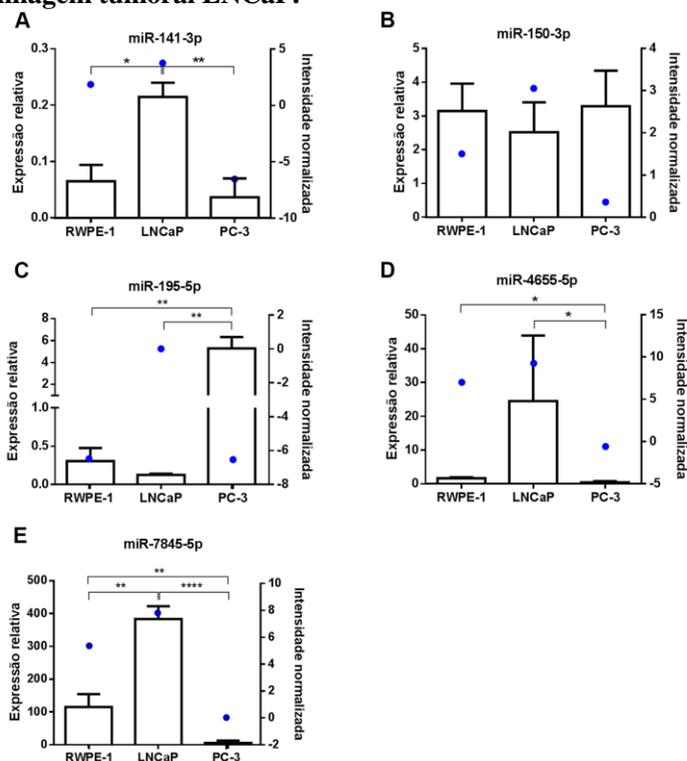
Os resultados da análise de expressão relativa obtidos por RT-qPCR e os valores de intensidade obtidos por microarranjo dos 5 miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP estão apresentados na Figura 18. A expressão do miR-141-3p está 3 e 8 vezes aumentada nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP em relação as linhagens RWPE-1 e PC-3, respectivamente (Figura 18A).

A expressão dos miRNAs miR-150-3p e miR-195-5p apresentaram perfis diferentes do encontrado nos dados de microarranjo, sendo que o miR -150-3p é expresso da mesma forma nos exossomos das três linhagens (Figura 18B). O miR-195-5p apresenta uma expressão 2 vezes menor em comparação com a linhagem RWPE-1 embora não seja significativa e uma expressão 42 vezes menor em relação a linhagem PC-3 (Figura 18C).

Além disso, os exossomos da linhagem LNCaP apresentam uma expressão 6 vezes maior do miR-4655-5p em relação a linhagem RWPE-1, mas sem diferença estatística, e 58 vezes maior em relação a linhagem PC-3 (Figura 18D). Por fim, a expressão do miR-7845 está aumentada 3 e 116 vezes em comparação com os exossomos das linhagens RWPE-1 e PC-3, respectivamente (Figura 18E).

A partir desta análise foi possível confirmar que 2 dos 5 miRNAs selecionados estão diferencialmente expressos ($FC > 2$ e $p < 0,05$) nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP. Ainda, o miR-4655-5p apesar de não apresentar diferença estatística em relação a linhagem RWPE-1 tem a expressão aumentada. Além disso, o miR-195-5p está diferencialmente expresso na linhagem PC-3 e o miR-150-3p está expresso igualmente nas três linhagens.

Figura 18. Perfil de expressão dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP.



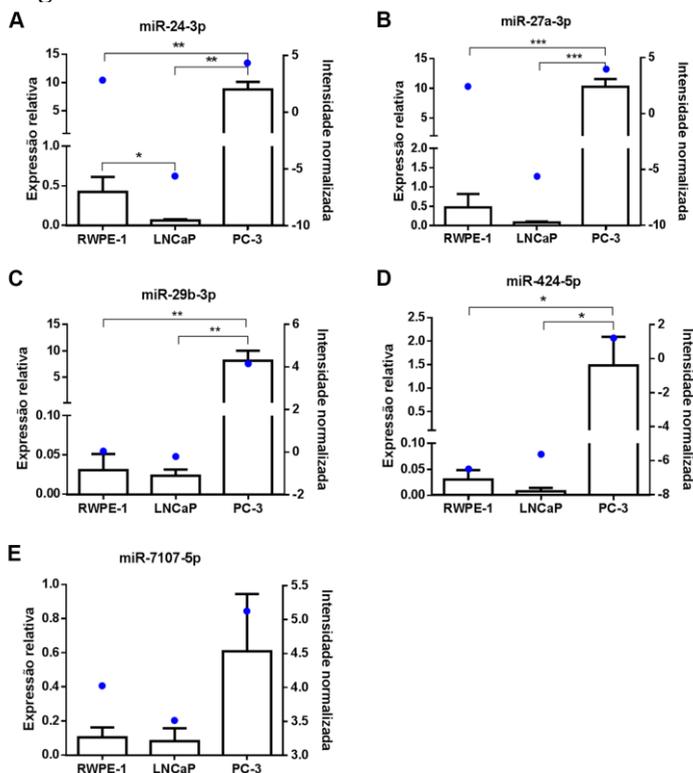
Perfil de expressão dos miRNAs miR-141-3p (A), miR-150-3p (B), miR-195-5p (C), miR-4655-5p (D) e miR-7845-5p (E). As colunas representam os valores de expressão relativa obtidos por RT-qPCR. Os pontos azuis representam os valores de intensidade normalizada obtidos por microarranjo. Os dados de expressão relativa estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam a diferença estatística entre os grupos. (Teste-t não pareado; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.4.4. Validação da expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na linhagem tumoral PC-3

Os resultados da análise de expressão relativa obtida por RT-qPCR e os valores de intensidade obtidos por microarranjo dos 5 miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 estão apresentados na Figura 19. A expressão do miR-24-3p está 22 e 141 vezes aumentada nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 em relação as linhagens

RWPE-1 e LNCaP, respectivamente (Figura 19A). Da mesma forma, o miR-27a-3p apresenta uma expressão 25 e 132 vezes maior nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 em relação às linhagens RWPE-1 e LNCaP, respectivamente (Figura 19B). Além disso, os exossomos da linhagem PC-3 apresentam uma expressão 304 vezes maior do miR-29b-3p em relação a linhagem RWPE-1 e 356 vezes em relação a linhagem LNCaP (Figura 19C). A expressão do miR-424-5p se mostrou aumentada 52 vezes em comparação a linhagem RWPE-1 e 225 vezes em comparação a linhagem LNCaP (Figura 19D). Por fim, a expressão do miR-7107-5p não apresenta diferenças significativas embora esteja aumentada 6 e 9 vezes em comparação com os exossomos das linhagens RWPE-1 e LNCaP, respectivamente (Figura 19E).

Figura 19. Perfil de expressão dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral PC-3.



Perfil de expressão dos miRNAs miR-24-3p (A), miR-27a-3p (B), miR-29b-3p (C), miR-424-5p (D) e miR-7107-5p (E). As colunas representam a média \pm

desvio padrão dos valores de expressão relativa obtidos por RT-qPCR. Os pontos azuis representam a média dos valores de intensidade normalizada obtidos por microarranjo. Os asteriscos indicam a diferença estatística entre os grupos. (Teste-t não pareado; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A partir desta análise foi possível confirmar que 4 dos 5 miRNAs selecionados para validação estão diferencialmente expressos ($FC > 2$ e $p < 0,05$) nos exossomos da linhagem tumoral PC-3. Além disso, o miR-7107-5p apesar de não apresentar diferença estatística tem um aumento nos níveis de expressão quando comparado as demais linhagens.

Levando em consideração os resultados da análise de expressão por RT-qPCR, é possível afirmar que os miRNAs miR-205-5p, miR-6893-5p, miR-125b-5p, miR-148a-3p e miR-4286 diferenciam os exossomos das linhagens tumorais LNCaP e PC-3 da linhagem não tumoral RWPE-1. Além disso, os miRNAs miR-328-5p, miR-141-3p e miR-7845-5p diferenciam os exossomos da linhagem LNCaP, enquanto os miRNAs miR-183-5p, miR-425-5p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-424-5p e miR-195-5p diferenciam os exossomos da linhagem PC-3.

5.4.5. Enriquecimento de vias KEGG

Os miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP e PC-3 foram analisados em função do enriquecimento de vias KEGG utilizando a ferramenta DIANA miRPath ver.3 e a base de dados Diana-Tarbase v7.0. Em relação ao grupo de miRNAs alterados nos exossomos da linhagem LNCaP, apenas o miR-141-3p apresentou dados de interações com mRNA, e por isso não foi realizada a análise de enriquecimento.

