



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Anne Natalie Prigol

Avaliação da influência de exossomos derivados de células tumorais de próstata em células endoteliais: potencial sinalização para angiogênese

Florianópolis
2019

Anne Natalie Prigol

Avaliação da influência de exossomos derivados de células tumorais de próstata em células endoteliais: potencial sinalização para angiogênese

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Farmácia.
Orientador: Prof.^a Dr.^a 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.

Prigol, Anne Natalie

Avaliação da influência de exossomos derivados de células tumorais de próstata em células endoteliais: potencial sinalização para angiogênese / Anne Natalie Prigol ; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, 2019.
81 p.

Dissertação (mestrado) - 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. 3. Angiogênese tumoral. 4. Exossomos. I. Pasa, Tânia Beatriz Creczynski . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Anne Natalie Prigol

Avaliação da influência de exossomos derivados de células tumorais de próstata em células endoteliais: potencial sinalização para angiogênese.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Maique Weber Biavatti
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Prof.^a Dr.^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Farmácia

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Orientadora

Florianópolis, 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vera Lucia e Valdir, pelo amor e apoio incondicionais;

À minha orientadora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela oportunidade e confiança em meu trabalho desde a iniciação científica;

À Michele Rode, pelos conhecimentos repassados, generosidade e paciência, essenciais para o desenvolvimento desta dissertação;

Aos colegas do Grupo de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM), que tornam o laboratório um local de trabalho tão acolhedor, propício a colaborações científicas e amizades;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) juntamente ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela oportunidade da vaga e suporte financeiro;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) e Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC) pelo uso de equipamentos e disponibilidade técnica;

Aos amigos que tornaram esta jornada mais leve e feliz;

À todos que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho, a minha gratidão.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no oceano. Mas o oceano seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O câncer de próstata é o quarto tipo de neoplasia mais comum no mundo e o mais incidente no Brasil, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. A evolução clínica da doença está relacionada com a transição da proliferação celular dependente para independente de andrógenos, o que resulta em pior prognóstico aos pacientes e resposta ineficaz à terapia existente. Esta transição na dependência hormonal tem sido associada ao aumento da vascularização do tumor. A formação de novos vasos, processo conhecido como angiogênese, é necessária para fornecer oxigênio e nutrientes às células, além de favorecer a disseminação para novos órgãos. Atualmente, sabe-se que exossomos são componentes importantes na comunicação entre células tumorais e o microambiente tumoral, e que a expressão anormal do conteúdo vesicular está relacionada a diversos estágios da progressão tumoral. Diante deste cenário, neste trabalho, exossomos derivados das linhagens celulares de câncer de próstata dependente de andrógeno (LNCaP) e independente de andrógeno (PC-3) foram isolados, caracterizados e os respectivos perfis de microRNAs (miRNAs) foram determinados pela técnica de microarranjo. Ao todo, 72 miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos das duas linhagens foram identificados. Análises bioinformática realizadas a partir de genes alvos dos miRNAs alterados indicaram que seis (miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-195-5p, miR-200c-3p, miR-424-5p) apresentam relação com desenvolvimento endotelial e angiogênese, e tiveram a expressão validada por RT-qPCR. Em seguida, a capacidade de internalização dos exossomos das duas linhagens por células endoteliais HUVEC foi constatada. Neste sentido, foi observada a influência dos exossomos, uma vez dentro das células endoteliais. Os resultados mostraram que as células endoteliais adquiriram um caráter invasivo acentuado e capacidade de formação de estruturas semelhantes a vasos mais características após exposição a 10 µg/mL de exossomos da linhagem PC-3, valor calculado após dosagem de proteína total das suspensões. Além disso, foi demonstrado que a exposição da linhagem HUVEC aos exossomos das linhagens PC-3 e LNCaP alterou a expressão dos miR-200c-3p e miR-424-5p, principalmente. Em conclusão, este estudo evidenciou o caráter invasivo e favorável a tubulogênese que células endoteliais adquirem quando expostas aos exossomos da linhagem independente de andrógenos PC-3, possivelmente mediado por miRNAs exossomais.

Palavras Chave: câncer de próstata, exossomos, angiogênese, miRNA

ABSTRACT

Prostate cancer is the fourth most common neoplasm in the world and the most incident in Brazil, just behind non-melanoma skin cancer. Clinical evolution of the disease is related to transition from androgen-dependent cell proliferation to androgen-independent, resulting in patients with poor prognosis and ineffective response to therapy. The hormone dependence transition has been associated with increased tumor vascularization, process known as angiogenesis. Formation of new blood vessels is necessary to supply oxygen and nutrients to cells, besides promoting tumor spread to new organs. Currently, it's known that exosomes are important components in communication between tumor cells and the tumoral microenvironment, and abnormal expression of vesicular content is related to several stages of tumor progression. In this study, exosomes derived from androgen dependent prostate cancer cell line (LNCaP) and androgen independent (PC-3) were isolated, characterized and the respective profiles of microRNAs (miRNAs) were determined by microarray. Altogether, 72 miRNAs differentially expressed among exosomes cell lines were identified. Bioinformatic analysis achieved from altered miRNA target genes indicated that six (miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-195-5p, miR-200c-3p, miR-424-5p) are related to endothelial development and angiogenesis. Validation of exosomal miRNAs expression and identification of regulated genes by altered miRNAs was achieved. Also, the uptake of exosomes by endothelial cells HUVEC was verified. Results indicated that vesicles influence on cell invasion and enhanced tube formation, showing that endothelial cells acquire a strong invasive character after exposure to 10 µg/mL of PC-3 exosomes, calculated value after protein dosage. Furthermore, it was demonstrated that exposure of HUVEC to exosomes derived from PC-3 and LNCaP cell lines altered the expression of miR-200c-3p and miR-424-5p. In conclusion, this study suggest the invasive character and ability to tube formation that endothelial cells acquire when exposed to exosomes derived from an androgen independent cell line, PC-3, possibly mediated by exosomal miRNAs.

Keywords: Prostate cancer, exosomes, angiogenesis, miRNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da próstata.....	20
Figura 2. Síntese de testosterona.	22
Figura 3. Estadiamento clínico do câncer de próstata.	25
Figura 4. Exossomos na comunicação extracelular e conteúdo intracelular.	29
Figura 5. Representação esquemática da biogênese de miRNA.	31
Figura 6. Vesículas isoladas do sobrenadante celular das linhagens LNCaP e PC-3.....	44
Figura 7. Eletroferogramas referentes ao RNA total obtido dos exossomos.	45
Figura 8. Clusterização hierárquica representando as diferenças na expressão de miRNAs entre os exossomos derivados das linhagens LNCaP e PC-3.....	46
Figura 9. Diagrama de Venn de genes alvos.	47
Figura 10. Expressão relativa de miRNAs relacionados a angiogênese em exossomos.	51
Figura 11. Diagrama de Venn de genes em comum regulados por miRNAs com expressão validadas em exossomos das linhagens LNCaP e PC-3.....	53
Figura 12. Viabilidade celular de células endoteliais HUVEC expostas a exossomos.	56
Figura 13. Microscopia confocal de exossomos internalizados.	57
Figura 14. Ensaio de invasão de células HUVEC expostas a exossomos das linhagens LNCaP e PC-3.	59
Figura 15. Formação de tubo de células endoteliais.....	61
Figura 16. Expressão relativa de miRNAs relacionados a angiogênese em células endoteliais HUVEC.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de genes alvos regulados pelos miRNAs.....	48
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Linhagens celulares.	35
Quadro 2. Primers utilizados na reação de RT-qPCR	39
Quadro 3. Processos biológicos regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

ADAM12 - do Inglês *Metallopeptidase Domain 12*

ADT - do Inglês *Androgen deprivation therapy*

ALIX - do Inglês *Programmed cell death 6-interacting protein*

AR - Receptor Androgênico (do Inglês *Androgen receptor*)

BSA - do Inglês *Bovine serum albumin*

CD9 - Cluster de Diferenciação 9

cJUN - do Inglês *JUN proto-oncogene*

CMV - Corpos Multivesiculares

cMYC - do Inglês *MYC proto-oncogene*

DEPT - do Inglês *Diethylpyrocarbonate*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPP4 - Dipeptidil Peptidase 4, do Inglês *Dipeptidyl peptidase IV*

DSL - Espalhamento Dinâmico da Luz

ESCRT - do Inglês *Endosomal sorting complexes required for transport*

EXPH5 - do Inglês *Exophilin 5*

FBXW7 - do Inglês *F-Box and WD repeat domain containing 7*

FC - do Inglês *Fold Change*

FDA - do Inglês *Food and drug administration*

FGF2 - Fator de Crescimento de Fibroblasto 2, do Inglês *Fibroblast growth factor 2*

GH - Hormônio de Crescimento (do Inglês *Growth hormone*)

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

GRB2 - do Inglês *Growth factor receptor bound protein 2*

HIF - Fator de Indução de Hipóxia, do Inglês *Hypoxia inducible factor*

HIF1A - do Inglês *Hypoxia inducible factor 1-subunit alpha*

HMT - do Inglês *SET1-like Histone methyltransferase*

hnRPs - Ribonucleoproteínas Nucleares Heterogêneas, do Inglês *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*

HSP70 - Proteína 70 de Choque Térmico, do Inglês *Heat shock protein 70*

HSP90 - Proteína 90 de Choque Térmico, do Inglês *Heat shock protein 90*

KMT2A - do Inglês *Lysine methyltransferase 2A*

IL8 - Interleucina 8

ISUP - do Inglês *International Society of Urological Pathology*

LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC

LAMP2 - do Inglês *Lysosome-associated membrane protein 2*

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC

LH - Hormônio Luteinizante

nSMase2 - Esfingomielinase Neutra 2, do Inglês *Neutral sphingomyelinase 2*

Nt - Nucleotídeo

MAPK - do Inglês *Mitogen activated protein kinases*

MCL1 - do Inglês *Apoptosis regulator, BCL2 family member*

MET - do Inglês *Proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MHC-II - Complexo de Histocompatibilidade de Classe II, do Inglês *Major histocompatibility complex II*

MIF - Fator Inibitório da Migração de Macrófagos, do Inglês *Macrophage migration inhibitory factor*

MLL - do Inglês *Mixed-lineage leukemia protein*

miRNA - microRNA

mRNA - RNA mensageiro

MMP - do Inglês *Matrix metalloproteinase*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão Fosfato Salino

pré-miRNA – microRNA precursor

pri-miRNA - microRNA primário

PSA - Antígeno Específico da Próstata, do Inglês *Prostate-specific antigen*

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RAB5 - do Inglês, *RAS-related protein 5*

RAB27a - do Inglês *RAS-related protein 27a*

RAB27b - do Inglês *RAS-related protein 27b*

RISC - do Inglês *RNA induced silencing complex*

RT-qPCR - do Inglês *reverse transcription – quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*

SDC1 - do Inglês *Syndecan 1*

SEMA6A - do Inglês *Semaphorin 6A*

SERPBI - do Inglês *SERPINE1 mRNA binding protein 1*

SFB - Soro Fetal Bovino

SHBG - Globulina de Ligação a Hormônios Sexuais, do inglês *Sex hormone binding globulin*

SPRY2 - do Inglês *Sprouty RTK Signaling Antagonist 2*

SYTL4 - do Inglês *Synaptotagmin Like 4*

SZRD1 - do Inglês *SUZ RNA binding domain containing 1*

TGFβ - Fator de Transformação de Crescimento-β, do Inglês *Transforming growth factor β*

TIMP1 - do Inglês *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1*

TIMP2 - do Inglês *Tissue inhibitor of metalloproteinase 2*

TNM - do Inglês *Tumor-Node-Metastasis*

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UPA - Plasminogênio Ativador de Uroquinase, do Inglês *Urokinase plasminogen activator*

UTR - do Inglês *Untranslated region*

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do Inglês *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR - Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do Inglês *Vascular endothelial growth factor receptor*

WDTC1 - do Inglês *WD and tetratricopeptide repeats 1*

ZNF460 - do Inglês *Finger protein 460*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	PRÓSTATA	19
2.2	CÂNCER DE PRÓSTATA.....	23
2.3	ANGIOGÊNESE	26
2.4	VESÍCULAS EXTRACELULARES E EXOSSOMOS.....	28
2.5	MICRORNA (MIRNA)	30
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	LINHAGENS E CULTURA CELULAR	35
4.2	ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS.....	35
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	36
4.4	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DSL).....	36
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	37
4.6	EXTRAÇÃO DE RNA	37
4.7	AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DE RNA TOTAL.....	37
4.8	MICROARRANJO	38
4.9	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	38
4.10	INICIADORES PARA RT-QPCR.....	39
4.11	POLIADENILAÇÃO, TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA.....	39
4.12	MARCAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE EXOSSOMOS.....	40
4.13	VIABILIDADE CELULAR	40
4.14	INVASÃO CELULAR	40

4.15	TUBULOGÊNESE	41
4.16	RT-QPCR PARA CÉLULAS HUVEC	41
4.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS.....	43
5.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MIRNAS PRESENTES NAS VESÍCULAS.....	44
5.3	VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS EXOSSOMAS POR RT-QPCR ...	50
5.4	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DE MIRNAS VALIDADOS	52
5.5	ENSAIOS CELULARES.....	55
5.5.1	Viabilidade celular	55
5.5.2	Marcação e internalização dos exossomos	57
5.5.3	Invasão celular.....	58
5.5.4	Tubulogênese	60
5.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MIRNAS POR RT-QPCR EM CÉLULAS HUVEC	62
6	CONCLUSÕES	65
7	PERSPECTIVAS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – Os miRNAs alterados entre exossomos derivados da linhagem LNCaP em relação a linhagem PC-3.	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer caracteriza-se por um amplo grupo de doenças que possuem em comum o descontrole na proliferação celular, que pode resultar na invasão de órgãos ou partes do corpo adjacentes ou mesmo distantes do foco inicial, culminando em complicações fisiológicas e morte. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 9,8 milhões de pessoas foram a óbito em decorrência da doença em 2018, sendo a segunda principal causa de mortalidade mundial.

Entre todos os tipos de câncer, o de próstata é o quarto mais comum no mundo, representando cerca de 7% do total de cânceres (WHO, 2018). De forma semelhante, no Brasil, o câncer de próstata também está entre as neoplasias mais prevalentes, sendo o mais incidente em homens, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2018). Uma vez que a hormonioterapia é o tratamento de escolha em casos de doença avançada, a resistência a este tratamento confere um pior prognóstico aos pacientes, podendo evoluir ao óbito por doença metastática.

A transição para resistência a andrógenos está associada a maior vascularização do tumor. A formação de novos vasos é necessária para fornecer oxigênio e nutrientes às células, além de favorecer a disseminação para novos órgãos. O processo de angiogênese é regulado por diversos fatores de crescimento e citocinas, que podem ser influenciados por componentes extracelulares, como vesículas e exossomos. Estudos indicam a relação de exossomos com o câncer de próstata, tanto no processo de angiogênese quanto no de resistência a fármacos, porém ainda não existe uma relação clara entre exossomos e miRNAs contidos no interior das vesículas com a vascularização do câncer de próstata independente a andrógenos. Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes com cerca de 19-23 nucleotídeos (nt), que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica com papéis fundamentais nos mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose que vem sendo postulados como biomarcadores de diagnóstico e prognósticos de doenças (CAI et al., 2009).

Os recentes avanços no tratamento do câncer de próstata, com combinação de medicações quimioterápicas e antiandrogênicas resultam em maior sobrevida e diminuição de efeitos indesejáveis, entretanto novas alternativas são necessárias para o tratamento de pacientes com doença resistente à castração. Para isto, faz-se necessário o conhecimento aprofundado dos respectivos mecanismos de resistência. Assim, o presente estudo buscou avaliar a influência de miRNAs presentes em exossomos de linhagens de câncer de próstata

com diferente perfil de resposta a andrógenos no comportamento de células endoteliais HUVEC, relacionado ao processo de angiogênese tumoral. Por meio deste trabalho espera-se contribuir para o conhecimento sobre a comunicação celular mediada por vesículas no câncer de próstata e na pesquisa de novos alvos antitumorais e antiangiogênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

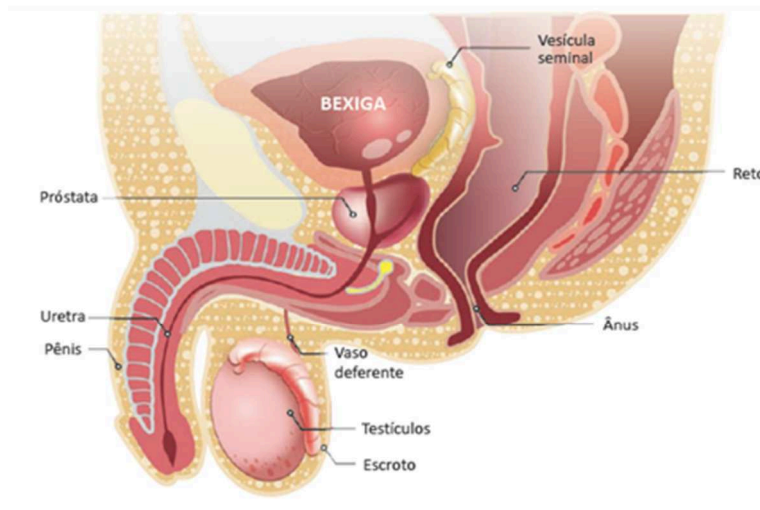
2.1 PRÓSTATA

A próstata é um órgão do sistema reprodutor masculino que possui cerca de 3 cm de altura, 4 cm de comprimento e 2 cm de largura, com maior taxa de crescimento durante a puberdade, atingindo o peso fisiológico máximo na idade adulta, aproximadamente 20 gramas (MITTERBERGER et al., 2010). Encontra-se localizada abaixo da bexiga, em frente ao reto, envolvendo a parte inicial da uretra (Figura 1A) e tem como função a produção de parte do fluído que compõe o sêmen, auxiliando a viabilidade e motilidade dos espermatozoides.

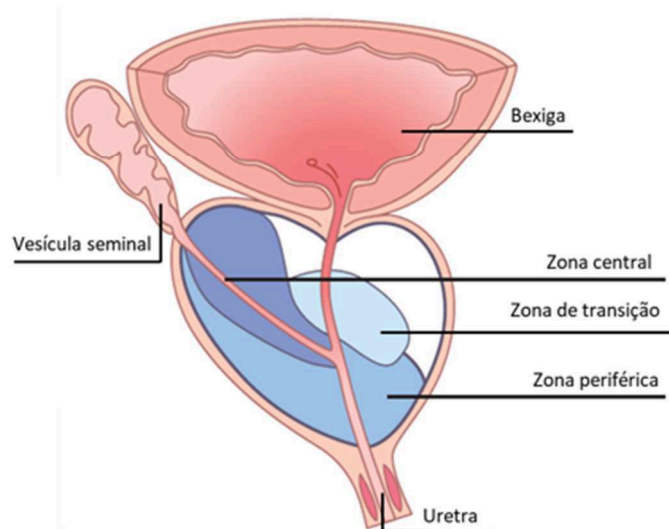
A próstata é considerada uma glândula com três diferentes zonas (MCNEAL, 1981) (Figura 1B). A zona periférica representa 70% do tecido da próstata no adulto jovem, e é o local de origem de 60 a 70% dos tumores de próstata. A zona central representa 25% do tecido. A zona de transição corresponde aos 5% restantes, sendo este valor elevado na terceira idade, e o local de origem mais relacionado com a presença de hiperplasia benigna da próstata (CHENG et al., 2012, ITTMANN, 2017).

Figura 1 Anatomia da próstata.

A



B



(A) Imagem adaptada de NOGUEIRA, 2014. (B) Zonas histológicas da próstata, imagem adaptada de HIFU CLINIC.

Acinos e ductos prostáticos são revestidos por uma superfície luminal ondulada formada por duas camadas de células basais e neuroendócrinas e uma terceira camada, luminal, composta de células colunares secretoras que produzem antígeno prostático específico (PSA, do Inglês *Prostate Specific Antigen*), fosfatase ácida prostática e caliceína-2 humana, substâncias presentes no líquido seminal (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

O estroma prostático é fibromuscular, com a presença de células musculares lisas junto a fibroblastos, vasos sanguíneos e nervos. Após o crescimento fisiológico para o tamanho adulto, a próstata entra numa fase de manutenção, na qual a proliferação da célula prostática

ocorre em uma taxa diária de 1 a 2%, contrabalanceada por igual taxa de morte celular programada (KYPRIANOU, 2003; SHARIAT et al., 2005).

Os andrógenos desempenham um importante papel durante a diferenciação e o desenvolvimento da próstata normal. Desses andrógenos, 95% correspondem à testosterona produzida nas células de Leydig dos testículos, por estímulo do hormônio luteinizante (LH) da hipófise que, por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo (TAN et al., 2017). Para a biossíntese de testosterona, pregnenolona e a progesterona são convertidas a deidroepiandrosterona e androstenediona, por ação da enzima 17 α -hidroxilase e então transformadas a androstenediol e testosterona, pela ação da 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (GALBRAITH; DUCHESNE, 1997) (Figura 2). O androstenediol, pela ação da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, também é convertido em testosterona que é liberada na circulação sanguínea e liga-se à albumina (BAKER, 2002) e globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG, do Inglês *Sex Hormone Binding Globulin*) (ROSNER et al., 1991, DEB et al., 2018). Somente 5% permanece livre no plasma e biologicamente ativa.

Figura 2. Síntese de testosterona.

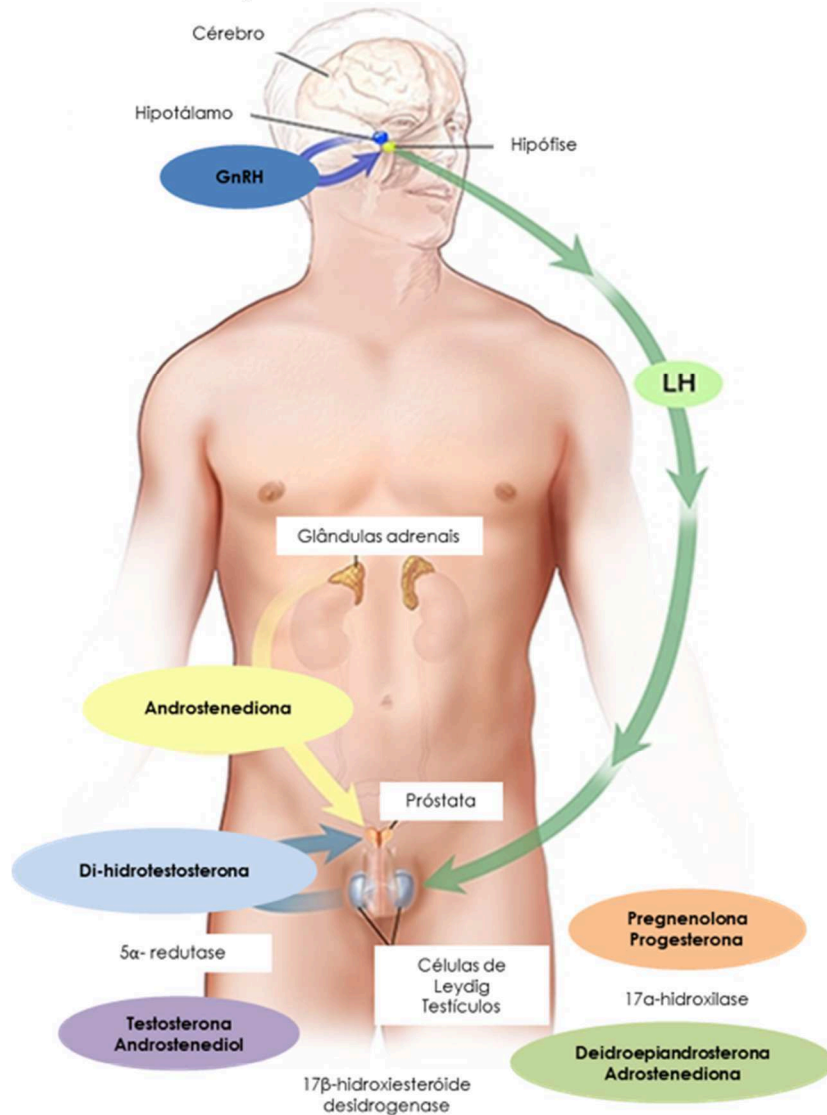


Imagem adaptada de WINSLOW, 2013.

A testosterona livre, única forma atuante na próstata, atravessa a membrana plasmática das células por interação hidrofóbica com fosfolipídios e é metabolizada pela enzima 5 α -redutase a di-hidrotestosterona, que se liga com maior afinidade a receptores androgênicos (AR), desloca proteínas de choque térmico do AR, impulsiona a interação entre os terminais N e C do AR, translocando o complexo para o núcleo (SRINIVAS-SHANKAR; WU, 2006). No núcleo, os dímeros do receptor ligam-se às regiões promotoras de genes alvo para a codificação de diversas proteínas, inclusive fatores de crescimento que são estimuladores potenciais da proliferação celular prostática (CRUZ, 2015).

Os outros 5% de andrógenos são sintetizados nas glândulas adrenais sob a ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise, que é regulado pelo GnRH, e liberados

principalmente na forma de androstenediona, que é periféricamente convertida em testosterona (ISAACSON; JONES; KRUEGER, 1993). A prolactina e o hormônio de crescimento (GH) também estimulam a produção de andrógenos tanto nos testículos como nas adrenais (COSTELLO; FRANKLIN, 1994).

2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata é o quarto câncer mais comum no mundo, representando cerca 1,28 milhões de casos e 7,1% do total de cânceres (OMS, 2018). No Brasil, estimam-se 68,220 novos casos de câncer de próstata para cada ano do biênio 2018-2019, o que corresponde a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens. Quando se desconsidera os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país (INCA, 2018).

Dentre os tipos de câncer de próstata, o adenocarcinoma acinar, que ocorre em células secretoras do epitélio, é o mais comum, sendo em sua maioria localizado na zona periférica, embora 15-20% apresentem-se na zona de transição (EPSTEIN et al., 1994; GUO et al., 2009). Também são encontrados carcinomas de células epiteliais, carcinomas de células de transição, sarcomas e tumores neuroendócrinos de células pequenas, considerado um subtipo extremamente agressivo e de pior prognóstico aos pacientes (TAI et al., 2011).

Nas fases iniciais, o câncer de próstata tem evolução silenciosa. Muitos pacientes não apresentam nenhum sintoma ou, quando apresentam, são semelhantes aos do crescimento benigno da próstata (EMBERTON et al., 2008). Em ambas as situações o crescimento da massa neoplásica pressiona a uretra causando sintomas como poliúria e noctúria. Na fase avançada, o câncer de próstata pode provocar perda de peso, hematúria, disfunção sexual, dor pélvica, dor óssea, infecção generalizada e potencial progressão para o óbito (REES; BULTITUDE; CHALLACOMBE, 2014; MOTTET et al, 2016).

Conforme o Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata (2002), para detecção de câncer de próstata é utilizada a associação da dosagem sérica de PSA e do exame de toque retal, apesar das limitações, uma vez que somente as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadas, deixando 40% a 50% dos tumores fora de alcance. Em relação à dosagem de PSA, a primeira dificuldade na avaliação da sensibilidade e especificidade do teste é a falta de consenso sobre o ponto de corte ideal e clinicamente significativo, com autores propondo valores na faixa de 4,0 a 10,0 ng/mL (PASQUIÉ et al., 2004). Considerando um ponto

de corte em 4,0 ng/mL, a sensibilidade estimada varia de 35% a 71% e a especificidade de 63% a 91%. Estudos estimam um valor preditivo positivo para grandezas em torno de 28%, o que significa que 72% dos pacientes com dosagem do PSA alterada são submetidos a biópsias desnecessárias (BRASIL, 2002). Como o PSA é produzido pelas células epiteliais da próstata e não especificamente pelas células tumorais, a dosagem pode estar alterada em outras doenças ou durante processos infecciosos e/ou inflamatórios (CANBY-HAGINO et al., 2007; MONTIRONI et al., 2016).

O diagnóstico conclusivo de câncer de próstata é feito pelo estudo histopatológico do tecido obtido por biópsia, quando há anormalidades no toque retal ou na dosagem do PSA. Para o estadiamento clínico é utilizado o sistema TNM (do Inglês *Tumor-Node-Metastasis*) que leva em consideração a localização do tumor, a disseminação em linfonodos, a presença de metástase 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). Durante o desenvolvimento do câncer de próstata (Figura 3) as células são, geralmente, uniformes e pequenas e formam glândulas regulares, com pouca variação de tamanho e forma, com bordas bem definidas, densamente agrupadas, distribuídas homoganeamente e com pouquíssimo estroma entre si (Estadio I), em seguida tornam-se frouxamente agrupadas, variando de tamanho e com bordas irregulares, atingindo os dois lobos da próstata (Estadio II). Em etapas posteriores, as células tumorais podem invadir os tecidos adjacentes passando a variar ainda mais no tamanho e na forma, estando muitas vezes fusionadas em grandes massas amorfas ou formando glândulas irregulares, que são distribuídas anarquicamente, exibindo infiltração irregular (Estadio III). Na última fase, a massa de células tumorais pode invadir órgãos e tecidos vizinhos, apresentando-se indiferenciadas (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).

Figura 3. Estadiamento clínico do câncer de próstata.

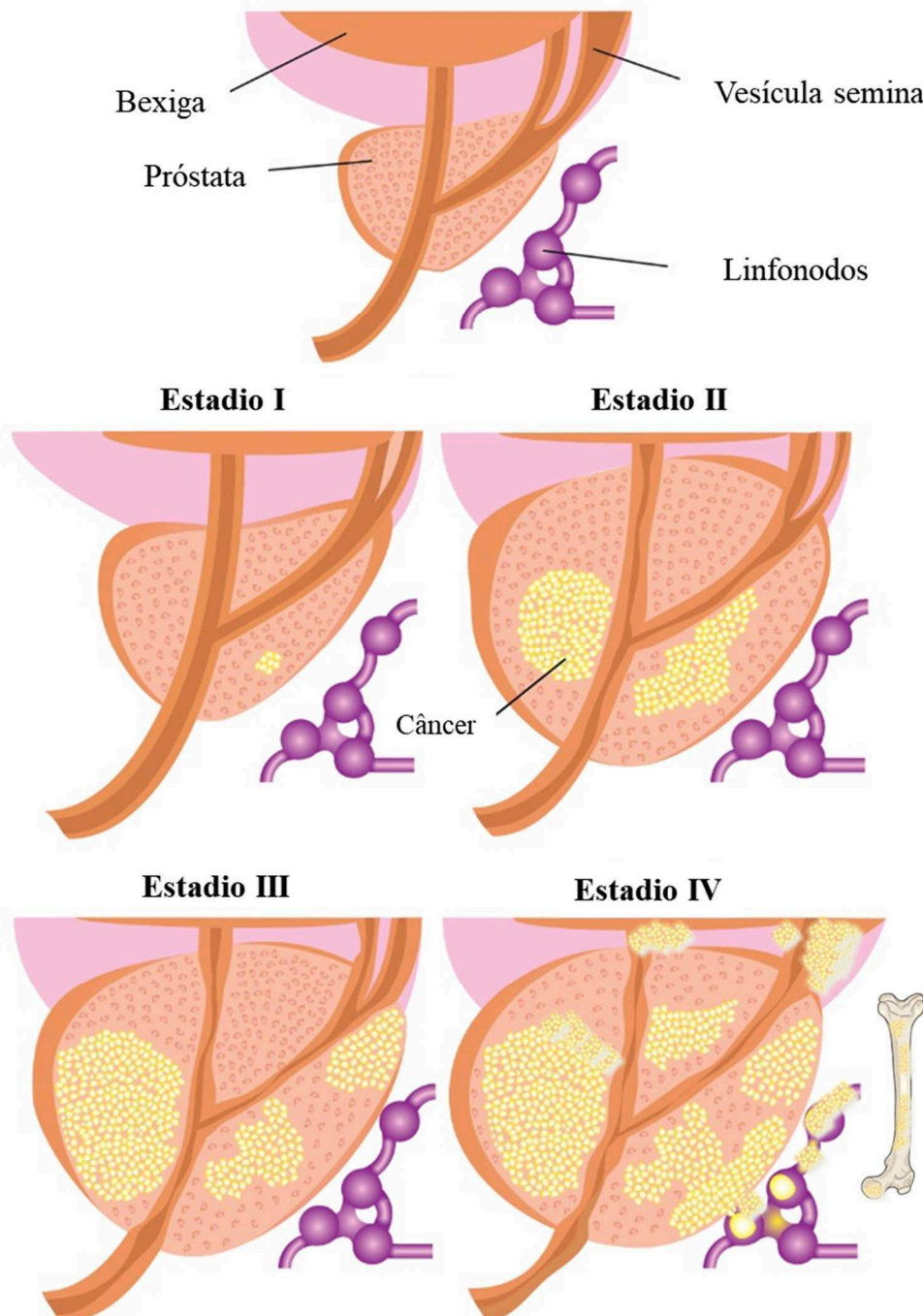


Imagem adaptada de PROFOUND MEDICAL GMBH.

O curso da doença é altamente variável e métodos como toque retal e PSA não são capazes de prever com segurança quais cânceres irão evoluir para formação de metástases (BAZINET et al., 1992; ARORA et al., 2004). Um dos maiores desafios deste câncer é a falta de conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão. Durante o desenvolvimento inicial do câncer de próstata, a proliferação das células cancerosas é dependente de andrógenos como a di-hidrotestosterona, doença denominada como andrógeno-

responsiva (CUNHA et al., 2004; MARKER et al., 2003). Por esta razão, quando o câncer apresenta risco intermediário, o tratamento consiste em prostatectomia total ou radioterapia em combinação com terapia de curta duração durante 4-6 meses de privação androgênica (ADT, do Inglês *Androgen Deprivation Therapy*), chamada também de hormonioterapia. A hormonioterapia pode ser cirúrgica através de orquitectomia (retirada dos testículos) ou farmacológica com o uso de análogos ou antagonistas de GnRH. Quando o câncer apresenta risco alto, há duas opções terapêuticas: prostatectomia total ou radioterapia associada à hormonioterapia de longa duração (2-3 anos), que envolve fármacos com as possíveis ações: agonistas ou antagonistas do GnRH, anti-androgênicos e estrógenos (BRASIL, 2016).

Na maior parte dos casos há redução dos níveis de PSA, melhora clínica e redução tumoral após o tratamento de privação hormonal, entretanto, em alguns casos as células prostáticas podem continuar proliferando. Nestes casos, o câncer é denominado como castração resistente, andrógeno independente ou refratário a hormônio e os pacientes apresentam uma diminuição da sobrevida média de 48,2 meses para 13,5 meses (HIRST; CABRERA; KIRBY, 2012). Estes números representam cerca de 20% das causas de morte no câncer prostático (SCHER et al., 2016).

2.3 ANGIOGÊNESE

Tumores são incapazes de crescer mais de 2 – 3 mm na ausência de vascularização (FOLKMAN, 1971). Para os tecidos desenvolverem-se além deste tamanho, é necessário desencadear o processo de angiogênese, caracterizado pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes. Este processo pode ser dividido em quatro fases (I) degradação proteolítica da membrana basal e matriz extracelular; (II) proliferação de células endoteliais; (III) migração endotelial; (IV) formação tubular e reorganização estrutural (VAN MOORSELAAR; VOEST, 2002).

O processo de degradação da matriz extracelular é mediado por metaloproteinases (MMP) (PEPPER, 2001). Estudos mostram que tumores de próstata em estágio inicial apresentam baixos níveis de MMP2 e MMP9, enquanto tumores de estágio avançado apresentam elevados níveis, além da baixa expressão de seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 (TIMP, do Inglês *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*) (WOOD et al., 1997). A expressão da MMP2 também é significativamente maior no câncer de próstata do que na hiperplasia benigna da próstata (XIE et al., 2015).

Após a degradação da matriz extracelular, ocorre a formação de um microambiente ideal para células endoteliais proliferarem, migrarem e invadirem. O principal regulador descrito deste processo é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do Inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*). A secreção de VEGF é induzida pelo fator indução hipóxia-1 (HIF-1, do Inglês *Hypoxia Inducible Factor*) produzido por células tumorais em resposta aos baixos níveis de oxigênio (CVETKOVIC et al., 2001). O tecido saudável da próstata normalmente não expressa, ou expressa baixos níveis de VEGF (DOLL et al., 2001). Estudos têm demonstrado relação do aumento da expressão de VEGF na próstata e no soro de pacientes com estadiamento clínico do tumor e metástases (SHARIAT et al., 2004; BOTELHO et al., 2010; RIVEIRA-PEREZ et al., 2017). Destaca-se que células da linhagem de câncer de próstata PC-3 têm a capacidade de migração aumentada quando expostas a VEGF (DARRINGTON et al., 2012). Neste sentido, animais inoculados com a linhagem tumoral DU145 e tratados com anticorpo anti-VEGF apresentam diminuição tumoral e ausência de metástases (MELNYK et al., 1999). A diminuição do tumor *in vivo* também já foi relatada pela utilização do anticorpo anti-receptor de VEGF (VEGFR) (BREKKEN et al., 2000).