A análise de enriquecimento de vias KEGG dos 7 miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem PC-3 resultou em uma lista com 36 vias enriquecidas (modo intersecção de genes; 3 miRNAs), sendo que todos os miRNAs apresentam dados de interação com mRNA (Tabela 10). Entre as vias enriquecidas destaca-se a via de sinalização hippo ($p = 1,9e-12$) envolvendo 27 genes e os 7 miRNAs (Tabela 11). Destaca-se o miRNA miR-424-5p pois regula 21 dos 27 genes envolvidos nesta via.

Tabela 10. Vias KEGG enriquecidas relacionadas com os miRNAs mais expressos nos exossomos da linhagem PC-3.

Via KEGG	Valor de p	Genes	miRNAs
<i>Fatty acid biosynthesis (hsa00061)</i>	3,42E-11	3	5
<i>Hippo signaling pathway (hsa04390)</i>	1,95E-01	27	7
<i>Lysine degradation (hsa00310)</i>	1,55E+03	11	7
<i>p53 signaling pathway (hsa04115)</i>	5,60E+04	21	7
<i>Viral carcinogenesis (hsa05203)</i>	7,94E+04	28	7
<i>ECM-receptor interaction (hsa04512)</i>	2,25E+05	9	7
<i>Chronic myeloid leucemia (hsa05220)</i>	4,14E+05	16	7
<i>Pathways in cancer (hsa05200)</i>	0,0002	47	7
<i>Proteoglycans in cancer (hsa05205)</i>	0,0005	29	7
<i>Fatty acid metabolism (hsa01212)</i>	0,0007	5	6
<i>Bladder cancer (hsa05219)</i>	0,0011	12	7
<i>Cell cycle (hsa04110)</i>	0,0012	25	7
<i>Glioma (hsa05214)</i>	0,0015	13	7
<i>Thyroid hormone signaling pathway (hsa04919)</i>	0,0022	21	7
<i>Hepatitis B (hsa05161)</i>	0,0022	23	7
<i>Colorectal cancer (hsa05210)</i>	0,0029	12	7
<i>Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (hsa04550)</i>	0,0035	23	7
<i>Central carbon metabolism in cancer (hsa05230)</i>	0,0038	10	7
<i>Neurotrophin signaling pathway (hsa04722)</i>	0,0072	22	7
<i>PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)</i>	0,0098	42	7
<i>Prostate cancer (hsa05215)</i>	0,0116	17	7
<i>Melanoma (hsa05218)</i>	0,0123	11	7
<i>Non-small cell lung cancer (hsa05223)</i>	0,0130	11	7
<i>Bacterial invasion of epithelial cells (hsa05100)</i>	0,0137	13	7
<i>Renal cell carcinoma (hsa05211)</i>	0,0137	12	7
<i>Endometrial cancer (hsa05213)</i>	0,0137	9	7
<i>HTLV-I infection (hsa05166)</i>	0,0176	34	7
<i>Insulin signaling pathway (hsa04910)</i>	0,0177	22	7
<i>Progesterone-mediated oocyte maturation (hsa04914)</i>	0,0177	16	7
<i>Steroid biosynthesis (hsa00100)</i>	0,0218	2	5

<i>Oocyte meiosis (hsa04114)</i>	0,0230	16	7
<i>TGF-beta signaling pathway (hsa04350)</i>	0,0268	10	6
<i>Small cell lung cancer (hsa05222)</i>	0,0286	14	7
<i>Focal adhesion (hsa04510)</i>	0,0349	28	7
<i>Pancreatic cancer (hsa05212)</i>	0,0439	12	7
<i>Prolactin signaling pathway (hsa04917)</i>	0,0462	12	7

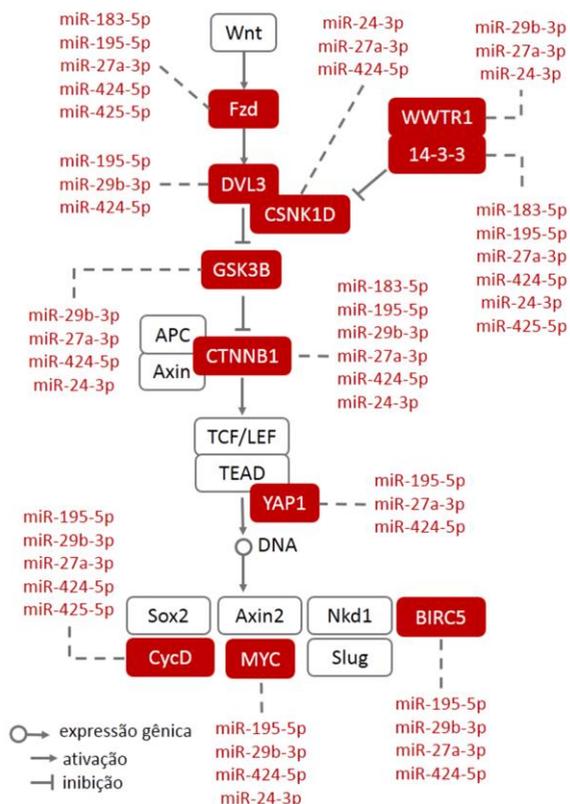
Tabela 11. Genes relacionados a via KEGG de sinalização hippo e regulados por pelo menos três miRNAs up-regulated nos exossomos da linhagem PC-3.

Gene	miRNAs
<i>ACTB</i>	miR-425-5p, miR-24-3p, miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>AMOT</i>	miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>BIRC5</i>	miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>CCND1</i>	miR-425-5p, miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>CCND2</i>	miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>CSNK1D</i>	miR-24-3p, miR-424-5p, miR-27a-3p
<i>CTNNB1</i>	miR-183-5p, miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>DVL3</i>	miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>FZD3</i>	miR-183-5p, miR-425-5p, miR-27a-3p
<i>FZD6</i>	miR-183-5p, miR-424-5p, miR-195-5p
<i>GSK3B</i>	miR-24-3p, miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-29b-3p
<i>LATS1</i>	miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>LATS2</i>	miR-425-5p, miR-24-3p, miR-424-5p
<i>LIMD1</i>	miR-183-5p, miR-424-5p, miR-27a-3p
<i>MOB1A</i>	miR-425-5p, miR-27a-3p, miR-29b-3p
<i>MYC</i>	miR-24-3p, miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>PARD6B</i>	, miR-27a-3p, miR-24-3p, miR-195-5p
<i>PPP1CC</i>	miR-183-5p, miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>PPP2R1A</i>	miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>PPP2R1B</i>	miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>SMAD2</i>	miR-24-3p, miR-424-5p, miR-29b-3p, miR-195-5p
<i>SMAD7</i>	miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>WWTR1</i>	miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p

<i>YAP1</i>	miR-424-5p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>YWHAB</i>	miR-425-5p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>YWHAG</i>	miR-425-5p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-195-5p
<i>YWHAQ</i>	miR-183-5p, miR-425-5p, miR-424-5p, miR-27a-3p

Parte da via de sinalização hippo está apresentada na Figura 20. Os genes que codificam receptores de Wnt *FZD3* e *FZD6* são regulados pelos miRNAs miR-425-5p, miR-183-5p, miR-27a-3p e miR-183-5p, miR-195-5p, miR-424-5p, respectivamente. Os genes das subunidades beta, gama e tau (*YWHAB*, *YWHAG* e *YWHAQ*) da família 14-3-3 são regulados respectivamente pelos seguintes grupos de miRNAs: miR-195-5p, miR-27a-3p e miR-425-5p; miR-195-5p, miR-27a-3p e miR-425-5p; e miR-183-5p, miR-27a-3p, miR-424-5p e miR-425-5p. Os genes das ciclinas D1 e D2 (*CCND1* e *CCND2*) são reguladas pelos miRNAs miR-195-5p, miR-27a-3p, miR-424-5p, miR-425-5p, miR-29b-3p e miR-195-5p, miR-424-5p, miR-29b-3p respectivamente. Os genes que codificam as proteínas Dvl-3, WWTR1, YAP1 e β -catenina (*CTNNB1*), as cinases CSNK1D e GSK3, a proteína anti-apoptótica BIRC5 e o proto-oncogene MYC também são regulados por pelo menos três miRNAs (Figura 20).

Figura 20. miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem PC-3 e interações com a via KEGG de sinalização hippo.