Além do VEGF, outros fatores são importantes no desenvolvimento da angiogênese no câncer de próstata, como o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2, do Inglês *Fibroblast Growth Factor 2*) responsável por estimular fibroblastos da próstata (DOW; WHITE, 2000); fator de transformação de crescimento- β (TGF- β , do Inglês *Transforming Growth Factor β*) responsável por manter a homeostase no epitélio prostático (VO et al., 2013); fator de crescimento epidermal (CHING et al., 1993); angiopoetinas (IIVANAINEN et al., 2003) e interleucina-8 (IL-8) (FRADET et al., 2014).

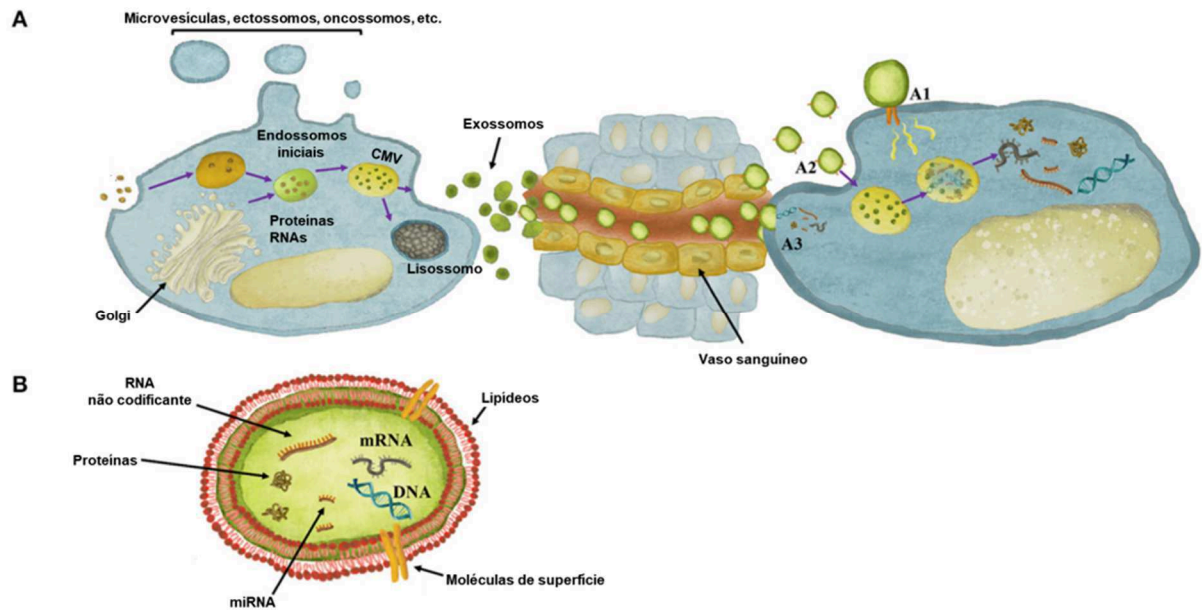
A relação da angiogênese com o avanço tumoral e metástase foi descrita pela primeira vez por Folkman (1971). Desde então, a formação de novos vasos é reconhecida como passo essencial no câncer, sendo lançado em 2003 o primeiro fármaco antiangiogênico, bevacizumabe, anticorpo monoclonal anti-VEGF utilizado no câncer renal, colorretal, de mama, de ovário, de útero e de pulmão de células não pequenas (YANG et al., 2003; ANVISA, 2016). Atualmente, a maioria dos fármacos antiangiogênicos disponíveis no mercado atuam na via de sinalização do VEGF (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018). Entretanto, dos 14 medicamentos aprovados pelo FDA, até o momento nenhum é utilizado para tratamento do câncer de próstata.

2.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES E EXOSSOMOS

Vesículas extracelulares são formadas por uma bicamada lipídica e secretadas por células eucariontes e procariontes para mediar a comunicação intercelular. Estas vesículas podem conter em seu interior lipídios, proteínas, RNA mensageiro (mRNA) e microRNAs (miRNA) (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Diferentes nomes são encontrados na literatura de acordo com a origem e tamanho das vesículas. O termo microvesículas consiste em vesículas de origem na membrana plasmática que apresentam de 100 a 1000 nm de diâmetro, enquanto o termo exossomos refere-se a vesículas menores, com diâmetro de 30 a 150 nm com origem endossomal (MINCIACCHI; FREEMAN; VIZIO, 2015).

A biogênese dos exossomos (Figura 4) é iniciada pela invaginação da membrana endossomal, seguida da formação de corpos multivesiculares (CMV). Os CMV podem ter o respectivo conteúdo degradado quando fusionados aos lisossomos ou então serem secretados ao fundirem-se à membrana plasmática, liberando os exossomos no meio extracelular (MAIA et al., 2018). Moléculas regulatórias envolvidas na formação de exossomos foram primeiramente descritas por Ostrowski e colaboradores (2009), associando RAB27a e RAB27b (do Inglês *RAS-related protein*) com a secreção exossomal. Ao inibir as moléculas ou seus efetores, SYTL4 (do Inglês *Synaptotagmin Like 4*) e EXPH5 (do Inglês *Exophilin 5*) a secreção de exossomos é inibida em células HeLa. O complexo SDC1 (do Inglês *Syndecan 1*) interage com a proteína ALIX (do Inglês *Programmed Cell Death 6-Interacting Protein*) para o brotamento intraluminal das membranas endossomais, passo limitante na formação de exossomos (BAIETTI et al., 2012). O direcionamento para a membrana plasmática também está relacionado à presença de 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 ser internalizados por células alvo através de receptores de membrana, endocitose, fagocitose, microcitose ou então pela fusão com a membrana plasmática, cujo conteúdo é liberado no citoplasma celular, podendo induzir alterações moleculares e fisiológicas na célula.

Figura 4. Exossomos na comunicação extracelular e conteúdo intracelular.



(A) Formação de exossomos através da via endocítica. Formas de atuação: (A1) ativar vias intracelulares ao ligarem-se na membrana plasmática de células alvos através da interação com receptores de membrana; (A2) serem endocitados por fagocitose ou micropinocitose e liberarem o conteúdo no citoplasma ao fundirem-se com a membrana dos compartimentos endocíticos; (A3) serem absorvidos diretamente pela fusão de membrana, dispensando o conteúdo no citoplasma. (B) Estrutura dos exossomos, contendo DNA, RNA, mRNA e miRNA em membrana lipídica. Imagem adaptada de Maia et al., (2018).

Apesar de todas as células do corpo humano possuírem capacidade de produzir exossomos (CLAYTON et al., 2005), a secreção destas vesículas torna-se elevada em situações de estresse como no ambiente tumoral, em que há deficiência nutricional, hipóxia e alteração da matriz celular (SHEPHARD et al., 2017). A liberação de exossomos tem sido descrita como importante componente na comunicação entre células tumorais e células do microambiente tumoral, como fibroblastos, células endoteliais e diferentes tipos de leucócitos, pois promove a modulação das respectivas atividades através da transferência horizontal de informações (MARTINS; DIAS; HAINAUT, 2013). Exossomos derivados de adenocarcinoma pancreático ductal apresentam elevados níveis de fator inibitório da migração de macrófagos (MIF, do Inglês *Macrophage Migration Inhibitory Factor*). MIF atua na liberação de TGF- β que promove a produção de fibronectina por células hepáticas, impedindo a migração de macrófagos e neutrófilos derivados da medula óssea para o fígado, tornando o ambiente hepático pró-inflamatório e ideal para a formação do nicho pré-metastático (COSTA-SILVA et al., 2015). Em relação a formação do nicho metastático, Peinado e colaboradores (2012) demonstraram que exossomos derivados de melanoma promovem a educação e mobilização de células derivadas

de medula óssea que suportam angiogênese, invasão celular e metástase, através da regulação do oncogene MET (do Inglês *Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*).

Na tumorigênese do câncer de próstata, exossomos têm sido descritos como fundamentais não só em relação ao processo de angiogênese (SHEPHARD et al., 2017), mas também no desenvolvimento de resistência a fármacos (CORCORAN et al., 2012), no escape do sistema imune (ABUSAMRA et al., 2005) e metástases (ZHANG et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que exossomos isolados de uma linhagem independente de andrógeno (DU145) reduz apoptose, induz a invasão celular e favorece a proliferação de células prostáticas, com maior eficiência que exossomos derivados da linhagem celular dependente de andrógeno LNCaP (HOSSEINI-BEHESHTI et al., 2016).

2.5 MICRORNA (MIRNA)

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes com cerca de 19 a 23 nucleotídeos, que atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Atualmente, 2,654 miRNAs foram identificados em humanos, e embora a função de muitos ainda não tenha sido elucidada (CHOU et al., 2017) sabe-se que regulam cerca de 30% dos mRNAs celulares (LIN; GREGORY, 2015), e têm papel fundamental em vias de proliferação, diferenciação e apoptose celular (CAI et al., 2009).

A biogênese dos miRNAs (Figura 5) inicia com a transcrição de genes no núcleo pela RNA polimerase II, formando o miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, o pri-miRNA é processado pela endonuclease Drosha (uma RNase III) para formar os precursores de miRNA (pré-miRNA) com aproximadamente 70 nucleotídeos em forma de grampo (*hairpin*). O pré-miRNA é exportado pelo complexo exportina-5 e Ran-GTP do núcleo para o citoplasma e processado em aproximadamente 22 nucleotídeos pela enzima Dicer (uma RNase III citoplasmática) para retirada da alça (região não pareada) e formação de uma dupla fita de miRNA. A dupla fita é desenrolada por uma helicase e uma das fitas (miRNA maduro) é incorporada a um complexo de indução do silenciamento RISC (do Inglês *RNA-Induced Silencing Complex*), enquanto a outra fita é normalmente degradada (BARTEL, 2004). Assim, o miRNA maduro presente no complexo RISC pode atuar na regulação gênica de três formas: (I) inibição da tradução, ao ocorrer o pareamento imperfeito de bases na região 3' não traduzida (UTR) do mRNA (SU et al., 2009); (II) clivagem do mRNA, que envolve o pareamento exato na região 3'UTR do mRNA; (III) ativação da tradução, envolvendo a interação com a região

5'UTR do mRNA (LYTLE; YARIO; STEITZ, 2007; MORETTI; THERMANN; HENTZE, 2010; ØROM; NIELSEN; LUND, 2008; DO AMARAL et al., 2018).

Figura 5. Representação esquemática da biogênese de miRNA.

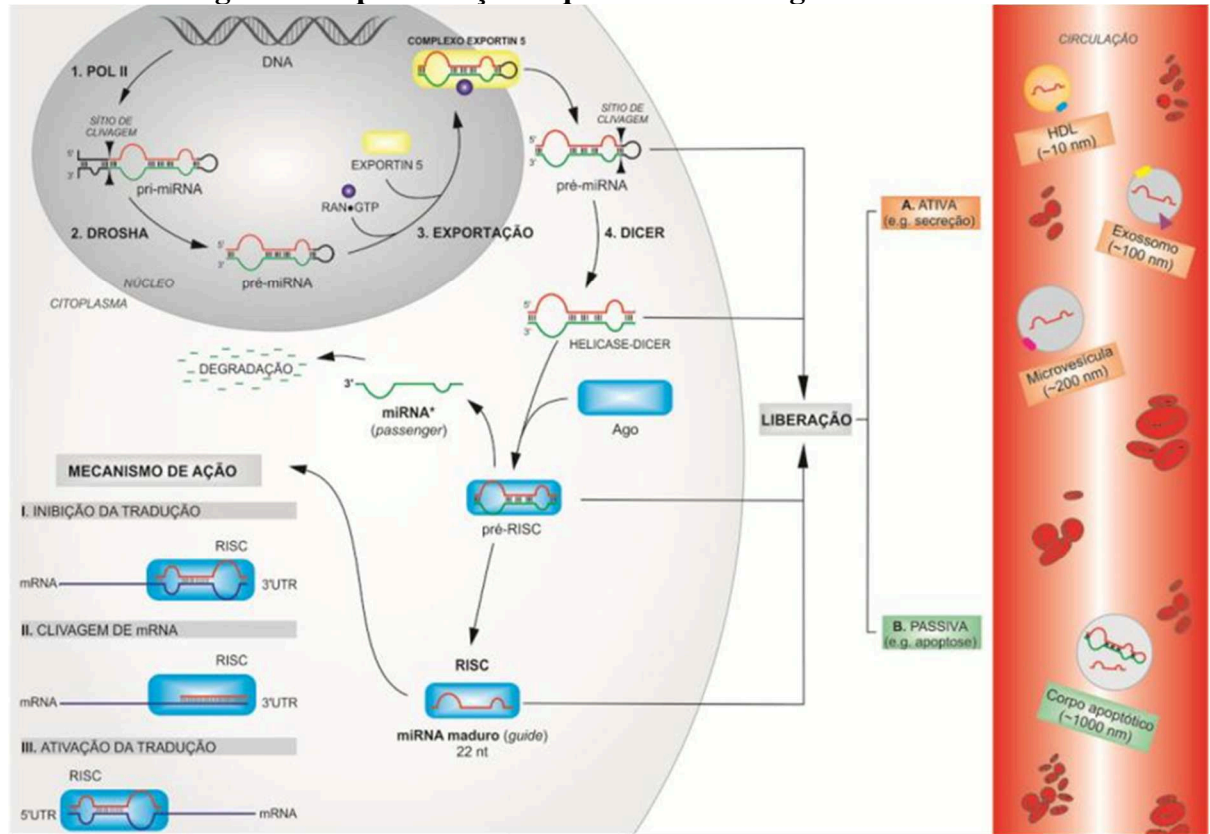


Imagem adaptada de DO AMARAL et al., 2018.

Os miRNAs podem circular no ambiente extracelular protegidos no interior de microvesículas e exossomos, ou ligados a proteínas, lipoproteínas e corpos apoptóticos (CREEMERS; TIJSEN; PINTO, 2012). O interesse por miRNAs contidos em exossomos é crescente desde que Valadi e colaboradores (2007) demonstraram que podem ser entregues ao ambiente extracelular, captados por células adjacentes ou transportados para locais distantes através de fluidos biológicos e podem induzir modificações fenotípicas nas células receptoras. Uma vez desregulados, os miRNAs podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias doenças, inclusive do câncer, em que podem atuar como oncogenes (suprimindo genes supressores tumorais) ou supressores tumorais (suprimindo oncogenes) (YANAIHARA et al., 2006).

Os mecanismos que controlam a seleção de miRNAs para o interior de exossomos ainda não são totalmente elucidados, porém sabe-se que o direcionamento de 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 modificações na região 3' dos miRNAs, de forma a selecionar apenas alguns miRNAs específicos para vesículas (FRANK; SONENBERG; NAGAR, 2010; KOPPERS-LALIC et al., 2014; KOSAKA et al., 2013; VILLARROYA-BELTRI et al., 2013).

A relação de miRNAs com a angiogênese foi primeiramente descrita por Poliseno e colaboradores (2006), ao observar que o silenciamento das enzimas Dicer e Drosha em células endoteliais reduzem a tubulogênese. Desde então, esta relação vem sendo constatada para diversos miRNAs, que atuam basicamente de duas formas: (I) tendo como alvos e suprimindo os reguladores da angiogênese e promovendo a vascularização ou (II) regulando positivamente os reguladores da angiogênese e inibindo a angiogênese (TIWARI; MUKHERJEE; DIXIT, 2018).

O miR-130a, contido em exossomos derivados de linhagem celular de câncer gástrico SGC7901 aumenta a proliferação, migração e invasão de células HUVEC e aumenta a angiogênese em tumores *in vivo* (YANG et al., 2018). A expressão elevada do miR-210 no soro de pacientes com carcinoma hepático está relacionada com maior densidade vascular do tumor. A expressão do miR-210-3p em exossomos derivados de células de câncer hepático aumenta a capacidade de tubulogênese de células HUVEC bem como a vascularização de tumores *in vivo* (LIN et al., 2018). Além disso, o miR-21 é encontrado super expresso no epitélio bronquiolar transformado após exposição ao tabaco. A exposição de exossomos contendo o miR-21 em células bronquiliares não transformadas, aumenta os níveis de VEGF das mesmas, assim como a capacidade de tubulogênese em células HUVEC (LIU et al., 2016).

No câncer de próstata, o miR-30d está associado a elevados níveis de PSA, metástases e recidiva bioquímica após tratamento. Quando exposto a células endoteliais HUVEC, promove a proliferação celular, migração, invasão e tubulogênese, além de favorecer o crescimento tumoral e angiogênese em modelos animais (LIN et al., 2017). Já o miR-218 atua inibindo a angiogênese tumoral. Baixos níveis de expressão do miR-218 são encontrados em células tumorais LNCaP, C4-2 e CWR22Rv1, quando comparados com a linhagem de próstata não tumoral BPH-1. Já a super expressão está relacionada ao aumento da proliferação, migração e tubulogênese de células HUVEC ao diminuir a concentração de VEGF-A nas células (GUAN et al., 2016).

Apesar de ser clara a relação dos miRNAs contidos em exossomos e o processo de angiogênese no câncer, a avaliação deste mecanismo no contexto do câncer de próstata ainda

precisa ser estudada. Portanto, neste trabalho buscou-se acrescentar informações na compreensão dos mecanismos de angiogênese no câncer de próstata e respectiva relação com a resposta a andrógenos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de miRNAs presentes em exossomos derivados de linhagens de células tumorais de próstata com diferentes perfis de resposta a andrógenos no comportamento de células endoteliais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar exossomos derivados das linhagens humanas de câncer de próstata LNCaP e PC-3;
- Analisar o perfil de tamanho, morfologia e quantidade de proteína dos exossomos isolados de cada linhagem celular;
- Determinar a qualidade do RNA total extraído dos exossomos;
- Identificar o perfil de expressão dos miRNAs presentes nos exossomos de cada linhagem celular;
- Relacionar os miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens com vias da angiogênese;
- Validar a expressão dos miRNAs relacionados ao processo angiogênico pela técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR) em exossomos;
- Identificar genes alvos entre os miRNAs em comum diferencialmente expressos nos exossomos;
- Analisar a capacidade de internalização dos exossomos pela linhagem humana endotelial HUVEC;
- Analisar a influência dos exossomos sobre a capacidade de invasão e tubulogênese da linhagem endotelial;
- Analisar a expressão dos miRNAs relacionados ao processo angiogênico pela técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR) em células endoteliais HUVEC após exposição aos exossomos.

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS E CULTURA CELULAR

Neste estudo foram utilizadas linhagens celulares humanas de câncer de próstata com perfil de resposta a andrógeno distinto, cedidas pela professora Dra. Flávia K. Delella do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. A linhagem LNCaP é responsiva a andrógeno e produz PSA. A linhagem PC-3 não é responsiva a andrógeno e não produz PSA. Foi também utilizada a linhagem celular humana de endotélio vascular do cordão umbilical HUVEC, cedida pela professora Dr^a. Ana Campa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Quadro 1. Linhagens celulares.

Linhagem celular	Origem	Morfologia	Responsiva a andrógeno	Produção PSA
LNCaP	Câncer de próstata. Sítio metastático em linfonodo subclavicular esquerdo.	Epitelial	Sim	Sim
PC-3	Câncer de próstata. Sítio metastático ósseo.	Epitelial	Não	Não
HUVEC	Endotélio vascular.	Endotelial	-	-

As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio RPMI-1460, acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de HEPES. As culturas foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂).

4.2 ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS

As vesículas extracelulares foram isoladas de acordo com a metodologia para isolamento de exossomos de sobrenadante celular descrita por Théry e colaboradores (2006), com modificações. Brevemente, após as linhagens celulares atingirem confluência de 90% em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, o meio foi retirado e substituído por meio RPMI suplementado com 2% de SFB depletado de vesículas. Após 24h, o sobrenadante celular foi

recolhido e centrifugado a $300 \times g$ por 5 min para remoção de células, a $2000 \times g$ por 10 min para remover *debris* celulares e a $10000 \times g$ por 20 min para remoção de corpos apoptóticos utilizando a centrífuga Sorvall Evolution RC e o rotor SS-34 disponível no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (CCS, UFSC). Para o isolamento das vesículas, o sobrenadante foi centrifugado a $100000 \times g$ por 70 min a 4°C na ultracentrífuga Optima XE-100 com o rotor SW41Ti disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB I) da UFSC. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, suspendendo as vesículas em tampão fosfato salino (PBS, do Inglês *Phosphate Buffered Saline*). O processo de isolamento foi realizado durante três dias consecutivos, ao final as vesículas foram diluídas em 10 mL de PBS e centrifugadas novamente a $100000 \times g$ por 70 min a 4°C para remoção de proteínas contaminantes. Por fim, as vesículas foram ressuspensas em PBS e armazenadas em *freezer* -80°C .

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As amostras foram analisadas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (JEM-1011) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC para determinar o formato das vesículas. Para isso, $5 \mu\text{L}$ das suspensões de exossomos foram fixadas com paraformaldeído 2% e aplicadas em grades de 200 *mesh* recobertas com formar-carbono amorfo durante 20 min. As grades foram retiradas, lavadas em água destilada e depositadas sobre glutaraldeído 1% em água durante 5 min. 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 DA LUZ (DSL)

Para medir a distribuição de tamanho, alíquotas de $30 \mu\text{L}$ de exossomos em PBS foram analisadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) na condição lipossoma, a temperatura ambiente (25°C) em ângulo de detecção de 173° com laser de He-Ne (633nm) como feixe incidente.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para a determinação da quantidade de exossomos a serem empregados nos ensaios funcionais, realizou-se uma quantificação indireta através da dosagem de proteínas totais contidas nas vesículas, pelo método de Lowry (1951), com modificações. Para isso, 5 μ L das suspensões de exossomos foram adicionadas a uma mistura de solução cupro alcalina (carbonato de sódio 4%, hidróxido de sódio 0,2M, sulfato de cobre 1%, tartarato de sódio e potássio 2%) e reagente Folin Ciocalteu 0,4 N que é reduzido em meio alcalino na presença de proteínas. Após 45 min de incubação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) 595 nm. A curva padrão foi obtida utilizando concentrações crescentes de albumina de soro bovina (BSA, do Inglês *bovine serum albumin*).

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi extraído utilizando o kit *mirVana Paris*TM AM1556 (Ambion – Life Technologies, Austin, Texas, USA), segundo instruções do fabricante. Iniciou-se a extração adicionando 300 μ L de tampão de lise celular em 200 μ L de suspensão de exossomos, seguido de agitação. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de solução desnaturante, seguida da adição de 1 mL de ácido-fenol:clorofórmio, agitação em vórtex por 1 min e centrifugação a 12000 \times g por 5 min. Posteriormente, 500 μ L da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo e adicionados 625 μ L de etanol absoluto. Essa mistura foi aplicada em uma coluna com filtro de sílica e centrifugada a 9000 \times g por 1 min. Por fim, foram realizadas três etapas de lavagem da sílica, seguidas da eluição do RNA com 60 μ L de água livre de RNase (tratada com DEPC – Sigma Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). O RNA total obtido foi armazenado em *freezer* -80°C até utilização.

4.7 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DE RNA TOTAL

As análises de qualidade e quantidade do RNA total foram realizadas no espectrofotômetro NanoVue Plus[®] (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) por meio de medidas das absorbâncias nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm e por eletroforese microfluídica utilizando o kit Agilent RNA 6000 Pico no equipamento 2100

Bioanalyzer, que apresenta alta sensibilidade para baixos limites de detecção de RNA (50 - 5000 pg/ μ L) e analisado com o *software* Agilent 2100 Expert.

4.8 MICROARRANJO

O ensaio de microarranjo foi realizado em colaboração com a Dr^a. Michele Patrícia Rode e conforme orientação do fabricante. Lâminas *G3 Human miRNA Microarray, Release 21* com sondas para a detecção de 2549 sequências de miRNAs humanos e 21 controles internos foram utilizadas.

O RNA total extraído foi concentrado em SpeedVac em temperatura ambiente e eluído em água livre de RNase na concentração de 25 ng/ μ L. Em seguida, foi iniciada a etapa de desfosforilação adicionando o *mix* contendo enzima fosfatase, tampão e um controle interno. A mistura foi incubada em termobloco a 37°C e em seguida, as amostras foram desnaturadas com adição de DMSO. Por fim, foi realizada a etapa de ligação da cianina-3, adicionando o *mix* de ligação contendo a enzima ligase, a cianina-3 e o tampão. Após o tempo de incubação, as amostras foram secas em SpeedVac, solubilizadas em água livre de RNase, e adicionado o controle interno, o agente de bloqueio e o tampão de hibridização. A mistura foi aplicada na lâmina de microarranjo e incubada no forno de hibridização durante 20 h. Após a etapa de hibridização, as lâminas foram lavadas e lidas no equipamento *SureScan Microarray Scanner*. Os dados foram extraídos utilizando o *software Feature Extraction* e os arquivos gerados foram analisados no *software Genepring*. Para a análise foram considerados apenas os miRNAs detectados nas duas replicatas biológicas.

4.9 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Para a realização da análise de bioinformática dos miRNA totais, os miRNAs diferencialmente expressos entre os exossomos das linhagens LNCaP e PC-3, detectados pelo ensaio de microarranjo foram selecionados. Os alvos preditos para os miRNAs foram gerados por meio das bases de dados miRDB (WONG e WANG, 2015) e TargetScan (versão 7.2). Os genes alvos em comum nas duas bases somados aos genes validados adquiridos na base de dados MirTarBase (versão 7.0) foram analisados pelo programa GeneOntolgy PANTHER versão 11.0 (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2018; MI et al., 2016).

Para análise de genes em comum entre os miRNAs validados pela técnica de RT-qPCR nos exossomos, o *software* FunRich (versão 3.1.3) foi utilizado.

4.10 INICIADORES PARA RT-QPCR

As seqüências dos iniciadores específicos para miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-195-5p, miR-200c-3p e miR-424-5p, estão apresentados no quadro 2, e foram desenhados conforme recomendação preconizada pelo protocolo do kit Agilent (600583, Agilent Technologies, Califórnia, EUA).

Quadro 2. Seqüência dos iniciadores utilizados.

miRNA	Seqüência dos iniciadores (5'-3')
hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAAGTGT
miR-27a-3p	CACAGTGGCTAAGTTCCGC
miR-29b-3p	GGTAGCACCATTTGAAATCAGTGTT
miR-195-5p	GTAGCAGCACAGAAATATTGGC
miR-200c-3p	TAATACTGCCGGTAATGATGGA
miR-424-5p	GGCAGCAGCAATTCATGTTTTGAA

4.11 POLIADENILAÇÃO, TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA

Após a extração do RNA total dos exossomos, as reações de poliadenilação e transcrição reversa foram realizadas utilizando o kit *1st-Strand cDNA Synthesis* (600036, Agilent Technologies, California, USA) conforme as instruções do fabricante. Para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi utilizado o kit *miRNA QPCR Master Mix* (600583, Agilent Technologies, California, USA) utilizando 1 µL de cDNA (diluição 1:6) seguindo a recomendação do protocolo estabelecido pelo fabricante, no termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). 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 5.0 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 $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como normalizadores endógenos foram utilizados miR-6800-5p e miR-197-5p com o valor de estabilidade definido após análise de estabilidade da expressão utilizando o algoritmo normFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

4.12 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular em resposta aos exossomos foi avaliada pelo método de Alamar Blue, que se baseia na redução do corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), a resorufina, a partir de desidrogenases mitocondriais majoritariamente, apresentando cor rosada e fluorescência (ANOOPKUMAR-DUKIE *et al*, 2005). As células HUVEC foram plaqueadas em monocamada em placas de 96 poços em densidades 5×10^3 /poço e expostas a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos por 24h. Após o período de incubação, o meio dos poços foi substituído por uma solução contendo meio RPMI e 10% de Alamar Blue (150 $\mu\text{g/mL}$), para incubação por 2h e posteriormente a placa foi lida em espectrômetro de fluorescência LS-55 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) com excitação 560 nm/emissão 590 nm, através do *software* FL WinLabTM. Como controle foi utilizado meio RPMI sem exossomos.

4.13 MARCAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE EXOSSOMOS

Para marcação dos exossomos, o corante fluorescente PKH26 (Sigma Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Suspensões de exossomos (10 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a solução de PKH26 em Diluente C (4 μM) por 5 min. A solução foi centrifugada a $100000 \times g$ por 70 min a 4°C para a remoção de partículas do corante e suspensa em meio de cultura RPMI suplementado com 2% SFB depletado de vesículas. Para avaliar a internalização dos exossomos, células HUVEC foram cultivadas em placas confocais até a confluência de 80% em meio RPMI suplementado com 10% SFB. Em seguida, o meio foi retirado e substituído pelo meio contendo os exossomos corados (10 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas. Após, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e os núcleos marcados com o corante DAPI. Imagens representativas foram tiradas no microscópio Confocal Leica DMI6000 B (LCME, UFSC). Como controle negativo, utilizou-se PBS filtrado nas mesmas condições de marcação e internalização.

4.14 INVASÃO CELULAR

Inserts Millicell[®] com filtros de policarbonato de 12 mm e poros de 8 μm foram preparados com 60 μL de membrana basal reconstituída (Matrigel[®]) diluído 1:1 em meio RPMI,

formando um polímero, sobre o qual foram plaqueadas 30.000 células HUVEC em meio RPMI sem soro contendo exossomos (10 µg/mL). Abaixo do *insert*, no poço da placa, foram adicionados 300 µL de RPMI suplementado com 10% SFB. Após 72h de incubação, as células capazes de atravessar o *insert* foram fixadas com glutaraldeído 5%, coradas com cristal violeta 0,5% e fotografadas no microscópio Nikon Eclipse TS100 (Melville, Nova York, USA). Em seguida, as membranas contendo as células coradas foram eluídas em ácido acético 33% e absorvância medida no espectrofotômetro de fluorescência Perkin-Elmer LS55 (Boston, Massachusetts, USA).

4.15 TUBULOGÊNESE

Em uma µ-placa (Ibidi, Munique, Alemanha) de 96 poços, 10 µL de Matrigel® foram adicionados em cada poço e após polimerização, 10.000 células HUVEC foram semeadas com meio RPMI contendo exossomos da linhagem PC-3 (5 e 10 µg/mL) por 14h. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI e como controle positivo foi utilizado meio RPMI suplementado com 10% SFB. Após o período de incubação, os poços da placa contendo as células foram fotografados no microscópio Nikon Eclipse TS100 (Melville, Nova York, USA).

4.16 RT-QPCR PARA CÉLULAS HUVEC

Células HUVEC foram semeadas em placas de 6 poços na densidade 150.000 células/poço e após 24h, o meio foi substituído por RPMI contendo 10 µg/mL de exossomos e 10% de SFB depletado. Após 48h, o meio foi retirado, as células foram soltas por ação da tripsina, centrifugadas duas vezes e ressuspensas em PBS, colocadas em tanque de nitrogênio líquido por 5 min e armazenadas em *freezer* -80°C até utilização. As demais etapas de extração de RNA e RT-qPCR foram realizadas de acordo com o descrito anteriormente, utilizando iniciadores para miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-200c-3p e miR-424-5p. Como normalizadores endógenos foram utilizados o miR-16-5p e o miR-103a-5p com o valor de estabilidade definido após análise de estabilidade da expressão utilizando o algoritmo normFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de expressão dos miRNAs alterados na técnica de microarranjo foi realizada com o auxílio do *software Genespring GX* (G5886AA- Agilent Technologies, Califórnia, EUA) utilizando o teste-t moderado com correção de Benjamin-Hochberg, *Fold Change (FC)* ≥ 2 e valores de $p \leq 0,001$. Na predição de alvos realizada no GeneOntology, utilizou-se o teste de Fisher com correção de Bonferroni. As análises da expressão por RT-qPCR foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism*[®] 5.0. (Califórnia, EUA) utilizando o teste t não pareado, considerando valores de $p \leq 0,05$. Os ensaios celulares foram realizados em duplicata para cada condição, com N=2, e análise estatística utilizando Anova uma via ou teste t não pareado (*software GraphPad Prism*[®] 5.0), com exceção ao ensaio de tubulogênese, com N=1 com dez replicadas para cada condição.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS

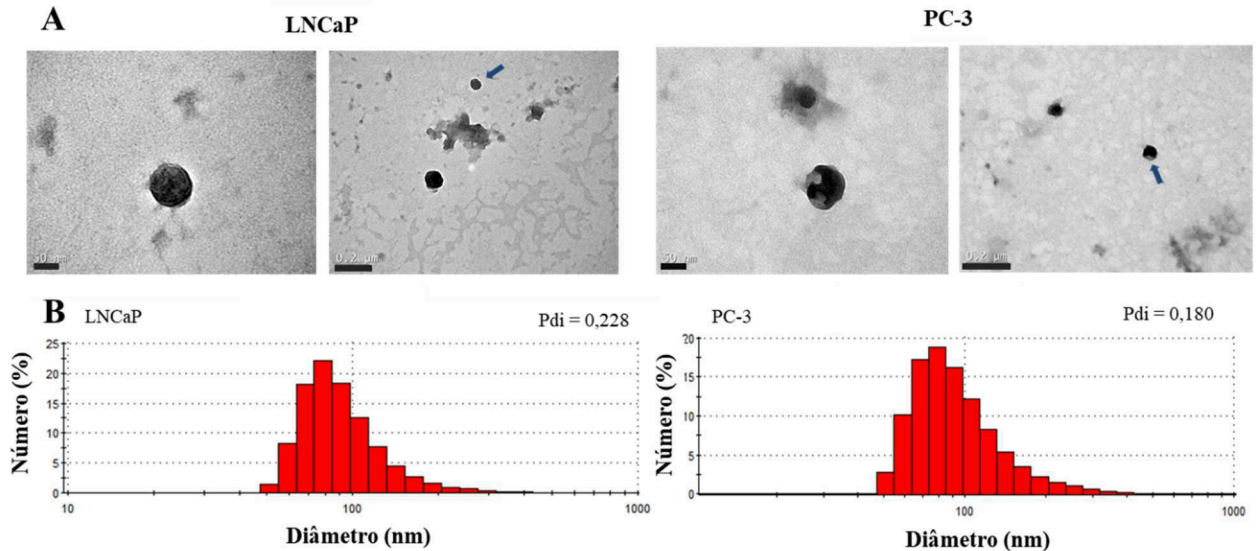
As linhagens de câncer de próstata LNCaP e PC-3 estão entre as mais utilizadas na pesquisa científica, pois representam diferentes características da doença. As células LNCaP expressam marcadores de diferenciação luminal *androgen receptor* (AR) e *prostate specific antigen* (PSA), são responsivas a andrógenos e características de adenocarcinoma (VAN BOKHOVEN et al., 2003). As células PC-3, por outro lado, não expressam AR e PSA, são independentes de andrógeno e apresentam comportamento altamente agressivo, característico de sarcomas neuroendócrinos (TAI et al., 2011). Para determinar a influência de miRNAs presentes em exossomos secretados por células tumorais de próstata com diferentes perfis de resposta a andrógenos no comportamento de células endoteliais, relacionado ao processo de angiogênese, foram isoladas vesículas do sobrenadante da cultura celular de ambas as linhagens.

Após o isolamento das vesículas por ultracentrifugação do meio de cultura, a morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As vesículas apresentaram formato arredondado conforme apresentado na figura 6, com depressão central (*cup shaped*) característica do processo de preparação das amostras (JUNG; MUN, 2018). O diâmetro das vesículas avaliado por DSL variou de 50 a 300 nm com picos entre 70 e 100 nm e índice de polidispersão (Pdi) de 0,228 para vesículas da linhagem LNCaP e 0,108 para vesículas da linhagem PC-3, indicando homogeneidade de tamanho, uma vez que a medida varia de 0,0 (totalmente homogênea) a 1,0 (não homogênea) (DANAEI et al., 2018). Estes resultados indicam a presença de exossomos entre as vesículas isoladas, que apresentam diâmetro característico entre 50 a 150 nm quando isolados de sobrenadante celular por ultracentrifugação (COLOMBO et al., 2013).

O isolamento por ultracentrifugação de exossomos das linhagens tumorais PC-3 e LNCaP foi descrito primeiramente por Hosseini-Beheshti e colaboradores em 2012 e 2016, sendo obtidas vesículas arredondadas com diâmetro entre 30 e 200 nm. Em ambos os trabalhos os autores confirmaram a identidade dos exossomos avaliando a presença de marcadores específicos citosólicos e de membrana tais como: proteínas do choque térmico 70 e 90 (HSP70 e HSP90, do Inglês *heat shock protein*), CD9, CD63, Rab5 (do Inglês, *RAS-related protein 5*), ALIX e LAMP2 (do Inglês *Lysosome-associated membrane protein 2*). Assim, levando em consideração o protocolo utilizado para o isolamento, os dados encontrados na literatura, o

diâmetro e a morfologia das vesículas isoladas neste trabalho, é possível inferir a presença majoritária de exossomos nas amostras, podendo haver contaminação por microvesículas, já que a faixa de tamanhos dos dois tipos de estruturas interpõem-se.