Via KEGG de sinalização hippo e interações miRNA-mRNA. Caixa vermelha: gene alvo de três ou mais miRNAs. Linha pontilhada: interação miRNA:mRNA. APC: gene supressor tumoral; Axin1: proteína axina 1; TCF/LEF: fatores de transcrição TEAD: fator de transcrição; Sox2: fator de transcrição; Axin2: proteína axina 2; Nkd1: inibidor da via Wnt; Slug: proteína do gene SNAI2.

Levando em consideração todos os resultados, este trabalho mostrou que alguns miRNAs exossomais das linhagens de próstata RWPE-1, LNCaP e PC-3 apresentam perfis distintos que diferenciam as linhagens tumorais. Além disso, identificou 88 miRNAs que podem ser utilizados em estudos futuros como candidatos para o diagnóstico específico e não invasivo do câncer de próstata. Ainda, validou a

expressão de 18 miRNAs, confirmando que 5 miRNAs são diferencialmente expressos entre exossomos das linhagens tumorais e não tumoral, 3 miRNAs são diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP, e 7 miRNAs são diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral PC-3. Por fim, mostrou a relação dos miRNAs alterados nos exossomos das linhagens tumorais de próstata com vias que regulam a apoptose e a proliferação celular, e a relação dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral independente de andrógeno PC-3 com importantes proteínas da via regulatória hippo.

6. DISCUSSÃO

Na última década o uso de miRNAs exossomais como biomarcadores de diagnóstico e progressão no câncer de próstata vêm sendo amplamente estudado (CORCORAN; RANI; O'DRISCOLL, 2014; FILELLA et al., 2016; FOJ et al., 2017; PANIGRAHI et al., 2018). Entretanto, quando comparados diferentes estudos frequentemente os resultados são contraditórios, pois utilizam diferentes tipos de amostras, métodos de isolamento e de avaliação da expressão gênica, bem como pacientes com diferentes estadios das doenças e tratamentos. Além destas diferenças, distinguir os exossomos liberados por células tumorais daqueles liberados por células não tumorais é um grande desafio. Com a finalidade de acrescentar novas informações que possam contribuir com a identificação dos exossomos derivados das células tumorais da próstata, este trabalho analisou a expressão de 2549 miRNAs em exossomos de 3 linhagens prostáticas e identificou 88 miRNAs com possível valor diagnóstico.

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram selecionadas em função das diferenças no perfil de resposta a andrógeno sendo que a linhagem não-tumoral de próstata RWPE-1 e a linhagem tumoral de próstata LNCaP são responsivas a andrógeno, enquanto a linhagem tumoral de próstata PC-3 não responde a andrógeno. Além desta característica, as três linhagens avaliadas também apresentam outras alterações que deverão ser levadas em consideração em estudos futuros de validação da expressão dos miRNAs exossomais em amostras biológicas como sangue e urina. A linhagem RWPE-1 é uma linhagem proveniente do epitélio prostático não tumoral e imortalizada com o papilomavírus humano 18 (HPV18). Além disso, esta linhagem produz PSA e responde a andrógenos (CUNNINGHAM; YOU, 2015).

A linhagem LNCaP é proveniente de uma metástase de adenocarcinoma encontrada no linfonodo, produz PSA e é responsiva a andrógenos (CUNNINGHAM; YOU, 2015). Esta linhagem apresenta uma mutação no gene do receptor de andrógeno que permite uma maior afinidade com outros compostos esteroidais além dos andrógenos, tais como estrógenos, progestágenos e antiandrógenos (VELDSCHOLTE et al., 1990).

A linhagem PC-3 é proveniente de uma metástase óssea, não produz PSA e não é responsiva a andrógenos apesar de expressar o receptor de andrógeno, estas características são semelhantes às encontradas em tumores de células neuroendócrinas pequenas

(ALIMIRAH et al., 2006; TAI et al., 2011). Este tipo de tumor é raro e extremamente agressivo, não responde as terapias hormonais comumente utilizadas e não é associado ao aumento dos níveis de PSA (NADAL et al., 2014). Entretanto, geralmente os tumores de células pequenas estão associados a adenocarcinomas, sendo mais comum em homens com câncer independente de andrógeno (10-20% dos casos). O diagnóstico inicial do câncer de células pequenas da próstata é importante pois a decisão de tratamento é diferente dos casos de adenocarcinoma. Entretanto, a terapia do carcinoma de próstata de células pequenas ainda é baseada no carcinoma de pulmão de células pequenas devido à falta de informações sobre a biologia deste tumor (PALMGREN; KARAVADIA; WAKEFIELD, 2007).

Diante do panorama sobre as características celulares analisadas neste trabalho, o perfil de miRNAs exossomais das três linhagens de próstata foi determinado. Para isto, foram isoladas vesículas do sobrenadante das culturas celulares. As vesículas isoladas foram avaliadas em relação ao tamanho e morfologia, a fim de verificar as respectivas identidades. Os resultados obtidos nas análises de MET e DLS indicam a presença majoritária de exossomos, uma vez que o diâmetro observado é característico de exossomos obtidos por ultracentrifugação (30-150nm) (COLOMBO et al., 2013), enquanto que para as microvesículas o diâmetro característico é entre 100 e 350 nm (LI et al., 2017) (Figura 8). Esta análise também permitiu avaliar a distribuição do tamanho das vesículas, cujos valores de Pdi obtidos variaram entre 0,132 e 0,144 (Figura 8). Este resultado indica que as amostras apresentam distribuição de tamanho uniforme, uma vez que os valores de Pdi variam de 0,0 (perfeitamente uniforme) a 1,0 (altamente disperso). Esta análise levou em consideração a faixa de valores considerada homogênea para amostras de lipossomas (vesículas lipídicas - Pdi < 0,3) (DANAEI et al., 2018), uma vez que para exossomos esta discussão ainda não foi levantada. Além disso, nas imagens de MET é possível observar vesículas com aparência *cup-shaped* devido ao grande contraste na periferia e no centro. Esta aparência côncava é um artefato devido ao encolhimento da vesícula durante a fixação, uma vez que quando analisado em criomicroscopia eletrônica os exossomos apresentam formato arredondado (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013), características já bem estabelecidas na literatura.

Exossomos isolados destas três linhagens foram anteriormente descritos por Hosseini-Beheshti e colaboradores em 2012. Este estudo realizou o isolamento de exossomos das linhagens de próstata PC-3,

DU145, VCaP, LNCaP, C4-2 e RWPE-1 por meio de ultracentrifugação com gradiente de sacarose obtendo vesículas arredondadas com diâmetro entre 30 e 100 nm. Recentemente, utilizando a mesma metodologia, este grupo de pesquisa isolou exossomos das linhagens LNCaP e DU145 com diâmetro entre 30 e 200 nm (HOSSEINI-BEHESHTI et al., 2016). Em ambos os trabalhos a identidade dos exossomos foi confirmada avaliando também a presença de marcadores específicos, tais como: proteínas de choque térmico 70 e 90 (HSP70 e HSP90, do inglês *heat shock protein*), CD9, CD63, Rab5, Alix (do inglês, *ALG-2-interacting protein X*) e LAMP2 (do inglês *Lysosome-associated membrane protein 2*). Levando em consideração o protocolo utilizado para o isolamento, os dados publicados na literatura, a morfologia e tamanho das vesículas obtidas, é plausível inferir que a população de vesículas obtidas neste trabalho, cujos tamanhos variaram de 50 a 300 nm (Figura 8), é composta majoritariamente por exossomos, com uma pequena contaminação por microvesículas, já que os tamanhos dos dois tipos de estruturas sobrepõem-se.

Além disso, o perfil de RNA exossomal aqui encontrado mostra a presença majoritária de pequenos RNAs (< 250 nt) (Figura 9). Este resultado está de acordo com o descrito na literatura para exossomos obtidos de diferentes linhagens celulares, incluindo de câncer de próstata e de soro de pacientes com a doença (HELWA et al., 2017; HESSVIK et al., 2012; VALADI et al., 2007). Jenjaroenpun e colaboradores (2013) mostraram a presença dos RNAs ribossomais 18S e 28S nos exossomos utilizando sequenciamento de nova geração mesmo com a ausência dos picos nos eletroferogramas. Embora os resultados encontrados neste estudo estejam de acordo com a literatura, possíveis diferenças em relação à presença dos rRNAs nos exossomos podem ser resultantes dos diferentes métodos de isolamento disponíveis, dos distintos tipos celulares/amostras, da contaminação com outras vesículas extracelulares ou ainda pela presença de uma subpopulação de exossomos com um perfil diferente de RNA (WILLMS et al., 2016).

Os dados do perfil de expressão de miRNAs obtidos pela técnica de microarranjo mostraram uma interessante diferença no perfil de expressão dependendo da origem, dos exossomos ou das células. Foram identificados miRNAs únicos nos exossomos e uma baixa correlação entre os exossomos e as células correspondentes (Figuras 10 e 11). Os nossos dados, assim como outros estudos mostram uma baixa correlação entre o perfil encontrado nos exossomos e nas células (GUDURIC-FUCHS et al., 2012; MITTELBRUNN et al., 2011). Sabe-se que miRNAs

específicos são direcionados para os exossomos e nem todos os miRNAs celulares são incorporados nos exossomos. Entretanto, os mecanismos que controlam a seleção e direcionamento dos miRNAs ainda não foram totalmente elucidados. Até o momento, sabe-se que o direcionamento dos miRNAs está relacionado a via dependente de esfingomielinase neutra 2 (nSMase2, do inglês *neutral sphingomyelinase 2*), a via dependente de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRPs, do inglês *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), ao complexo RISC e também com modificações na região 3' do miRNA (FRANK; SONENBERG; NAGAR, 2010; KOPPERS-LALIC et al., 2014; KOSAKA et al., 2013; VILLARROYA-BELTRI et al., 2013).

Além disso, a análise do perfil de miRNAs obtida no microarranjo identificou 88 miRNAs diferencialmente expressos ($FC > 2$ e $p < 0,001$), sendo que 14 miRNAs foram identificados na análise entre exossomos de células tumorais e não-tumorais, e 83 miRNAs identificados na análise comparativa entre o os exossomos de cada linhagem (Figuras 12, 14 e 15). Destes, 18 miRNAs foram selecionados para a validação da expressão por RT-qPCR. A validação da expressão dos dados de microarranjo é importante para garantir resultados confiáveis e reprodutíveis, uma vez que podem variar conforme a plataforma utilizada. Embora a validação por RT-qPCR seja a metodologia mais indicada, a escolha do gene de referência é crucial para os dados de expressão relativa, podendo também gerar resultados incorretos (VANDESOMPELE et al., 2002). Neste sentido, estudos vêm buscando identificar miRNAs com expressão estável em diferentes condições. ZHAO e colaboradores (2018) identificaram que a combinação do miR-16 e do miR-1228-3p é adequada para a normalização da expressão das linhagens de câncer de próstata PC-3, DU-145, LNCaP e 22RV1. Neste trabalho, apesar destes miRNAs estarem presentes nos exossomos, não apresentaram bons valores de estabilidade. Portanto, a escolha dos genes de referência foi realizada com base nos valores de estabilidade calculados a partir dos dados de intensidade obtidos no microarranjo (Figura 16).

Na etapa de validação, 15 dos 18 miRNAs analisados apresentaram expressão diferencial entre as amostras ($FC > 2$ e $p < 0,05$), sendo que 11 apresentaram perfis de expressão semelhantes e 4 perfis diferentes do encontrado na análise de microarranjo. Diferenças entre os resultados obtidos no microarranjo e RT-qPCR são descritas na literatura, uma vez que as metodologias de detecção são muito diferentes e ambas com várias etapas determinantes que podem influenciar os resultados, tais

como hibridização incorreta, eficiência e especificidade dos iniciadores e normalização dos dados (MOREY; RYAN; VAN DOLAH, 2006).

Entre os miRNAs alterados comparando aqueles oriundos dos exossomos das linhagens tumorais e da linhagem não tumoral, foram validados dois miRNAs com expressão diminuída (miR-205-5p e miR-6893-5), e 3 miRNAs com expressão aumentada (miR-125b-5p, miR-148a-3p e miR-4286) (Figura 17). Segundo a literatura, o miR-205-5p atua como um supressor tumoral na próstata reduzindo a migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal (GANDELLINI et al., 2009, 2012; NORDBY et al., 2017; WATAHIKI et al., 2011). A expressão deste miRNA é menor nos tecidos epiteliais tumorais de próstata comparado ao epitélio normal, o mesmo perfil de expressão é encontrado em linhagens de câncer de próstata (GANDELLINI et al., 2009; HESSVIK et al., 2012; KRISTENSEN et al., 2016; WANG et al., 2013). Neste trabalho foi demonstrado que a expressão do miR-205 está diminuída nos exossomos das linhagens de câncer de próstata. Essa diminuição também foi descrita em amostras de urina e plasma de pacientes com câncer de próstata (GHORBANMEHR et al., 2019; GUO et al., 2018).

Quanto ao miR-6893-5p, neste estudo foi demonstrado que a sua expressão está diminuída nos exossomos das linhagens tumorais de próstata. Entretanto não foram encontrados relatos na literatura que descrevem a relação deste miRNA com o câncer de próstata. Estudos mostram que este miRNA está diminuído em amostras de soro de pacientes com câncer de pâncreas e do trato biliar (KOJIMA et al., 2015) e aumentado em exossomos de células tronco tumorais de glioma (TÚZESI et al., 2017).

Em relação ao miR-125b-5p, existem divergências na literatura, sendo que alguns estudos mostram uma expressão diminuída no câncer de próstata quando analisado amostras de tumor e linhagens celulares (BUDD et al., 2015; PORKKA et al., 2007; TONG et al., 2009), enquanto outros mostram a expressão aumentada (SHI et al., 2007). Este miRNA atua como um supressor tumoral inibindo a expressão do receptor ErbB2, e durante a tumorigênese do câncer de próstata, cuja diminuição permite um aumento da expressão do receptor ErbB (BUDD et al., 2015). Entretanto, o miR-125b-5p também é descrito como um *oncomir* por modular a via de sinalização de p53 inibindo a apoptose (AMIR et al., 2013). Neste estudo a expressão do miR-125-5p está aumentada nos exossomos das linhagens tumorais de câncer de próstata. O mesmo perfil de expressão também foi encontrado no soro de pacientes com câncer de próstata (MITCHELL et al., 2008).

Neste estudo, a expressão do miR-148a-3p está aumentada nos exossomos das linhagens tumorais de câncer de próstata. Segundo a literatura o miR-148a-3p é andrógeno responsivo e está relacionado ao aumento da proliferação das células no câncer, estando mais expresso em amostras de tumor de pacientes com câncer de próstata (JALAVA et al., 2012; MURATA et al., 2010; SZCZYRBA et al., 2010). A expressão deste miRNA também está aumentada no soro de pacientes com câncer de próstata (DYBOS et al., 2018). Já, a expressão do miR-4286, neste estudo, foi apresentada como aumentada nos exossomos das linhagens tumorais de próstata. Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura que descrevem a relação deste miRNA com o câncer de próstata. Por outro lado, estudos mostram que este miRNA está diminuído em amostras de sangue de pacientes com seminoma (RUF et al., 2014) e aumentado no soro de pacientes com adenocarcinoma de esôfago com pior prognóstico (ZHAI et al., 2015).

Entre os miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP, estão os seguintes miRNAs: miR-141-3p, miR-328-5p e miR-7845-5p (Figura 18). Já a expressão do miR-141-3p, neste estudo, apresentou-se aumentada nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP. Entretanto, parece não existir um consenso sobre a regulação do miR-141-3p no câncer de próstata. Relatos na literatura mostram que este miRNA está mais expresso no soro de pacientes com câncer de próstata (MITCHELL et al., 2008), mais expresso em pacientes metastáticos em comparação àqueles com tumor localizado (AGAOGU et al., 2011; BRASE et al., 2011; BRYANT et al., 2012) e menos expresso em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata (FREDSØE et al., 2018). Além disso, outros trabalhos mostram que o miR-141-3p está diminuído em linhagens de câncer de próstata andrógeno-independente em comparação com a linhagem não tumoral (HESSVIK et al., 2012; LYNCH et al., 2016), assim como em carcinomas independentes de andrógeno (PORKKA et al., 2007). Ainda, a expressão aumentada do miR-141-3p está associada a fenótipos epiteliais e diminuída a fenótipos mesenquimais (LIU et al., 2017), pois tem como alvo o fator de transcrição *Zeb1/2*, reprimindo a transição epitélio-mesenquimal (BRACKEN et al., 2009). A transição epitélio-mesenquimal promovida pela baixa expressão do miR-141-3p no câncer de próstata está associada ao aumento da expressão do miR-424-5p (BANYARD et al., 2013).