Figura 6. Vesículas isoladas do sobrenadante celular das linhagens LNCaP e PC-3.



(A) Imagens de MET das vesículas isoladas, fixadas com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 1% e contrastadas com acetato de uranila 5%. As setas indicam a depressão central, característica do processo de fixação de exossomos. Barra de escala nas imagens: 50 nm e 200 nm. (B) Histograma representando a distribuição do diâmetro das vesículas por DLS.

Os exossomos foram quantificados indiretamente através da dosagem de proteína total presente nas suspensões, indicando a concentração de 254 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem LNCaP, e 311 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem PC-3, sendo estes valores utilizados como parâmetro para os demais experimentos.

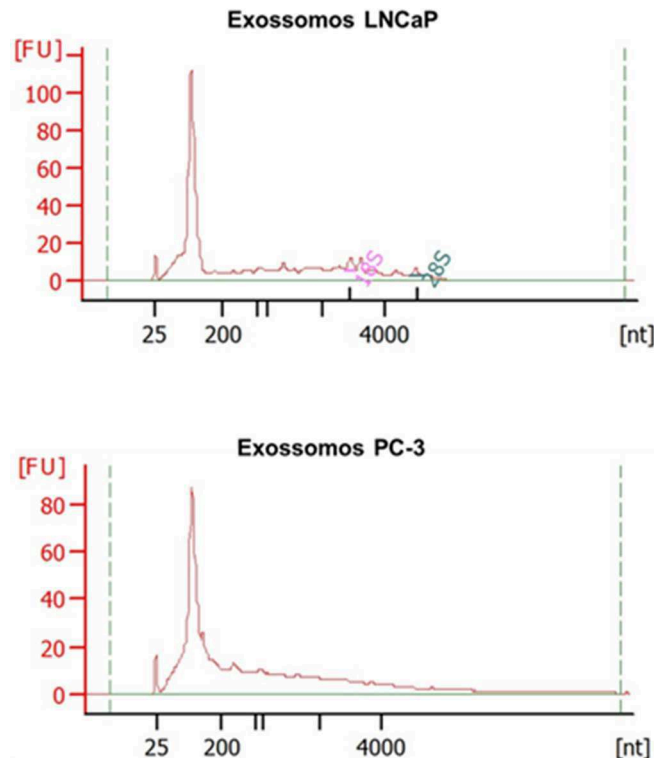
A integridade e tamanho de exossomos está relacionada a condições de armazenamento. Amostras armazenadas a 37°C por dois dias e a 4°C por quatro dias perdem a integridade, mas podem manter-se estáveis quando armazenadas em *freezer* a -20°C e -80°C (SOKOLOVA et al., 2011; THÉRY, 2006). Neste trabalho, amostras estoque de exossomos foram armazenadas em *freezer* -80°C, em PBS filtrado.

5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MIRNAS PRESENTES NAS VESÍCULAS

Após a caracterização dos exossomos, foi realizada a extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNA total contido nas vesículas. A avaliação do RNA isolado indicou ausência de contaminação por solventes, DNA e proteínas. Ainda, os eletroferogramas obtidos no

equipamento Bioanalyzer para as amostras de RNA isolado dos exossomos (Figura 7) indicam a presença majoritária de pequenos RNAs (<250 nt) e a ausência e/ou pequenas quantidades dos RNA ribossomais (rRNA) 18S e 28S, que caso presentes, seriam encontrados em picos próximos a 2000 e 4000 nt, indicando contaminação por células ou *debris*, já que correspondem as moléculas de RNA mais abundantes nas células (80%) (THÉRY et al, 2006).

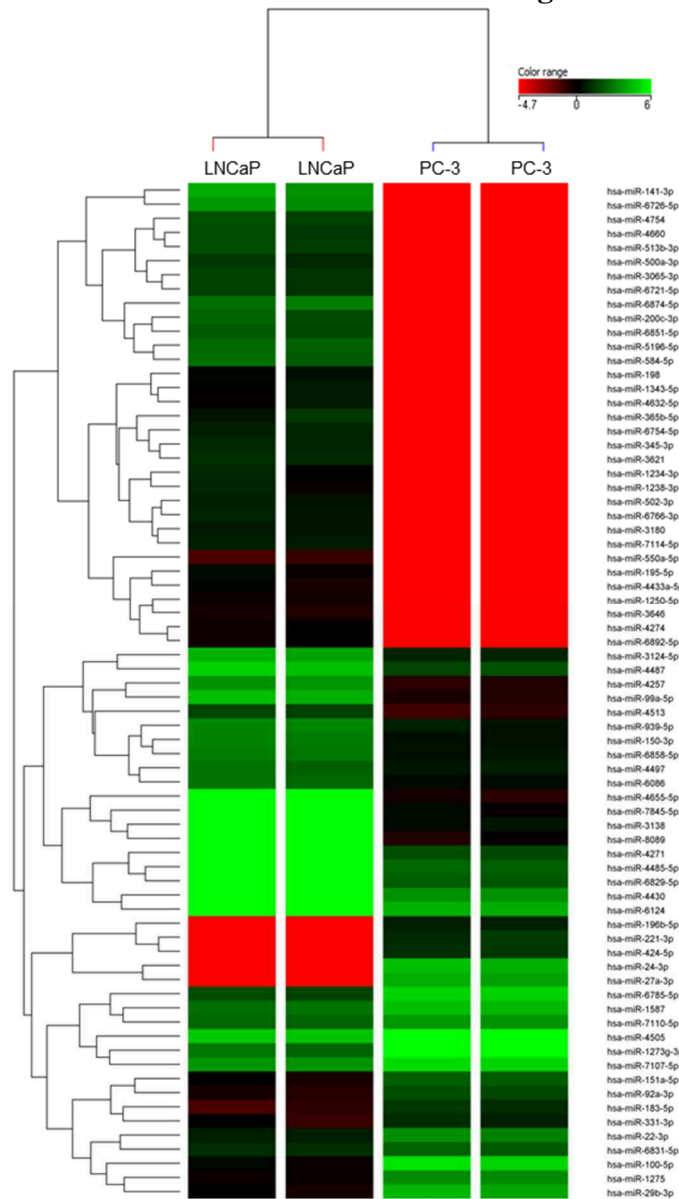
Figura 7. Eletroferogramas referentes ao RNA total obtido dos exossomos.



Avaliação da qualidade de RNA total obtido após extração de exossomos. Eletroferogramas obtidos pelo equipamento Bioanalyzer. Eixo y representado pela intensidade de fluorescência, eixo x indicando tamanho de nucleotídeos (nt).

Após a confirmação da qualidade do RNA extraído, a identificação dos miRNAs diferencialmente expressos (*Fold Change* > 2) entre os exossomos das linhagens celulares, foi realizada pela técnica de microarranjo, com lâminas *Release 21* provenientes da plataforma Agilent (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), com sondas para sequências conhecidas de 2549 miRNAs. Foram detectados 408 miRNAs nos exossomos e destes, foram identificados 72 miRNAs com a expressão alterada entre os exossomos secretados pela linhagem LNCaP em relação aos secretados pela linhagem PC-3, conforme demonstrado na clusterização hierárquica das sequências de miRNAs mais semelhantes (Figura 8). No *heatmap* as cores representam o grau de intensidade da expressão. Neste sentido, a cor verde indica alta intensidade, a preta intensidade média e a vermelha baixa intensidade de expressão.

Figura 8. Clusterização hierárquica representando as diferenças na expressão de miRNAs entre os exossomos derivados das linhagens LNCaP e PC-3.



Intensidade de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens. Clusterização por semelhança das sequências. A cor verde indica alta expressão, a cor preta indica baixa expressão e a cor vermelha indica ausência de expressão.

Na tabela 2 (Apêndice A), encontram-se descritos os 72 miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens, valores de p , *Fold Change (FC)* e regulação. Comparando a linhagem LNCaP com a linhagem PC-3, 52 miRNAs têm a expressão aumentada (*up regulated*), enquanto 20 miRNAs tem expressão diminuída (*down regulated*). Os valores de FC variaram de 2 a 1263 e os valores de p entre 0,0001 e 0,0019.

Em seguida, para a compreensão da relação dos miRNAs diferencialmente expressos entre uma linhagem responsiva e outra não responsiva a andrógenos na progressão tumoral, a análise de predição de alvos foi realizada para os 72 miRNAs com expressão alterada. A lista de genes em comum encontradas nas bases de dados com genes alvos preditos virtualmente, TargetScan e miRDB, foram somadas à lista de genes alvos da base com genes alvos já validados experimentalmente MirTarBase, conforme esquematizado na figura 9, tendo como exemplo genes alvos do miR-141-3p.

Figura 9. Diagrama de Venn de genes alvos.

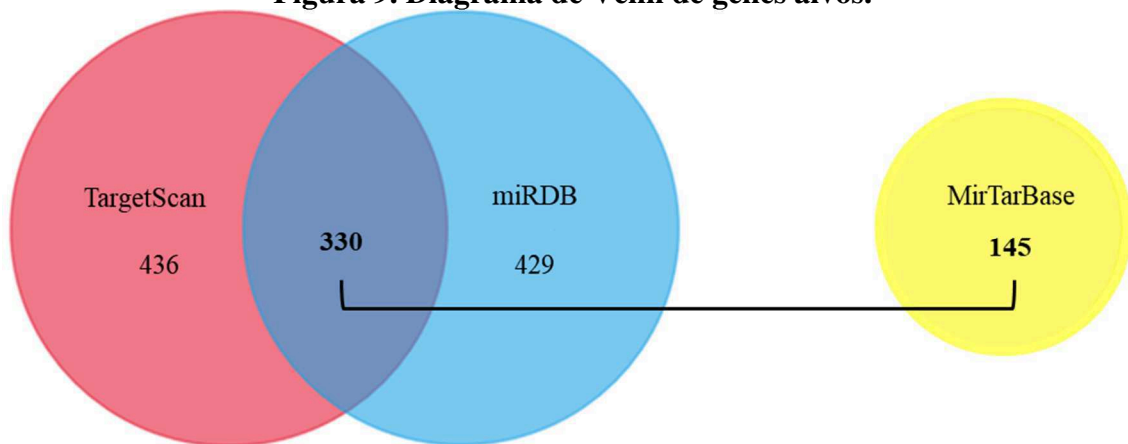


Imagem representativa dos alvos preditos para o miR-141-3p em diagrama de Venn. Os genes em comum entre as bases TargetScan e miRDB foram selecionados (330) juntamente com os alvos já validados pelo banco de dados MirTarBase (145). Genes duplicados foram removidos da análise.

Os 72 miRNAs identificados possuem número de genes alvos variando de 7 (miR-3124-5p) a 1833 (miR-6785-5p) (Tabela 1). Os genes alvos totais de cada miRNA foram avaliados quanto a processos biológicos relacionados na plataforma GeneOntology. Os miRNAs exossomais parecem estar relacionados a processos de homeostase e desenvolvimento como manutenção da polaridade celular, regulação do tamanho celular, organização do citoesqueleto, desenvolvimento gonadal, e também vias já relacionadas a progressão tumoral como regulação do ciclo celular, regulação da transição epitélio mesenquimal, da migração celular e inibição da apoptose.

Tabela 1. Número de genes alvos regulados pelos miRNAs.

miRNA	ALVOS PREDITOS		ALVOS VALIDADOS	ALVOS TOTAIS
	TargetScan	miRDB	mirTarBase	
hsa-miR-141-3p	766	759	192	439
hsa-miR-6726-5p	3390	265	110	305
hsa-miR-4655-5p	605	22	45	40
hsa-miR-6874-5p	2890	212	77	209
hsa-miR-584-5p	2269	185	86	201
hsa-miR-5196-5p	5534	1040	383	1093
hsa-miR-200c-3p	1017	751	336	576
hsa-miR-6851-5p	4196	474	448	659
hsa-miR-4754	434	13	9	18
hsa-miR-513b-3p	3543	553	267	506
hsa-miR-4660	3752	392	95	394
hsa-miR-3065-3p	3671	493	142	495
hsa-miR-6721-5p	5313	1092	286	1039
hsa-miR-7845-5p	3177	426	127	412
hsa-miR-500a-3p	2638	190	174	270
hsa-miR-3621	579	23	29	46
hsa-miR-365b-5p	3389	137	147	186
hsa-miR-345-3p	3801	425	118	422
hsa-miR-6754-5p	4962	669	250	735
hsa-miR-6766-3p	381	175	74	141
hsa-miR-7114-5p	3960	361	94	365
hsa-miR-502-3p	182	197	101	136
hsa-miR-3180	5043	657	159	655
hsa-miR-1234-3p	2101	20	186	174
hsa-miR-8089	4720	722	135	673
hsa-miR-1343-5p	4353	387	256	488
hsa-miR-1238-3p	3805	22	170	155
hsa-miR-4632-5p	4507	777	173	753
hsa-miR-198	3276	268	85	290
hsa-miR-195-5p	1289	1089	1119	1048
hsa-miR-4433a-5p	3080	181	89	215
hsa-miR-6892-5p	2530	275	58	265
hsa-miR-4274	2685	214	68	214
hsa-miR-3138	2457	18	60	48
hsa-miR-1250-5p	647	18	17	15
hsa-miR-3646	6209	1602	289	1476
hsa-miR-550a-5p	3764	419	109	398
hsa-miR-99a-5p	45	27	169	143
hsa-miR-4271	4946	840	307	862
hsa-miR-4485-5p	1809	155	205	295

hsa-miR-6829-5p	4133	468	94	434
hsa-miR-4257	4526	361	544	645
hsa-miR-4430	5624	615	481	851
hsa-miR-3124-5p	175	4	3	7
hsa-miR-4487	4504	475	288	585
hsa-miR-150-3p	2180	295	62	285
hsa-miR-4513	2615	158	128	195
hsa-miR-939-5p	4353	398	263	501
hsa-miR-6858-5p	3875	324	163	387
hsa-miR-6086	3901	152	767	654
hsa-miR-6124	5090	766	257	792
hsa-miR-4497	852	126	47	136
hsa-miR-7110-5p	3635	572	186	654
hsa-miR-6831-5p	2546	314	291	397
hsa-miR-331-3p	201	327	439	460
hsa-miR-7107-5p	2101	20	188	176
hsa-miR-1587	3840	387	63	364
hsa-miR-183-5p	–	376	416	693
hsa-miR-4505	5506	1128	208	1118
hsa-miR-92a-3p	857	496	1750	1588
hsa-miR-151a-5p	10	44	99	80
hsa-miR-22-3p	532	431	203	331
hsa-miR-6785-5p	6719	1413	1069	1833
hsa-miR-1275	4329	1891	216	1596
hsa-miR-1273g-3p	5243	411	596	816
hsa-miR-29b-3p	1064	632	431	590
hsa-miR-100-5p	45	27	275	264
hsa-miR-196b-5p	302	206	219	222
hsa-miR-221-3p	427	316	484	468
hsa-miR-424-5p	1289	1076	868	928
hsa-miR-27a-3p	1199	732	630	764
hsa-miR-24-3p	761	959	990	1158

Em relação à angiogênese, destacam-se processos biológicos preditos como desenvolvimento de vasos e sistema circulatório, morfogênese de vasos, organização da matriz extracelular, regulação positiva da proliferação de células endoteliais e regulação de migração de células endoteliais de vasos sanguíneos (Quadro 3). Dos 52 miRNAs mais expressos pela linhagem LNCaP, dois (3,8%), miR-195-5p e miR-200c-3p, então relacionados a angiogênese. Dos 20 miRNAs mais expressos pela linhagem PC-3, quatro (20%), miR-22-3p, miR-27a-3p,

miR-29b-3p e miR-424-5p, estão relacionados a angiogênese, sendo então seis miRNAs escolhidos para etapa de validação por RT-qPCR.

Quadro 3. Processos biológicos regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens.

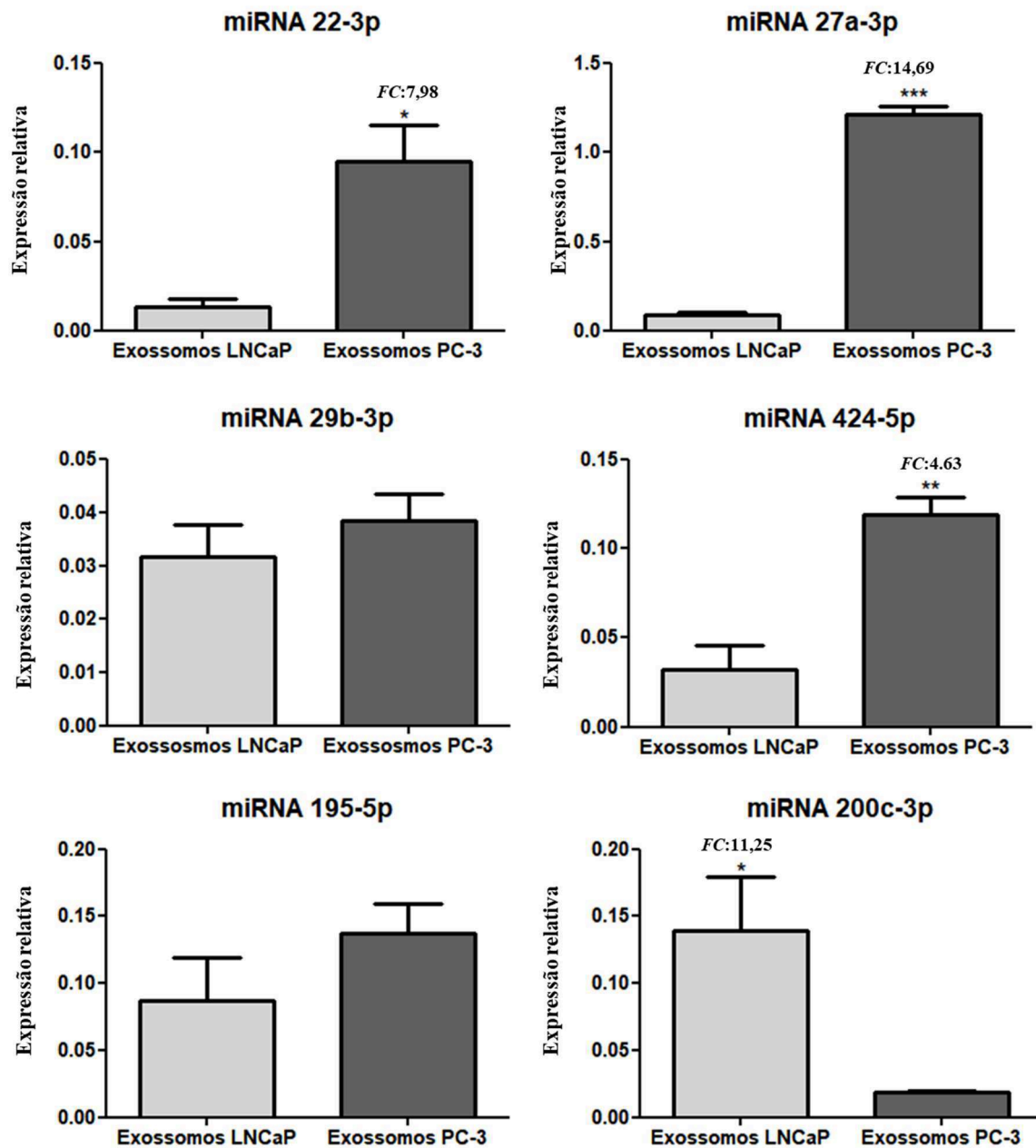
	miRNA	GENE ONTOLOGY – PROCESSO BIOLÓGICO	Nº GENES
LNCaP	hsa-miR-200c-3p	Regulação da migração de células endoteliais de vasos sanguíneos	15
		Regulação da angiogênese	29
		Morfogênese de vasos	32
	hsa-miR-195-5p	Desenvolvimento do sistema circulatório	76
PC-3	hsa-miR-22-3p	Regulação positiva da proliferação de células edoteliais	10
		Regulação positivada migração de células endoteliais de vasos sanguíneos	10
		Morfogênese de tubo	30
		Desenvolvimento do sistema circulatório	34
	hsa-miR-29b-3p	Desenvolvimento de vasos	35
		Organização da matriz extracelular	51
		Desenvolvimento de tubo	49
	hsa-miR-424-5p	Desenvolvimento de vasos	49
		Desenvolvimento de tubo	71
	hsa-miR-27a-3p	Desenvolvimento do sistema circulatório	60
Morfogênese de vasos		39	

5.3 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MIRNAS EXOSSOMAS POR RT-QPCR

Com base nos resultados de microarranjo juntamente aos dados obtidos pela análise de bioinformática, seis miRNAs foram selecionados para a etapa de validação pelo método de RT-qPCR. Deste modo, foram elencados os seguintes miRNAs: miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-29b-3p, miR-424-5p, miR-195-5p e miR-200c-3p, considerando $FC > 2$ e $p < 0,001$.

A avaliação da expressão relativa dos seis miRNAs selecionados foi realizada através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (miR-alvo - miR-endógeno) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) e do teste estatístico t não pareado (*software* GraphPad Prism® 5.0), não sendo observadas diferenças significativas nas expressões dos miR-29b-3p ($p = 0,4970$) e miR-195-5p ($p = 0,2641$). No entanto, os miRNAs, miR-22-3p ($p = 0,0144$), miR-27a-3p ($p < 0,0001$) e miR-424-5p ($p = 0,0065$) apresentaram níveis de expressão significativamente elevados em exossomos derivados da linhagem PC-3 e miR-200c-3p ($p = 0,0270$), com expressão elevada nos exossomos derivados da linhagem LNCaP, confirmando dados obtidos pelo ensaio de microarranjo (Figura 10).

Figura 10. Expressão relativa de miRNAs relacionados a angiogênese em exossomos.



Representação gráfica da expressão relativa de miRNAs calculados pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$ e teste t não pareado. FC: Fold Change utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. miR-22-3p *p = 0,0144, miR-27a-3p ***p < 0,0001, miR-424-5p **p = 0,0065, miR-200c-3p *p = 0,0270.

Estudos mostram a relação da expressão destes miRNAs com efeitos pró e anti angiogênicos. O miR-22-3p está relacionado a hipertrofia (HUANG et al., 2013) e falência cardíaca (GURHA et al., 2013), e pode induzir inflamação em células endoteliais e angiogênese anormal em peixes zebra (GU et al., 2017). O silenciamento do miR-27a-3p impede a angiogênese *in vitro* e *in vivo* e a super expressão está relacionada com a regulação negativa dos inibidores da angiogênese SEMA6A (do Inglês, *Semaphorin 6A*) e SPRY2 (do Inglês,

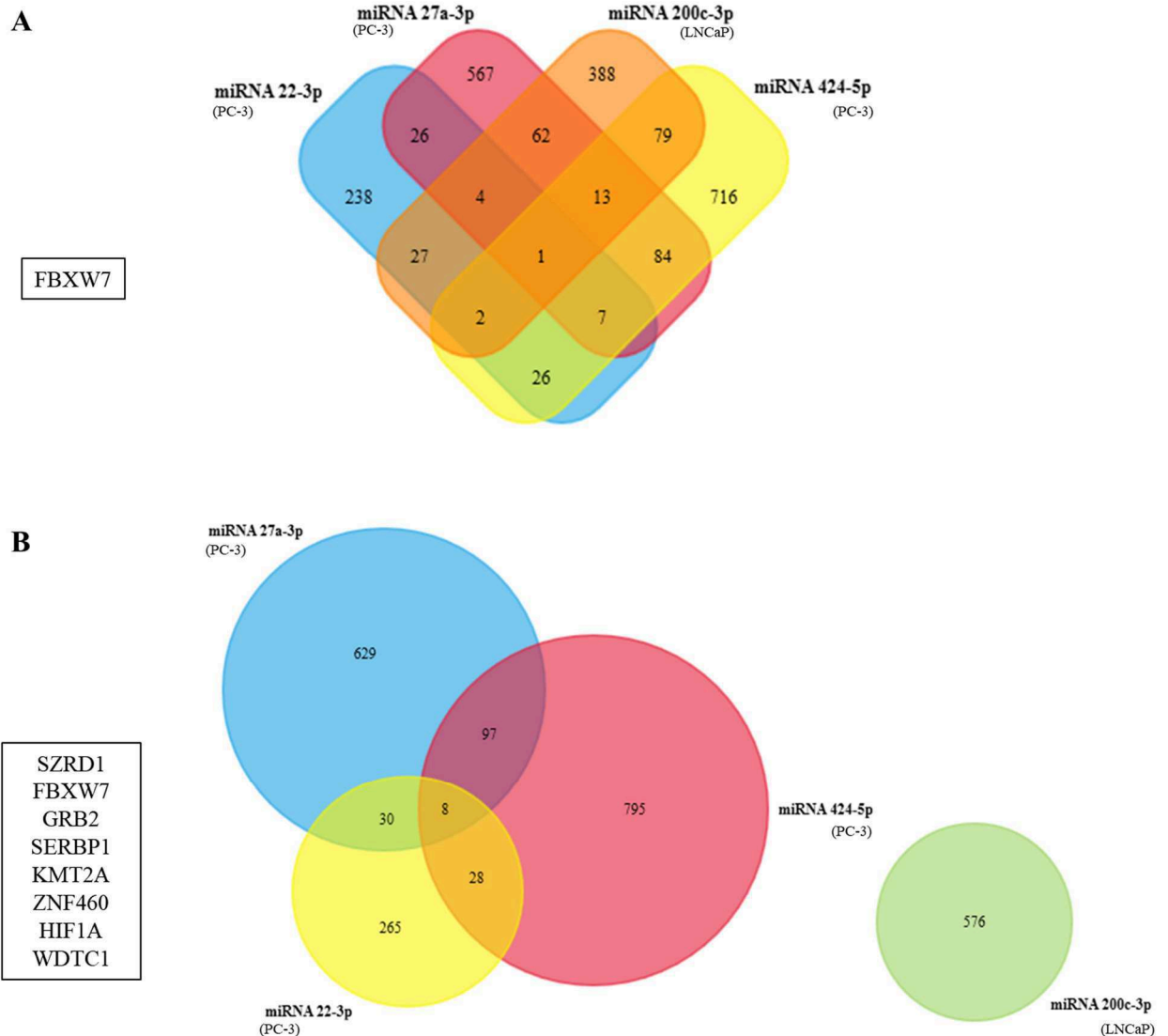
Sprouty RTK Signaling Antagonist 2) (ZHOU et al., 2011). Além disso, efeitos benéficos da super expressão do miR-27a-3p foram observados em modelos de doença isquêmica, restaurando a circulação local (VELICEASA et al., 2015). Ao analisar hemangiomas senis, conhecidos como tumores vasculares, Nakashima e colaboradores (2010) identificaram a baixa expressão do miR-424-5p em tecidos de pacientes, resultando na progressão tumoral e servindo como possível novo alvo terapêutico para a doença.

Alguns estudos demonstram ações pró e antiangiogênicas do miR-200c-3p. A super expressão deste miRNA é observada no câncer endometrial (SNOWDON et al., 2011), além de aumentar a migração e tubulogênese em células endoteliais de câncer pancreático de cultura primária (LI et al., 2015). Entretanto, foi demonstrado por Pecot e colaboradores (2013) que a família do miR-200 inibe a formação de novos vasos ao regular citocinas pró angiogênicas secretadas pelas células tumorais de ovário, pulmão, rim e mama.

5.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DE MIRNAS VALIDADOS

Para identificar genes em comum entre os miRNAs com expressão validada pela técnica de RT-qPCR nos exossomos utilizou-se o *software* FunRich (versão 3.1.3). Em comum entre os quatro miRNAs, de ambas as linhagens, um gene é regulado, o FBXW7 (do Inglês *F-Box and WD repeat domain containing 7*) (Figura 11A). Separando-se, os três miRNAs em comum presentes nos exossomos da linhagem PC-3 apresentam 8 genes em comum, o SZRD1 (do Inglês *SUZ RNA binding domain containing 1*), o GRB2 (do Inglês *growth factor receptor bound protein 2*), o SERPB1 (do Inglês *SERPINE1 mRNA binding protein 1*), o KMT2A (do Inglês *lysine methyltransferase 2A*), o ZNF460 (do Inglês *finger protein 460*), HIF1A (do Inglês *hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*) e o WDTC1 (do Inglês *WD and tetratricopeptide repeats 1*) (Figura 11B).

Figura 11. Diagrama de Venn de genes em comum regulados por miRNAs com expressão validadas em exossomos das linhagens LNCaP e PC-3.



Dos oito genes regulados pelos três miRNAs validados nos exossomos da linhagem PC-3, três estão relacionados com o processo de angiogênese (FBXW7, HIF1A e GRB2). Ainda, o gene FBXW7 também é regulado pelo miR-200c-3p que está mais expresso nos exossomos da linhagem LNCaP.

Particularmente, o gene FBXW7 é um alvo transcricional de p53, codifica a proteína F-box que é essencial na ubiquitinação para degradação de múltiplas oncoproteínas e a perda da respectiva expressão é frequentemente observada em diversos tumores humanos. A análise de mutações realizada em tumores urológicos humanos avaliando amostras de tecido de 18 próstatas, 24 rins e 16 bexigas de pacientes, demonstrou mutações do gene FBXW7 em 5,6% dos tecidos prostáticos 16,7% em rins e 18,8% em bexiga (LIU et al., 2012). A expressão da proteína Fbxw7 analisada por imunohistoquímica é reduzida em gliomas, melanomas e nos tumores de fígado, pulmão, renal, de pâncreas, de pele não melanoma, de testículo e de próstata (UHLEN et al., 2015). Um alvo da proteína Fbxw7 é a via de sinalização Notch, importante na

regulação da proliferação endotelial e angiogênese. Já foi demonstrado que o silenciamento de *Fbxw7* em retina murina e embriões de *zebra fish* aumenta consideravelmente a angiogênese dos modelos, devido a super expressão de Notch e do respectivo alvo ligante *Dll4* (do Inglês *Delta-like 4*) (IZUMI et al., 2012).

Os miRNAs podem ligar-se à região 3'UTR de um gene e direcionar o mRNA para a degradação, evitando a tradução de proteínas, ou a região 5' promovendo a tradução. Já foi demonstrado que o miR-548 liga-se diretamente a região 3'UTR de *FBXW7* e reduz os níveis de mRNA e proteína *FBXW7* (ZHANG et al., 2016). Os miR-223, miR-25, miR-27, miR-32, miR-92, miR-155-3p, miR-182, e miR-503 também parecem ligar-se a região 3'UTR do gene (XU et al., 2010, LERNER et al., 2011; MAVRAKIS et al., 2011; LI et al., 2014, XIA et al., 2017; TANG et al., 2016). A maioria desses miRNAs inibe proteínas alvos de *FBXW7*, como a ciclina E, a *MCL1* (do Inglês *apoptosis regulator, BCL2 family member*), *c-JUN* (do Inglês *JUN proto-oncogene*) e a *c-MYC* (do Inglês *MYC proto-oncogene*).

Já, o *cluster* miR-497~195 é altamente expresso em células endoteliais do sistema esquelético murino *CD31^{hi}Emcn^{hi}* e contribui para a formação de vasos mantendo a atividade de Notch e *HIF-1 α* , ao inibir *Fbxw7* (YANG et al., 2017). O miR-182 tem a expressão inversamente proporcional a expressão de *FBXW7* em células de câncer de mama e a super expressão do miRNA é relacionada a maior invasão das células tumorais e expressão de *HIF-1 α* e *VEGF-A* (CHIANG et al 2016).

Fatores de crescimento e respectivas tirosinas quinases receptoras medeiam diversos processos biológicos que controlam as funções celulares. O gene *GRB2*, em forma de monômero, desempenha um papel fundamental na transdução de sinal na via *MAPK* (do Inglês *mitogen activated protein kinases*), relacionada ao processo oncogênico, e atua inibindo este processo quando está na forma de dímero (AHMED et al., 2015). Em relação a angiogênese, a super expressão de *ADAM12* (do Inglês *a disintegrin and metalloprotease*), pertencente a classe de metaloproteínas ancoradas na membrana, envolvida na clivagem proteolítica da matriz extracelular e liberação de fatores de crescimento e de citocinas. É uma proteína observada em diversos cânceres e interage diretamente com domínios *SH3* do *GRB2* através de sequências ricas em prolina na cauda citoplasmática (GIUBELLINO; BURKE; BOTTARO, 2008).

Em relação à angiogênese, a expressão elevada da proteína ligante de *GRB2*, *GAB2*, promove o aumento do número de vasos sanguíneos e atividade do receptor de *VEGF*, *VEGFR2* em modelos animais de câncer de colón (DING et al., 2017). De forma semelhante, em células

de câncer de ovário, a super expressão da proteína GAB2 aumenta a secreção de quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL8 (do Inglês *chemokine (C-X-C motif) ligand*) e promove a formação de tubos endoteliais (DUCKWORTH et al., 2015). A depleção da proteína GAB2 em células endoteliais também resulta na inibição de migração de células endoteliais via VEGF (CARON et al., 2009)

Adicionalmente, HIF é um fator de transcrição classicamente associado à angiogênese por regular a expressão de genes, como VEGF, associados à adaptação a pressão de oxigênio reduzida, sendo que o aumento da expressão do gene é observada na maioria dos cânceres de próstata (ZHONG et al, 1998; EISERMANN; FRAIZER, 2017). O gene é expresso pela linhagem celular PC-3 mesmo em condições normais de oxigênio, por conter uma região de alta amplificação na região cromossômica que abriga o gene (SARAMÄKI et al., 2001). Em amostras de 149 tecidos provenientes de prostatectomia radical foi demonstrada a correlação na expressão de HIF-1 α e HIF-2 α , AR e VEGF, demonstrando que andrógenos usam, pelo menos em parte, a via da hipóxia para controlar os níveis de expressão de VEGF no câncer de próstata (BODDY, 2005).

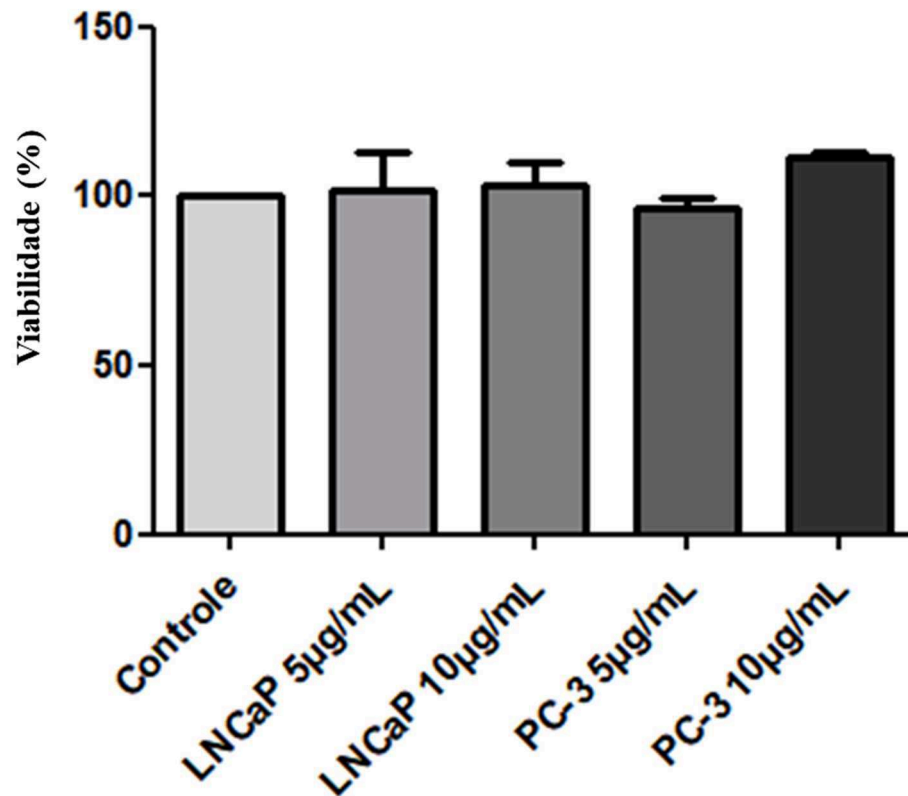
5.5 ENSAIOS CELULARES

5.5.1 Viabilidade celular

O efeito de exossomos na viabilidade de células endoteliais HUVEC foi avaliado pelo ensaio de Alamar Blue, com a exposição da linhagem a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos por 24h. Estas condições foram determinadas pois estudos demonstram que células de câncer de próstata DU145 apresentam maior capacidade de degradar matriz extracelular quando expostas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos derivados de linhagem DU145 resistente a docetaxel (KHARAZIHA et al., 2015). Também é observado aumento da proliferação e angiogênese de células endoteliais HUVEC expostas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos derivados da linhagem celular de cardiomiócitos H9C2 (GARCIA et al., 2015).