Neste estudo a expressão do miR-328-5p está aumentada nos exossomos da linhagem LNCaP. Lodes e colaboradores (2009) mostraram que este miRNA está aumentado no soro de pacientes com

câncer de próstata grau 3 e 4, porém não relacionou com a responsividade a hormônio destes tumores. Quando transfectado em tumores derivados da linhagem PC-3, o miR-328-5p atua inibindo o crescimento do tumor através da regulação da expressão da proteína cinase 6 ativada por p21 (PAK6, do inglês *p21 - activated protein kinase 6*) (LIU et al., 2015a). Por fim, o miR-7845-5p apresentou expressão aumentada nos exossomos da linhagem LNCaP. A função e perfil de expressão deste miRNA ainda não está elucidada, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura.

Entre os miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral PC-3, estão os seguintes miRNAs: miR-24-3p, miR-27a-3p, miR29b-3p, miR-183-5p, miR-195-5p, miR-424-5p e miR-425-5p (Figura 17, 18 e 19). Neste estudo a expressão do miR-24-3p está aumentada nos exossomos da linhagem PC-3. Segundo a literatura a diminuição da expressão do miR-24-3p na urina está relacionada a presença do câncer de próstata (FREDSØE et al., 2018, 2019), porém estudos mostram que essa diferença não é encontrada em amostras de soro (COCHETTI et al., 2016). Outros estudos mostram que o miR-24-3p atua como supressor tumoral na linhagem PC-3 inibindo a migração, invasão e proliferação via regulação da proteína p130Cas (KANG et al., 2017). O miR-24 é transcrito juntamente com o miR-23a e o miR-27a como um *cluster*. O miR-27a-3p também está aumentado nos exossomos da linhagem PC-3. Este miRNA está aumentado em amostras de tecido e soro de pacientes com câncer de próstata, além de correlacionar com o mau prognóstico da doença (GAO et al., 2018). Além disso, estudos mostram que o miR-27a-3p atua como um *oncomir* nas células de próstata por meio da regulação dos supressores tumorais SPRY2 e proibitina (PHB) (FLETCHER et al., 2012; GAO et al., 2018).

Neste estudo, ainda foi demonstrado que o miR-29b-3p apresenta expressão aumentada nos exossomos da linhagem PC-3. Por outro lado, foi mostrado que a expressão deste miRNA está diminuída em amostras de tecido de câncer de próstata (NISHIKAWA et al., 2014; ZHU et al., 2018). Além disso, o miR-29b-3p atua como supressor tumoral diminuindo a migração e invasão celular (NISHIKAWA et al., 2014; RU et al., 2012). Não foram encontrados relatos que descrevem o perfil de expressão do miR-29b-3p em amostras de urina, soro e plasma de pacientes com câncer de próstata.

Neste trabalho, a expressão do miR-183-5p apresentou-se aumentada nos exossomos da linhagem PC-3. A função e perfil de expressão deste miRNA ainda não está elucidada, uma vez que não foram

encontrados relatos na literatura. Em relação ao miR-195-5p, neste estudo foi demonstrado que a expressão deste miRNA está aumentada nos exossomos da linhagem PC-3. O aumento nos níveis de expressão do miR-195-5p no soro já foi relacionado à presença do câncer de próstata localizado (MAHN et al., 2011). Além disso, estudos mostram que este miRNA atua como supressor tumoral e tem a expressão diminuída nas linhagens de câncer de próstata PC-3 e DU145, sendo que a superexpressão leva a regulação da expressão da proteína rica em prolina 11 (PRR11) e de Fra-1 (CAI et al., 2018; WU et al., 2015).

O miR-424-5p é um oncogene que regula a ativação não canônica de STAT3 (fator de transcrição ativado por tirosina cinase 3) via inibição de *COP1* (gene que codifica a proteína ligase de ubiquitina 3) em tumores deficientes do fator de transcrição ETS ESE3/EHF (DALLAVALLE et al., 2016). Recentemente o miR-424-5p foi relacionado com a promoção da transição epitélio-mesenquimal e o fenótipo metastático em um subclone da linhagem DU145 (BANYARD et al., 2013). Além disso, este miRNA encontra-se aumentado em tecidos de câncer de próstata (DALLAVALLE et al., 2016).

Em relação ao miR-425-5p, as funções e perfil de expressão ainda não estão bem elucidadas, com poucos relatos na literatura. No entanto, o miR-425-5p foi relacionado com o câncer gástrico (ZHANG et al., 2017), com o carcinoma de células escamosas do esôfago (LIU et al., 2015b), carcinoma hepatocelular (FANG et al., 2017) e com o melanoma (LIU et al., 2015c).

Para entender melhor a relação dos miRNAs alterados com o câncer de próstata foram realizadas análises de bioinformática que auxiliaram na seleção dos miRNAs a serem validados bem como na identificação de mecanismos importantes relacionados a linhagem PC-3. Para esta análise foi utilizada a base de dados KEGG, pois esta ferramenta facilita o entendimento ao permitir a visualização das interações de várias moléculas descritas em estudos de sequenciamento. Entretanto, ainda são poucas as interações referentes aos miRNAs, por isso, em associação foi utilizada a base de dados Diana mirPath. Esta base de dados permitiu a identificação de mRNAs regulados pelos miRNAs de interesse e a combinação das informações das duas bases de dados foi utilizada para a elaboração das imagens de enriquecimento de vias KEGG (Figuras 13 e 20). Segundo esta análise, os miRNAs alterados nos exossomos da linhagem PC-3 estão relacionados com um grande número de genes da via hippo (Figura 19). A via de sinalização hippo, por sua vez está relacionada à regulação do crescimento dos tecidos, através da modulação

da proliferação, diferenciação e migração celular (MENG; MOROISHI; GUAN, 2016). Alterações genéticas nos fatores de transcrição YAP/TAZ-TEAD que fazem parte desta via estão relacionadas a transformações oncogênicas em diferentes tumores (PAN, 2010). Além disso, esta via tem sido descrita por promover a proliferação celular independente de andrógeno através da interação com o receptor de andrógenos. Por outro lado, sabe-se que na privação de andrógenos, a sinalização Wnt facilita a fosforilação da proteína LAST1 via GSK-3 β estimulando a translocação do receptor de andrógeno e YAP para o núcleo e consequentemente aumentando a proliferação celular (AZZOLIN et al., 2012; KUSER-ABALI et al., 2015; POWZANIUK et al., 2004; SEO et al., 2017). Neste sentido, estudos mostram que os níveis de YAP estão correlacionados com o escore de Gleason e com os níveis de PSA em pacientes com câncer de próstata (SHENG et al., 2015).

Portanto, pode-se dizer que os dados obtidos neste estudo estão em consonância com a literatura, pois foi demonstrado que os miRNAs exossomais da linhagem PC-3 regulam a expressão dos receptores de Wnt, da cinase GSK3, do fator de transcrição YAP e da proteína LATS1, indicando um possível mecanismo de regulação da proliferação independente de andrógeno (Figura 20). Visto que todos os miRNAs alterados nos exossomos da linhagem PC-3 estão relacionados com a via hippo e que esta via está relacionada a proliferação independente de andrógeno, pode-se sugerir que este painel de miRNAs pode ser utilizado em estudos futuros como biomarcador de diagnóstico e progressão do câncer de próstata independente de andrógeno. Além disso, uma vez que a expressão da YAP está aumentada no câncer de próstata, pode ser interessante o desenvolvimento de inibidores da atividade da YAP utilizando terapias baseadas em RNA de interferência (*mimics* ou *antagomirs*).

De maneira geral, assim como a dosagem de PSA apresenta um grande número de falso-positivos e falso-negativos, a expressão alterada de um único miRNA pode não ser suficiente para identificar ou classificar o câncer de próstata, uma vez que o câncer é uma doença complexa que pode ser originada e mantida por uma variedade de mecanismos moleculares. Sendo assim, o uso de um painel de miRNAs pode aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção do câncer de próstata. Além disso, atualmente a biópsia do tumor é o único método diagnóstico definitivo e novas metodologias não invasivas são de grande importância na clínica. Neste sentido, os exossomos vêm sendo estudados pois podem ser isolados de diversos fluidos biológicos como sangue e urina, além de

protegerem os miRNAs da degradação. Portanto, a identificação de um painel de miRNAs diferenciais entre os exossomos das linhagens analisadas neste estudo evidencia a relevância clínica do uso dos miRNAs exossomais como biomarcadores para identificar pacientes com câncer de próstata.