Assim, foi realizado ensaio de viabilidade, não sendo observada diferença significativa na presença de exossomos tumorais nas condições utilizadas (Figura 12) e, portanto sendo escolhida a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos para os demais experimentos, por ser uma concentração que não altera a viabilidade celular, permite o uso racional das amostras e já foi descrita na literatura.

Figura 12. Viabilidade celular de células endoteliais HUVEC expostas a exossomos.



Representação gráfica da viabilidade celular (em porcentagem) pelo método de Alamar Blue. Células HUVEC expostas a 5 e 10 µg/mL de exossomos por 24h em meio de cultura RPMI com 10% SFB depletado de vesículas em comparação ao controle sem exossomos (definido como 100%). Teste estatístico Anova de uma via ($p = 0,5760$), $N=2$.

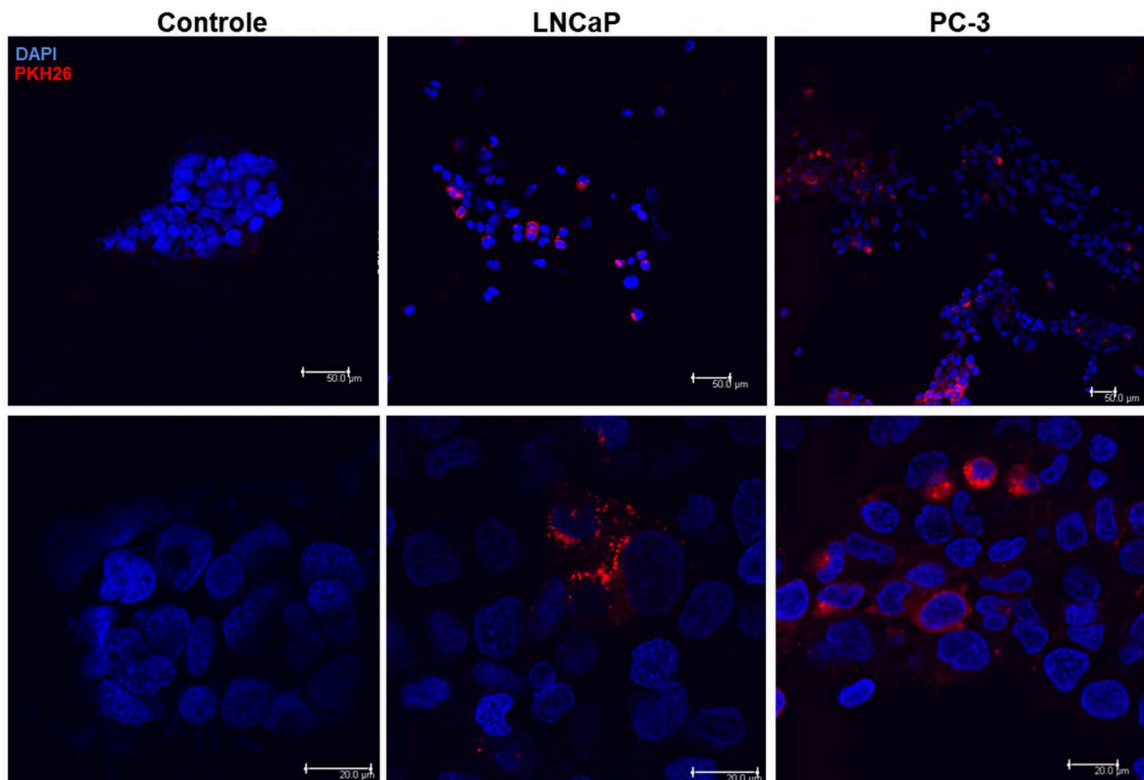
A não alteração na viabilidade celular por exossomos de linhagens tumorais na linhagem endotelial HUVEC é interessante, uma vez que já foi demonstrado que a linhagem celular de câncer de próstata LNCaP tem a proliferação aumentada quando exposta a 50 e 100 µg/mL de seus próprios exossomos e da linhagem independente a andrógenos DU145, enquanto estes diminuem a viabilidade de células do epitélio não tumoral da próstata RWPE-1 (HOSSEINI-BEHESHTI et al., 2016). Exossomos da linhagem LNCaP também aumentam a proliferação de osteoblastos (células hFOB1.19) após exposição por 4h (LI et al., 2019). O efeito em osteoblastos primários humanos também é observado após exposição a exossomos da linhagem PC-3 (INDER et al., 2014), sugerindo que nas condições utilizadas, o conteúdo de miRNAs pode exercer efeito em células endoteliais por outras vias, além da proliferação celular, que parece estar relacionada a sinalização autócrina e metastática.

5.5.2 Marcação e internalização dos exossomos

A atuação dos miRNAs contidos em exossomos em aspectos da via angiogênica depende da possibilidade de interação das vesículas com diversas células. Ao atuarem na comunicação extracelular, exossomos secretados por um tipo celular devem ser capazes de interagir com outros tipos celulares, produzindo respostas moleculares e fisiológicas.

Para validar *in vitro* a interação de exossomos prostáticos com células endoteliais, a linhagem HUVEC foi exposta a exossomos marcados com o corante de membrana celular PKH26 na concentração definida para os demais ensaios (10 µg/mL) durante 4h. Na figura 13, observa-se os núcleos das células endoteliais marcados em azul pelo corante DAPI, e exossomos das linhagens LNCaP e PC-3 em vermelho, com localização citoplasmática. Esta abordagem permitiu concluir que exossomos das linhagens prostáticas são internalizados pela linhagem endotelial HUVEC.

Figura 13. Microscopia confocal de exossomos internalizados.



Imagens de microscopia confocal de exossomos isolados derivados das linhagens LNCaP e PC-3, corados com PKH26 (vermelho) e internalizados por células HUVEC (fixadas e coradas com DAPI, núcleo azul), após 4h de exposição. Barra de escala nas imagens superiores: 50 µm. Barra de escala nas imagens inferiores: 20 µm.

Assim como a biogênese e a liberação de exossomos pelas células doadoras, a captura de exossomos e a internalização pelas células alvo é altamente regulada e depende das

condições locais, dos tipos de células doadoras e células alvo (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015), podendo ocorrer através de diferentes mecanismos, incluindo endocitose mediada por receptor, pinocitose, fagocitose e fusão direta com a membrana plasmática (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Por exemplo, sabe-se que exossomos derivados da linhagem PC-3 são captados por células epiteliais sadias em maior quantidade que os exossomos derivados da linhagem LNCaP (BIJNSDORP et al., 2013).

A capacidade de células HUVEC internalizarem exossomos demonstrada no presente estudo corrobora com dados já publicados na literatura de células endoteliais internalizarem exossomos próprios marcados com o corante PKH26 (DURAK-KOZICA et al., 2018), e também de outras origens celulares como exossomos secretados pela linhagem de carcinoma hepatocelular HepG2 (YUKAWA et al., 2018), de leucemia mielóide crônica LAMA84 (TAVERNA et al., 2014) e de células tronco derivadas de tecido adiposo (XU et al., 2019). Adicionalmente, demonstra-se aqui, pela primeira vez, a internalização de exossomos derivados de ambas as células de câncer de próstata por células endoteliais HUVEC.

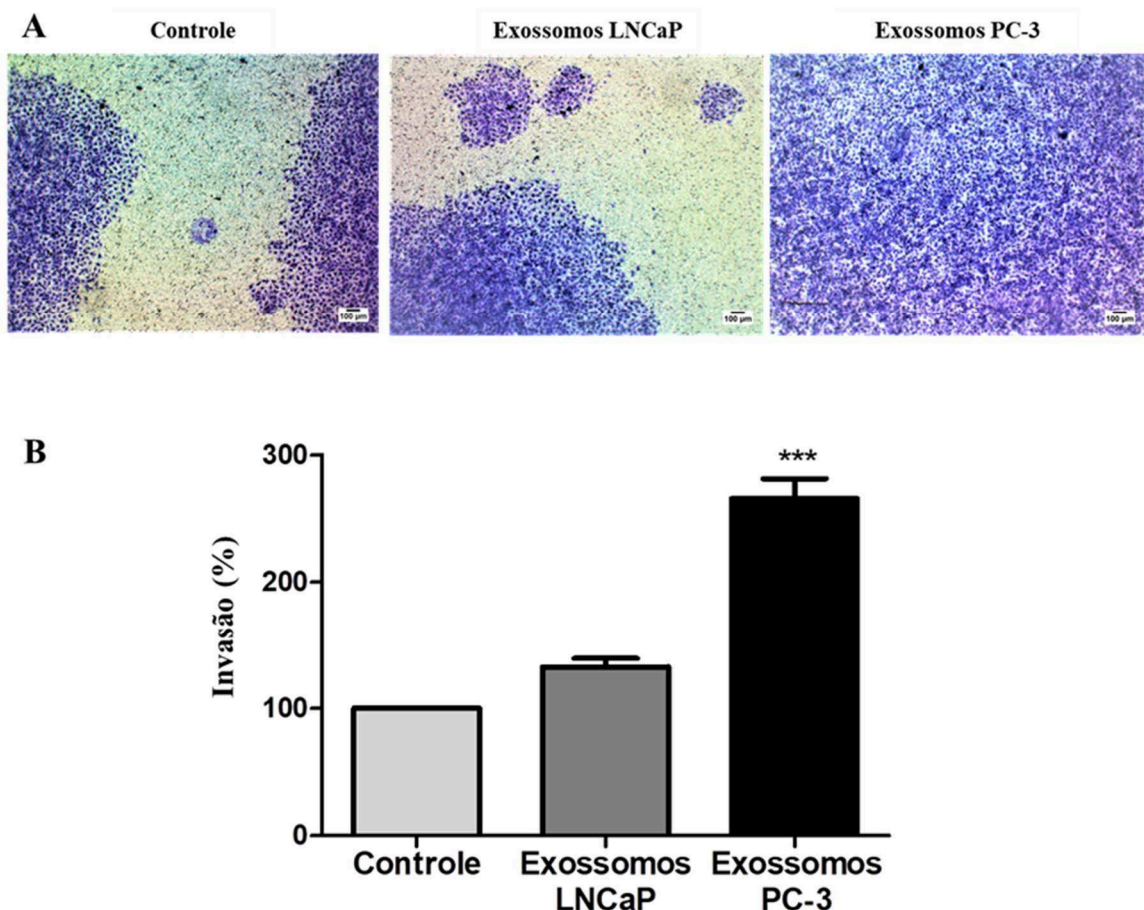
5.5.3 Invasão celular

Uma vez que alguns miRNAs contidos em exossomos das linhagens de câncer de próstata LNCaP e PC-3 parecem atuar em processos biológicos relacionados a angiogênese e são internalizados por células endoteliais, foi realizado o ensaio de invasão celular em *inserts* com poros de 8 μm preparados com membrana basal reconstituída Matrigel[®] que, associada a diferença de gradiente de nutrientes entre as partes superiores e inferiores do *insert* mimetizam o processo de invasão e degradação da matriz extracelular observado na formação de vasos *in vivo*.

Após 72h de incubação com 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos, células endoteliais que atravessaram o *insert* foram fixadas com glutaraldeído 5%, coradas com cristal violeta 0,5% e observadas em microscópio Nikon Eclipse TS100 (Melville, NY, USA), havendo uma maior quantidade de células na condição expostas aos exossomos da linhagem PC-3 (Figura 14A). Em seguida, as membranas contendo as células coradas foram retiradas do *insert* e eluídas em ácido acético 33% e absorvância quantificada em espectrofotômetro de fluorescência Perkin-Elmer LS55 (Boston, Massachusetts, USA). Considerando os valores de absorvância da condição controle como 100%, observa-se um significativo aumento na capacidade de invasão

de células endoteliais expostas a exossomos da linhagem independente a andrógeno PC-3 (Figura 14B).

Figura 14. Ensaio de invasão de células HUVEC expostas a exossomos das linhagens LNCaP e PC-3.



Ensaio de invasão com células endoteliais HUVEC. As células foram plaqueladas em *insert* com meio RPMI contendo exossomos (10 µg/mL), incubação por 72h. Abaixo do *insert*, no poço da placa, presença de RPMI suplementado com 10% SFB. (A) Fotografia de células capazes de atravessar o *insert*, fixadas com glutaraldeído 5% e coradas com cristal violeta 0,5%. Barra de escala nas imagens: 100 µm. (B) Representação gráfica das absorvâncias das membranas contendo células coradas e eluídas em ácido acético 33%. Absorvância do controle considerada como 100%. Teste estatístico Anova de uma via *** $p < 0,0001$. N = 2.

O objetivo na comunicação de células cancerígenas com células do estroma por exossomos é modificar o microambiente para favorecer a progressão tumoral local e a distância (SHIAO; CHU; CHUNG, 2016). Uma das principais mudanças durante o desenvolvimento tumoral é a transição de um estroma simples, com habilidades de suporte, para um estroma reativo capaz de favorecer a proliferação de células cancerígenas e a disseminação metastática (TRIPATHI; BILLET; BHOWMICK, 2012). Essa transição é acompanhada por alterações em componentes estromais como a natureza e proporção das células imunes, os componentes

proteicos da matriz extracelular, angiogênese, etc. (CASTELLANA et al., 2009; RAMTEKE et al., 2013; WEBBER et al., 2014). Essas modificações já foram relacionadas à diferenciação do câncer de próstata (escore de Gleason) e ao tempo de sobrevivência (HÄGGLÖF; BERGH, 2012).

Exossomos de linhagens de câncer de próstata são enriquecidos de metaloproteinases MMP9 e MMP14, possivelmente através do estímulo para fosforilação de ERK1/2 (CASTELLANA et al., 2009) e parecem ser capazes de degradar a matriz extracelular através de modificações das próprias enzimas proteolíticas de superfície, diminuindo dipeptidil peptidase IV (DPPIV, do Inglês *dipeptidyl peptidase IV*), aumento de plasminogênio ativador de uroquinase (UPA, do Inglês *urokinase plasminogen activator*) e catepsina B (BELLEZZA et al., 2005). Como as MMPs também estão envolvidas na angiogênese, um efeito direto da secreção de exossomos por células de câncer de próstata na angiogênese é sugerido (VLAEMINCK-GUILLEM, 2018), e estudos posteriores são necessários para avaliar expressão de MMPs e seus inibidores TIMPs, uma vez que segundo as análises de bioinformática realizadas, o miR-22-3p regula a MMP14 e miR-27a-3p regula a MMP13.

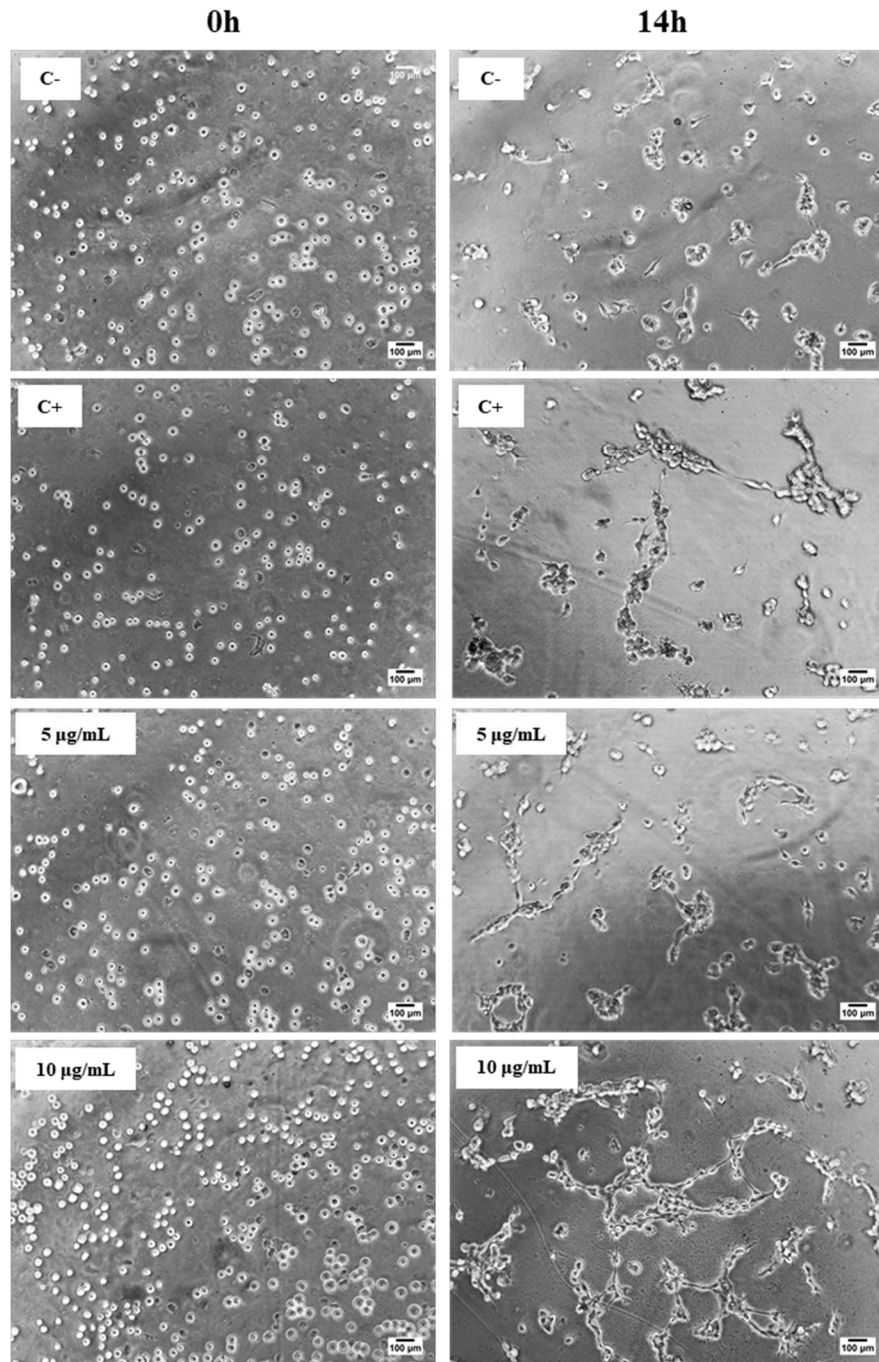
Exossomos estão também relacionados indiretamente a angiogênese, atuando na invasão celular. Neste sentido, já foi relatado que miofibroblastos ativados por TGF- β de exossomos tumorais modulam o comportamento de células endoteliais, levando a formação de estruturas semelhantes a vasos mais ramificadas e elaboradas, além de conectadas a vasos vizinhos (WEBBER et al., 2014); que fibroblastos de cultura primária em co-cultivo com linhagem de câncer de próstata LNCaP exibem aumento da secreção de VEGF (ISHII et al., 2011); e que exossomos da linhagem independente a andrógenos DU145 aumentam significativamente a capacidade de invasão de células HUVEC em concentrações superiores a 5 $\mu\text{g/mL}$ (KIM et al., 2002). Já, no presente estudo, demonstramos que exossomos da linhagem independente a andrógenos PC-3 conferem com maior eficiência do que exossomos derivados da linhagem responsiva a andrógenos LNCaP, um caráter mais invasivo às células endoteliais, sugerindo uma maior capacidade de formação de novos vasos para crescimento e manutenção tumoral, relacionado à maior agressividade desta condição da doença.