7. CONCLUSÕES

Baseados nos principais resultados listados abaixo,

- Os resultados apresentados mostram que os exossomos das linhagens de próstata RWPE-1, LNCaP e PC-3 apresentam perfis distintos de miRNAs;
- Foram identificados 88 miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos das três linhagens na análise de microarranjo;
- A validação da expressão por RT-qPCR confirmou que os miRNAs miR-205-5p, miR-6893-5p, miR-125b-5p, miR-148a-3p e miR-4286 estão diferencialmente expressos entre exossomos das linhagens tumorais e da linhagem não tumoral;
- A validação da expressão por RT-qPCR confirmou que os miRNAs miR-141-3p, miR-328-5p e miR-7845-5p estão diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP;
- A validação da expressão por RT-qPCR confirmou que os miRNAs miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-183-5p, miR-195-5p, miR-424-5p e miR-425-5p estão diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral PC-3;
- O painel de 15 miRNAs identificados na análise de RT-qPCR apresenta potencial para aplicação em estudos clínicos;

pode-se concluir que este estudo mostrou a relação dos miRNAs alterados nos exossomos da linhagem tumoral independente de andrógeno PC-3 com importantes proteínas da via regulatória hippo, sugerindo que estes miRNAs podem estar relacionados com a aquisição ou manutenção do fenótipo andrógeno independente.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análises de expressão dos miRNAs identificados neste estudo em amostras de plasma e/ou urina de pacientes diagnosticados com diferentes tipos de câncer de próstata e com hiperplasia benigna da próstata;
- Validar a regulação entre miRNA-mRNA dos genes identificados na análise de enriquecimento de vias KEGG;
- Avaliar o perfil de expressão nas células RWPE-1, LNCaP e PC-3 a fim identificar os miRNAs alterados;
- Desenvolver inibidores da atividade da YAP utilizando estratégias baseadas em RNA de interferência (*mimics* ou *antagomirs*).

REFERÊNCIAS

- ABUSAMRA, A. J. et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 2, p. 169–173, 2005.
- AGAOGU, F. Y. et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. **Tumor Biology**, v. 32, p. 583–588, 2011.
- ALIMIRAH, F. et al. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. **FEBS Letters**, v. 580, n. 9, p. 2294–2300, 17 abr. 2006.
- AMIR, S. et al. Oncomir miR-125b Suppresses p14ARF to Modulate p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis in Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61064, 9 abr. 2013.
- ANASTASIADOU, E.; JACOB, L. S.; SLACK, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 5–18, 24 nov. 2017.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 1 ago. 2004.
- ARORA, R. et al. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. **Cancer**, v. 100, n. June 1, p. 2362–2366, 2004.
- AZZOLIN, L. et al. Role of TAZ as Mediator of Wnt Signaling. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1443–1456, 21 dez. 2012.
- BANYARD, J. et al. Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.
- BARBIERI, C. E. et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 685–689, 20 jun. 2012.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.

BAZINET, M. et al. Prognostic significance of antigenic heterogeneity, gleason grade, and ploidy of lymph node metastases in patients with prostate cancer. **The Prostate**, v. 20, n. 4, p. 311–326, 1992.

BELL, K. J. L. et al. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. **International journal of cancer**, v. 137, n. 7, p. 1749–1757, 2015.

BISHOP, J. et al. The Multifaceted Roles of STAT3 Signaling in the Progression of Prostate Cancer. **Cancers**, v. 6, n. 2, p. 829–859, 9 abr. 2014.

BOOKSTEIN, R. et al. p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. **Cancer research**, v. 53, n. 14, p. 3369–73, 15 jul. 1993.

BOSTWICK, D. G. et al. Human Prostate Cancer Risk Factors. **Cancer**, v. 101, n. 10, p. 2371–490, 2004.

BRACKEN, C. P. et al. The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 10, p. 1682–1699, 20 maio 2009.

BRASE, J. C. et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 3, p. 608–616, 2011.

BRYANT, R. et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 106, p. 768–774, 2012.

BUDD, W. T. et al. Dual Action of miR-125b As a Tumor Suppressor and OncomiR-22 Promotes Prostate Cancer Tumorigenesis. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0142373, 2015.

BUYOUNOUSKI, M. K. et al. Prostate Cancer— Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 4, p. 245–253, 2017.

CAI, C. et al. miR-195 inhibits cell proliferation and angiogenesis in human prostate cancer by downregulating PRR11 expression. **Oncology reports**, v. 39, n. 4, p. 1658–1670, abr. 2018.

CANBY-HAGINO, E. et al. Prostate Cancer Risk with Positive Family History, Normal Prostate Examination Findings, and PSA Less Than 4.0 ng/mL. **Adult Urology**, v. 70, n. 4, p. 0–4, 2007.

CARTER, H. B.; COUZENS, G. S. **The whole life prostate book : everything that every man-at every age-needs to know about maintaining optimal prostate health.** [s.l: s.n.].

CARVER, B. S. et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. **Cancer Cell**, v. 19, n. 5, p. 575–586, 17 maio 2011.

CECH, T. R.; STEITZ, J. A. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 77–94, 27 mar. 2014.

CHENG, L. et al. Staging of prostate cancer. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 87–117, 2012.

CHI, S. W. et al. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA–mRNA interaction maps. **Nature**, v. 460, n. 7254, p. 479–486, 17 jul. 2009.

CHOWDHURY, R. et al. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 715–31, 20 jan. 2015.

COCHETTI, G. et al. Different levels of serum microRNAs in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: evaluation of potential diagnostic and prognostic role. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 7545–7553, 2016.

COLOMBO, M. et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 24, p. 5553–5565, 15 dez. 2013.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 255–292, 2014.

CORCORAN, C. et al. Docetaxel-Resistance in Prostate Cancer: Evaluating Associated Phenotypic Changes and Potential for Resistance Transfer via Exosomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

CORCORAN, C.; RANI, S.; O'DRISCOLL, L. miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. **The Prostate**, v. 74, n. 13, p. 1320–1334, 1 set. 2014.

COSTA-SILVA, B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature cell biology**, v. 17, n. 6, 2015.

CULIG, Z.; SANTER, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 413–427, 3 set. 2014.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, 2004.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of biological methods**, v. 2, n. 1, 2015.

DALLAVALLE, C. et al. MicroRNA-424 impairs ubiquitination to activate STAT3 and promote prostate tumor progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 12, p. 4585–4602, 2016.

DANAELI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 18 maio 2018.

DO AMARAL, A. E. et al. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 274–287, fev. 2018.

DURAND, X. et al. Progenesa™ PCA3 test for prostate cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 2, p. 137–144, 9 mar. 2011.

DYBOS, S. A. et al. Increased levels of serum miR-148a-3p are associated with prostate cancer. **APMIS**, v. 126, n. 9, p. 722–731, 1 set. 2018.

EASTHAM, J. A. et al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 1, n. 10, p. 1111–8, 1 out. 1995.

ECKE, T. H. et al. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. **Anticancer research**, v. 30, n. 5, p. 1579–86, 1 maio 2010.

EPSTEIN, J. I. et al. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. **JAMA**, v. 271, n. 5, p. 368–74, 2 fev. 1994.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–874, 1 dez. 2011.

ETZIONI, R. et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 13, p. 981–90, 2002.

FANG, F. et al. MiR-425-5p promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through SCAI-mediated dysregulation of multiple signaling pathways. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 31745–31757, 9 maio 2017.

FILELLA, X. et al. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1784, 26 out. 2016.

FLETCHER, C. E. et al. Androgen-regulated processing of the oncomir MiR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 14, p. 3112–3127, 2012.

FOJ, L. et al. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. **The Prostate**, v. 77, n. 6, p. 573–583, 1 maio 2017.

FRANK, F.; SONENBERG, N.; NAGAR, B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 818–822, 26 jun. 2010.

FREDSØE, J. et al. Diagnostic and Prognostic MicroRNA Biomarkers for Prostate Cancer in Cell-free Urine. **European Urology Focus**, v. 4, n. 6, p. 825–833, 1 dez. 2018.

FREDSØE, J. et al. Independent Validation of a Diagnostic Noninvasive 3-MicroRNA Ratio Model (uCaP) for Prostate Cancer in Cell-Free Urine. **Clinical Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 540–548, abr. 2019.

FU, D. et al. MiR-631/ZAP70: a novel axis in the migration and invasion of prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, 2015.

GANDELLINI, P. et al. miR-205 Exerts Tumor-Suppressive Functions in Human Prostate through Down-regulation of Protein Kinase C. **Cancer Research**, v. 69, n. 6, p. 2287–2295, 15 mar. 2009.

GANDELLINI, P. et al. miR-205 regulates basement membrane deposition in human prostate: implications for cancer development. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 11, p. 1750–1760, 2012.

GAO, W. et al. miR-27a in serum acts as biomarker for prostate cancer detection and promotes cell proliferation by targeting Sprouty2. **Oncology letters**, v. 16, n. 4, p. 5291–5298, out. 2018.

GHORBANMEHR, N. et al. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. **The Prostate**, v. 79, n. 1, p. 88–95, 1 jan. 2019.

GREEN, S. M.; MOSTAGHEL, E. A.; NELSON, P. S. Androgen action and metabolism in prostate cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 360, n. 1–2, p. 3–13, 5 set. 2012.

GUAY, C.; REGAZZI, R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 9, n. 9, p. 513–21, 2013.

GUAZZONI, G. et al. Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA Significantly Improves the Prediction of Prostate Cancer at Initial Extended Prostate Biopsies in Patients with Total PSA Between 2.0 and 10 ng/ml: Results of a Prospective Study in a Clinical Setting. **European Urology**, v. 60, n. 2, p. 214–222, ago. 2011.

GUDURIC-FUCHS, J. et al. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. **BMC genomics**, v. 13, p. 357, 1 ago. 2012.

GUO, C. C. et al. Prostate cancer of transition zone origin lacks TMPRSS2–ERG gene fusion. **Modern Pathology**, v. 22, n. 7, p. 866–871, 24 jul. 2009.

GUO, X. et al. Five microRNAs in serum as potential biomarkers for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention. **International Urology and Nephrology**, v. 50, n. 12, p. 2193–2200, 15 dez. 2018.

GUZEL, E. et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 4, p. 875–879, 2015.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 2, p. 329–339, 1983.

HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent - Update 2013. **European Urology**, v. 65, n. 1, p. 124–137, 2014.

HELWA, I. et al. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. **PLoS one**, v. 12, n. 1, p. e0170628, 2017.

HESSVIK, N. P. et al. Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 11–12, p. 1154–1163, 2012.

HIENTZ, K. et al. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8921–8946, 31 jan. 2017.

HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329–35, 2015.

HOSSEINI-BEHESHTI, E. et al. Exosomes as Biomarker Enriched Microvesicles: Characterization of Exosomal Proteins Derived from a Panel of Prostate Cell Lines with Distinct AR Phenotypes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 863–885, 2012.

HOSSEINI-BEHESHTI, E. et al. Exosomes confer pro-survival signals to alter the phenotype of prostate cells in their surrounding environment. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 14639–14658, 2016.

HUELSKEN, J.; BEHRENS, J. The Wnt signalling pathway. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 21, p. 3977–8, 1 nov. 2002.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER. **Estimativa 2016**. [s.l.:

s.n.].

JALAVA, S. E. et al. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 41, p. 4460–4471, 23 out. 2012.

JARDIN, F.; FIGEAC, M. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 5, p. 480–6, set. 2013.

JENJAROENPUN, P. et al. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. **PeerJ**, v. 1, p. e201, 2013.

KALISH, L. A.; MCDUGAL, W. S.; MCKINLAY, J. B. Family history and the risk of prostate cancer. **Urology**, v. 56, n. 5, p. 803–806, 1 nov. 2000.
KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.

KANG, H. et al. The MIR-24-3p/p130Cas: A novel axis regulating the migration and invasion of cancer cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2017.

KANG, S.-M.; LEE, H.-J. MicroRNAs in human lung cancer. **Experimental biology and medicine**, v. 239, n. 11, p. 1505–13, nov. 2014.

KARLSSON, T. et al. Tumor Cell-Derived Exosomes from the Prostate Cancer Cell Line TRAMP-C1 Impair Osteoclast Formation and Differentiation. **PLoS one**, v. 11, n. 11, p. e0166284, 2016.

KHEIRANDISH, P.; CHINEGWUNDOH, F. Ethnic differences in prostate cancer. **British journal of cancer**, v. 105, n. 4, p. 481–5, 9 ago. 2011.

KOJIMA, M. et al. MicroRNA Markers for the Diagnosis of Pancreatic and Biliary-Tract Cancers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

KOPPERS-LALIC, D. et al. Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. **Cell Reports**, v. 8, n. 6, p. 1649–1658, 25 set. 2014.

KOSAKA, N. et al. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell

Metastasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 15, p. 10849–10859, 12 abr. 2013.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 8 jan. 2019.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D68–D73, 1 jan. 2014.

KRISTENSEN, H. et al. Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling. **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 30760–30771, maio 2016.

KUSER-ABALI, G. et al. YAP1 and AR interactions contribute to the switch from androgen-dependent to castration-resistant growth in prostate cancer. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8126, 1 nov. 2015.

LE, B. V. et al. [-2]Proenzyme prostate specific antigen is more accurate than total and free prostate specific antigen in differentiating prostate cancer from benign disease in a prospective prostate cancer screening study. **The Journal of Urology**, v. 183, n. 4, p. 1355–1359, 1 abr. 2010.

LEE, S. H. et al. Crosstalk between androgen and PI3K/AKT signaling pathways in prostate cancer cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 5, p. 2759–68, 30 jan. 2015.

LI, P. et al. Progress in Exosome Isolation Techniques. **Theranostics**, v. 7, n. 3, p. 789–804, 2017.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 6, p. 321–333, 2015.

LIU, C. et al. MicroRNA-328 directly targets p21-activated protein kinase 6 inhibiting prostate cancer proliferation and enhancing docetaxel sensitivity. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. 7389–7395, 1 nov. 2015a.

LIU, C. et al. MicroRNA-141 suppresses prostate cancer stem cells and metastasis by targeting a cohort of pro-metastasis genes. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–14, 2017.

LIU, L. et al. Enhanced Expression of miR-425 Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Tumorigenesis by Targeting SMAD2. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, n. 11, p. 601–611, 20 nov. 2015b.

LIU, P. et al. miR-425 inhibits melanoma metastasis through repression of PI3K-Akt pathway by targeting IGF-1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, p. 51–57, out. 2015c.

LIU, W. et al. Homozygous Deletions and Recurrent Amplifications Implicate New Genes Involved in Prostate Cancer. **Neoplasia**, v. 10, n. 8, p. 897–IN37, 1 ago. 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta Cq$) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LODES, M. J. et al. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6229, 14 jul. 2009.

LOEB, S. et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. **European Urology**, v. 65, n. 6, p. 1046–1055, 2014.

LONERGAN, P. E.; TINDALL, D. J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. **Journal of carcinogenesis**, v. 10, p. 20, 2011.

LV, L. L. et al. Isolation and quantification of MicroRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1021–1031, 2013.

LYNCH, S. M. et al. Regulation of miR-200c and miR-141 by Methylation in Prostate Cancer. **Prostate**, v. 76, n. 13, p. 1146–1159, 2016.

MACDONAGH, L. et al. The emerging role of microRNAs in resistance to lung cancer treatments. **Cancer treatment reviews**, v. 41, n. 2, p. 160–9, fev. 2015.

MAHN, R. et al. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. **Urology**, v. 77, n. 5, p. 1265.e9–1265.e16, 2011.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 2003.

MARTINS, V. R.; DIAS, M. S.; HAINAUT, P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 1, p. 66–75, 2013.

MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **The Prostate**, v. 2, n. 1, p. 35–49, 1981.

MELO, S. A. et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. **Nature**, 2015.

MENG, Z.; MOROISHI, T.; GUAN, K.-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes & development**, v. 30, n. 1, p. 1–17, 1 jan. 2016.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 10513–10518, 2008.

MITTELBRUNN, M. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

MONTIRONI, R. et al. Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital System. **European Urology**, v. 70, n. 1, p. 120–123, 2016.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C.; VAN DOLAH, F. M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biological procedures online**, v. 8, p. 175–93, 2006.

MURATA, T. et al. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 13, n. 10, p. 356–361, 2010.

NADAL, R. et al. Small cell carcinoma of the prostate. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 4, p. 213–219, 18 abr. 2014.

NISHIKAWA, R. et al. Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 1, p. 401–410, jul. 2014.

NORDBY, Y. et al. High miR-205 expression in normal epithelium is

associated with biochemical failure - an argument for epithelial crosstalk in prostate cancer? **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16308, dez. 2017.

OKUGAWA, Y.; TOIYAMA, Y.; GOEL, A. An update on microRNAs as colorectal cancer biomarkers: where are we and what's next? **Expert review of molecular diagnostics**, v. 14, n. 8, p. 999–1021, nov. 2014.

ØVERBYE, A. et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, 2015.

PALMGREN, J. S.; KARAVADIA, S. S.; WAKEFIELD, M. R. Unusual and Underappreciated: Small Cell Carcinoma of the Prostate. **Seminars in Oncology**, v. 34, n. 1, p. 22–29, fev. 2007.

PAN, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. **Developmental Cell**, v. 19, n. 4, p. 491–505, 19 out. 2010.

PANIGRAHI, G. K. et al. Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 17, p. 13894–13910, 2 mar. 2018.

PARK, I. H. et al. Identification and clinical implications of circulating microRNAs for estrogen receptor-positive breast cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 12, p. 12173–12180, 3 set. 2014.

PASQUIÉ, J. et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. **The New England Journal of Medicine**, p. 2373–2383, 2004.

PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD. **Prostate Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version**. [s.l.] National Cancer Institute (US), 2019.

PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature medicine**, v. 18, n. 6, p. 883–91, 2012.

PERALDO-NEIA, C. et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 31, 25 dez. 2011.

PORKKA, K. P. et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer.

Cancer Research, v. 67, n. 13, p. 6130–6135, 2007.

POURMAND, G. et al. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. **Urology journal**, v. 4, n. 2, p. 95–100, 2007.

POWZANIUK, M. et al. The LATS2/KPM Tumor Suppressor Is a Negative Regulator of the Androgen Receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 8, p. 2011–2023, 1 ago. 2004.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RAMALINGAM, S.; RAMAMURTHY, V. P.; NJAR, V. C. O. Dissecting major signaling pathways in prostate cancer development and progression: Mechanisms and novel therapeutic targets. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 166, p. 16–27, 1 fev. 2017.

RAPOSO, G. et al. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. March, p. 1161–1172, 1996.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RU, P. et al. miRNA-29b Suppresses Prostate Cancer Metastasis by Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 5, p. 1166–1173, 1 maio 2012.

RUF, C. G. et al. Small RNAs in the peripheral blood discriminate metastasized from non-metastasized seminoma. **Molecular cancer**, v. 13, p. 47, 6 mar. 2014.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular oncology (Dordrecht)**, v. 39, n. 2, p. 97–106, abr. 2016.

SALEM, O. et al. The Hippo Pathway in Prostate Cancer. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 370, 23 abr. 2019.

SEO, W. I. et al. Wnt signaling promotes androgen-independent prostate cancer cell proliferation through up-regulation of the hippo pathway effector

YAP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 4, p. 1034–1039, 13 maio 2017.

SHARMA, M.; CHUANG, W. W.; SUN, Z. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30935–41, 23 ago. 2002.

SHENG, X. et al. YAP is closely correlated with castration-resistant prostate cancer, and downregulation of YAP reduces proliferation and induces apoptosis of PC-3 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 4, p. 4867–4876, out. 2015.

SHI, X.-B. et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19983–19988, 11 dez. 2007.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SUH, J. et al. Mechanisms of constitutive NF- κ B activation in human prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 52, n. 3, p. 183–200, 1 ago. 2002.

SZCZYRBA, J. et al. The MicroRNA Profile of Prostate Carcinoma Obtained by Deep Sequencing. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 529–538, 1 abr. 2010.

TAFT, R. J. et al. Non-coding RNAs: regulators of disease. **The Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 126–139, 1 jan. 2010.

TAI, S. et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. **The Prostate**, v. 71, n. 15, p. 1668–1679, nov. 2011.

TAVAZOIE, S. F. et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. **Nature**, v. 451, n. January, p. 147–152, 2008.

TAYLOR, B. S. et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 11–22, 13 jul. 2010.

THAKUR, B. K. et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. **Cell research**, v. 24, n. 6, p. 766–9, 2014.

THÉRY, C. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 3.22.1-3.22.29, 2006.

THOMPSON, I. M. et al. The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 3, p. 215–224, 17 jul. 2003.

THOMPSON, I. M. et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 22, p. 2239–2246, 27 maio 2004.

TOMLINS, S. A. et al. The Role of SPINK1 in ETS Rearrangement-Negative Prostate Cancers. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 519–528, jun. 2008.

TOMLINS, S. A. et al. Characterization of 1577 Primary Prostate Cancers Reveals Novel Biological and Clinicopathologic Insights into Molecular Subtypes. **European Urology**, v. 68, n. 4, p. 555–567, out. 2015.

TONG, A W. et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. **Cancer gene therapy**, v. 16, n. 3, p. 206–216, 2009.

TÚZESI, Á. et al. Pediatric brain tumor cells release exosomes with a miRNA repertoire that differs from exosomes secreted by normal cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 52, p. 90164–90175, 27 out. 2017.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1, 18 jun. 2002.

VELDSCHOLTE, J. et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 173, n. 2, p. 534–40, 14 dez. 1990.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 7, p. 379–386, 2016.

VILLARROYA-BELTRI, C. et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 2980, 20 dez. 2013.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D153–D159, 28 jan. 2015a.

VLACHOS, I. S. et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W460-6, 1 jul. 2015b.

WANG, N. et al. miR-205 is frequently downregulated in prostate cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth. **Asian journal of andrology**, v. 15, n. 6, p. 735–41, nov. 2013.

WATAHIKI, A. et al. MicroRNAs Associated with Metastatic Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

WILLMS, E. et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22519, 2 abr. 2016.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228–34, mar. 2009.

WOODS IGNATOSKI, K. M. et al. The role of phosphatidylinositol 3'-kinase and its downstream signals in erbB-2-mediated transformation. **Molecular cancer research : MCR**, v. 1, n. 7, p. 551–60, 1 maio 2003.

WU, J. et al. MicroRNA-195-5p, a new regulator of Fra-1, suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells. **Journal of translational medicine**, v. 13, p. 289, 4 set. 2015.

ZHAI, R. et al. Whole-miRNome profiling identifies prognostic serum miRNAs in esophageal adenocarcinoma: the influence of Helicobacter pylori infection status. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 1, p. 87–93, jan. 2015.

ZHANG, L. et al. NF- κ B Regulates Androgen Receptor Expression and Prostate Cancer Growth. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 489–499, 1 ago. 2009.

ZHANG, Y.; YANG, Q.; WANG, S. MicroRNAs: a new key in lung cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 1105–1111, 19 ago. 2014.

ZHANG, Z. et al. Clinical value of miR-425-5p detection and its association with cell proliferation and apoptosis of gastric cancer. **Pathology - Research and Practice**, v. 213, n. 8, p. 929–937, 1 ago. 2017.

ZHAO, H. et al. Identification of valid reference genes for mRNA and microRNA normalisation in prostate cancer cell lines. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1949, 31 dez. 2018.

ZHONG, S. et al. MicroRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs in vinorelbine-resistant breast cancer cells. **Gene**, v. 556, n. 2, p. 113–118, 10 fev. 2015.

ZHU, C. et al. Expression of miR-30c and miR-29b in prostate cancer and its diagnostic significance. **Oncology Letters**, v. 16, n. 3, p. 3140–3144, 21 jun. 2018.

ZONG, Y.; GOLDSTEIN, A. S. Adaptation or selection - Mechanisms of castration-resistant prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 10, n. 2, p. 90–98, 2013.

ANEXO A – Estadiamento e descritores do câncer de próstata

Estadio	T extensão do tumor	N linfonodos	M metástase	PSA	Grau da ISUP
I	T1a-c, T2a	N0	M0	<10 ng/mL	1
	T2	N0	M0	<10 ng/mL	1
IIa	T1a-c, T2a	N0	M0	≥10, <20 ng/mL	1
	T2	N0	M0	≥10, <20 ng/mL	1
	T2b-c	N0	M0	<20 ng/mL	1
IIb	T1-2	N0	M0	<20 ng/mL	2
IIc	T1-2	N0	M0	<20 ng/mL	3
	T1-2	N0	M0	<20 ng/mL	4
IIIa	T1-2	N0	M0	≥20 ng/mL	1-4
IIIb	T3-4	N0	M0	Qualquer	1-4
IIIc	Qualquer	N0	M0	Qualquer	5
IVa	Qualquer	N1	M0	Qualquer	Qualquer
IVb	Qualquer	Qualquer	M1	Qualquer	Qualquer

Legenda: T1 – tumor clinicamente não aparente e não palpável; T1a – tumor diagnosticado por acaso e que não representa mais do que 5 % do tecido analisado; T1c – tumor diagnosticado por punção de agulha, mas não palpável; T2 – tumor é palpável e confinado a próstata; T2a – tumor ocupa a metade ou menos de um dos lados da próstata; T2b – tumor ocupa mais da metade de um dos lados da próstata; T2c – tumor ocupa ambos os lados da próstata; T3 – tumor extra-prostático que não invadiu estruturas adjacentes; T4 – tumor que invadiu

estruturas adjacentes; N0 – sem metástase nos linfonodos próximos; N1 – metástase nos linfonodos próximos; M0 – sem metástase distante; M1 – metástase distante.