5.5.4 Tubulogênese

Uma vez que as células endoteliais adquiriram caráter mais invasivo após exposição à exossomos da linhagem PC-3, foi realizado o ensaio de tubulogênese, em que a linhagem

celular HUVEC foi exposta a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos em meio de cultura RPMI por 14h. Os resultados estão mostrados na Figura 15.

Figura 15. Formação de tubo de células endoteliais.



Análise da habilidade de células endoteliais HUVEC formarem estruturas semelhantes a vasos. Células endoteliais da linhagem HUVEC, foram incubadas na presença de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos derivados da célula de câncer de próstata independente de andrógenos PC-3 em meio RPMI sem soro. Controle negativo (C-): meio RPMI sem soro. Controle positivo (C+): meio RPMI suplementado com 10% SFB. Imagens em 0h e 14h após semeadura.

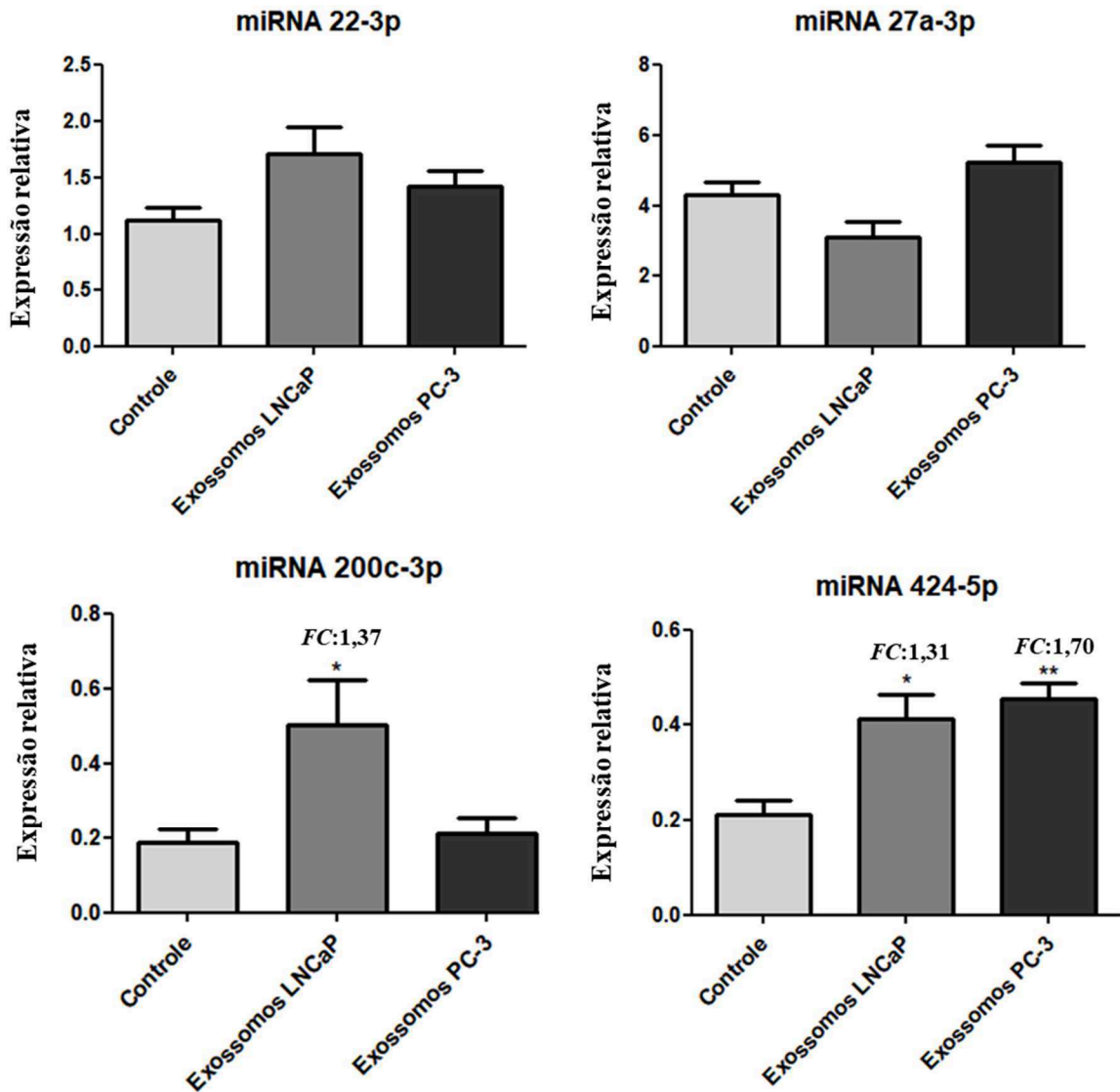
As imagens da placa ao longo do período de incubação permitiram o acompanhamento da formação e identificação de estruturas semelhantes a vasos sanguíneos formadas pelas células endoteliais após 14h de exposição aos exossomos da linhagem PC-3. A formação de estruturas semelhantes a vasos na presença de 5 µg/mL de exossomos é mais característica do que na condição do controle negativo, e ainda mais evidenciada na presença de 10 µg/mL de exossomos. Nesta condição, é observada a organização celular para formação de lúmens ao longo de “cordões” de células endoteliais, sendo a formação de lúmens essencial no tumor *in vivo* para o suporte do crescimento e viabilidade do tecido através da circulação sanguínea (XU; CLEAVER, 2011).

A capacidade de formação tubular ser influenciada por exossomos secretados por células tumorais já é descrita para linhagens de câncer de bexiga (BECKHAM et al., 2014), de pulmão (HSU et al., 2017), melanoma (EKSTRÖM et al., 2014), renal (ZHANG et al., 2013) e leucemia (MINEO et al., 2011) e neste trabalho a formação de estruturas semelhantes a vasos na presença de exossomos de câncer de próstata indica o potencial efeito angiogênico das vesículas, possivelmente mediado por miRNAs exossomais.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MIRNAS POR RT-QPCR EM CÉLULAS HUVEC

Afim de melhor compreender a mudança no comportamento invasivo das células endoteliais, foi realizada a análise da expressão dos miRNAs angiogênicos nas células HUVEC após incubação com exossomos isolados das diferentes linhagens de câncer de próstata. Para isto, células HUVEC foram expostas a 10 µg/mL de exossomos por 48h. Após, o RNA total das células foi extraído e realizado o ensaio de RT-qRT para os miRNAs com expressão já validada anteriormente (miR-22-3p, miR-27a-3p, miR-424-5p e miR-200c-3p) (Figura 16).

Figura 16. Expressão relativa de miRNAs relacionados a angiogênese em células endoteliais HUVEC.



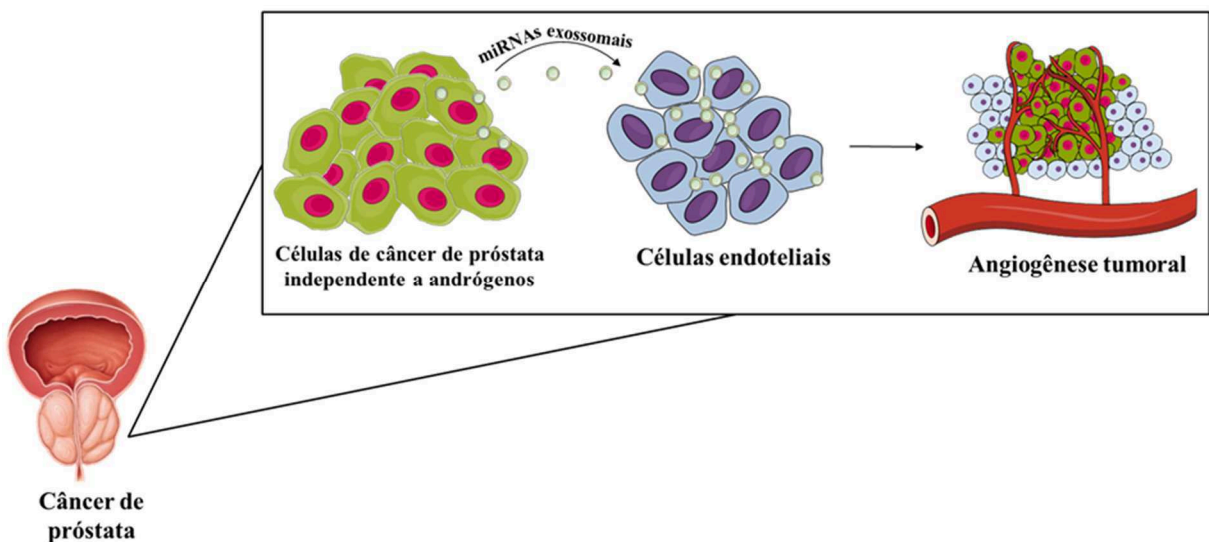
Representação gráfica da expressão relativa de miRNAs calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *FC*: Fold Change utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Teste estatístico t não pareado em relação ao controle. miR-200c-3p * $p = 0,0232$, miR-424-5p * $p = 0,0254$, ** $p = 0,0060$.

As células da linhagem HUVEC expostas aos exossomos da linhagem LNCaP apresentam expressão aumentada do miR-200c-3p ($p = 0,0369$), resultado não observado quando realizada a exposição com os exossomos da linhagem PC-3. Como apresentado anteriormente, este miRNA está aumentado nos exossomos da linhagem LNCaP, sugerindo que a alteração no perfil de expressão da HUVEC é decorrente da transferência do conteúdo exosomal.

Os miRNAs miR-22-3p e miR-27a-3p, aumentados nos exossomos da linhagem PC-3, não apresentam diferença de expressão das células após exposição aos exossomos, podendo

indicar que não foram transferidos ou que não foram detectados no momento da análise, devido a quantidade presente nos exossomos ou tempo decorrido da exposição. As células endoteliais apresentam elevada expressão do miR-424-5p após exposição aos exossomos das linhagens LNCaP ($p = 0,0254$) e PC-3 ($p = 0,0060$), indicando a transferência de conteúdo exossomal. Entretanto, o miR-424-5p é mais expresso por exossomos da linhagem PC-3 e a expressão em ambas as condições de exposição pode estar relacionada a uma incorporação mais eficiente de exossomos da linhagem LNCaP por células endoteliais HUVEC.

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que os exossomos da linhagem independente de andrógenos PC-3 influenciam no comportamento de células endoteliais HUVEC, tornando-as mais invasivas, estando em consonância com dados da literatura que mostram uma maior atividade angiogênica em tumores independentes de andrógeno. A análise de bioinformática mostrou que há mais miRNAs angiogênicos nos exossomos da linhagem PC-3 do que em exossomos da linhagem LNCaP. Além disto, foi demonstrado que os miRNAs 22-3p, 27-3p e 424-5p regulam os genes FBXW7, HIF1A e GRB2 já relacionados com a angiogênese. De maneira geral, a expressão alterada de um único miRNA pode não ser suficiente para identificar o mecanismo para a maior agressividade e potencial invasivo do câncer de próstata independente de andrógenos, uma vez que o câncer é uma doença complexa, mas contribui para o entendimento da mesma e direciona a novas abordagens de pesquisa.



6 CONCLUSÕES

Através dos resultados listados,

- Exossomos foram isolados do sobrenadante celular das linhagens de câncer de próstata LNCaP e PC-3 e caracterizados com sucesso;
- Foram identificados 72 miRNA diferencialmente expressos entre os exossomos das linhagens LNCaP e PC-3 pela técnica de microarranjo;
- Foram identificados 6 miRNAs exossomais relacionados a processos angiogênicos por análise de bioinformática;
- A validação da expressão por RT-qPCR confirmou que os miRNAs miR-22-3p, miR-27a-3p e miR-424-5p estão diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 e miR-200c-3p está diferencialmente expresso nos exossomos da linhagem tumoral LNCaP;
- Os miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos da linhagem tumoral PC-3 podem regular os genes FBXW7, HIF1A e GRB2 relacionados a progressão tumoral e angiogênese;
- As células endoteliais HUVEC são capazes de internalizar os exossomos das linhagens PC-3 e LNCaP, sem alterar a viabilidade celular das células HUVEC;
- As células endoteliais HUVEC apresentam comportamento mais invasivo depois de expostas aos exossomos da linhagem independente de andrógenos PC-3 do que quando expostas aos exossomos da linhagem responsiva a andrógenos LNCaP;
- As células HUVEC formam estruturas semelhantes de vasos na presença de exossomos da linhagem PC-3;
- A expressão do miR-424-5p é aumentada em células HUVEC após exposição a exossomos das linhagens LNCaP e PC-3 durante 48h;
- A expressão do miR-200c-3p é aumentada em células HUVEC após exposição a exossomos da linhagem LNCaP durante 48h,

Conclui-se que este estudo foi capaz de evidenciar o caráter mais invasivo que as células endoteliais adquirem sob influência das células de câncer de próstata com proliferação independente a andrógenos, possivelmente mediado por miRNAs exossomais e pode contribuir para novas pesquisas para o entendimento da doença e de alvos terapêuticos para o tratamento do câncer de próstata independente a andrógenos.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar a influência dos exossomos da linhagem LNCAP sobre a capacidade de tubulogênese da linhagem endotelial HUVEC;
- ✓ Quantificar metaloproteinases de matriz e fator crescimento endotelial vascular (VEGF) após exposição da linhagem endotelial aos exossomos;
- ✓ Verificar experimentalmente a regulação dos genes FBXW7, HIF1A e GRB2 por miR-22-3p, miR-27a-3p, e miR-424-5p.

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.
- AHMED, Z. et al. Grb2 monomer–dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 2015.
- 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, 2004.
- ANOOPKUMAR-DUKIE, S. et al. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. **The British Journal of Radiology**, v. 78, n. 934, p.945-947, 2005.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Bula profissional bevacizumabe**. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=21231622016&pIdAnexo=3769288 > Acesso em 08 jun. 2019.
- ARORA, R. et al. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. **Cancer**, v. 100, n. abril, p. 2362–2366, 2004.
- ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p.25-29, 2000.
- BAIETTI, M. F. et al. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 7, p.677-685, 2012.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.
- BAKER, M. Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. **Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 1, p.121-127, 2002.
- 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.
- BECKHAM, C. J. et al. Bladder Cancer Exosomes Contain EDIL-3/Del1 and Facilitate Cancer Progression. **Journal of Urology**, v. 192, n. 2, p.583-592, 2014.
- BELLEZZA, I. et al. Extracellular matrix degrading enzymes at the prostatesome surface. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 8, n. 4, p.344-348, 2005.
- BODDY, J. L. The Androgen Receptor Is Significantly Associated with Vascular Endothelial Growth Factor and Hypoxia Sensing via Hypoxia-Inducible Factors HIF-1a, HIF-2a, and the

Prolyl Hydroxylases in Human Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 21, p.7658-7663, 2005.

BOTELHO, F. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and prostate pathology. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 36, n. 4, p.430-438, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. Câncer da próstata. Rio de Janeiro. p. 20
BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 498, DE 11 DE MAIO DE 2016.**
Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. Brasília, DF.
Brasil, 2016.

BREKKEN, R. A. et al. Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor 2 (KDR/Flk-1) Activity by a Monoclonal Anti-VEGF Antibody Blocks Tumor Growth in Mice. **Cancer Research**, v. 60, n. 18, p.5117-5124, 2000.

BIJNSDORP, I. V. et al. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p.22097-22108, 2013.

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, Y. et al. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 7, n. 4, p.147-154, 2009.

CASTELLANA, D. et al. Membrane Microvesicles as Actors in the Establishment of a Favorable Prostatic Tumoral Niche: A Role for Activated Fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 Axis. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p.785-793, 2009.

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.

CARON, C. et al. Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 6, p.943-953, 2009.

CHIANG, C. H. et al. MiR-182 promotes proliferation and invasion and elevates the HIF-1 α -VEGF-A axis in breast cancer cells by targeting FBXW7. **American Journal of Cancer Research**, v. 8, n. 6, p.1785-1798, 2016.

CHING, K. Z. et al. Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 126, n. 2, p.151-158, 1993.

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

CHOU, C. et al. MiRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, 2017.

CLAYTON, A. et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 16, p.3631-3638, 2005.

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, 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.

CORRÊA, R. L. et al. **Abordagens computacionais e moleculares para identificação de alvos de microRNAs**. In: LORETO, É. L. S. (Ed.). *Introdução ao mundo dos microRNAs*. Ribeirão Preto, SP, 2015.

COSTA-SILVA, B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 6, p.816-826, 2015.

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, Renty B.. Effect of prolactin on the prostate. **The Prostate**, v. 24, n. 3, p.162-166, 1994

CREEMERS, E. E.; TIJSEN, A. J.; PINTO, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 483-495, 2012.

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.

CVETKOVIC, D. et al. Increased hypoxia correlates with increased expression of the angiogenesis marker vascular endothelial growth factor in human prostate cancer. **Urology**, v. 57, n. 4, p.821-825, 2001.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p.57-74, 2018.

DARRINGTON, E. et al. Vascular endothelial growth factor A, secreted in response to transforming growth factor- β 1 under hypoxic conditions, induces autocrine effects on migration of prostate cancer cells. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p.745-751, 2012.

DEB, S. et al. Characterization of Precursor-Dependent Steroidogenesis in Human Prostate Cancer Models. **Cancers**, v. 10, n. 10, p.343-357, 2018.

- DING, C. et al. Elevated Gab2 induces tumor growth and angiogenesis in colorectal cancer through upregulating VEGF levels. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p.56-67, 2017.
- DO AMARAL, A. E. et al. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 274-287, 2018.
- DOLL, J. A. et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. **The Prostate**, v. 49, n. 4, p.293-305, 2001.
- DOW, J. K; WHITE, R. W. D. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. **Urology**, v. 55, n. 6, p.800-806, 2000.
- DUCKWORTH, C et al. Overexpression of GAB2 in ovarian cancer cells promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating chemokine expression. **Oncogene**, v. 35, n. 31, p.4036-4047, 2015.
- DURAK-KOZICA, M. et al. 3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 23, n. 1, 2018.
- EISERMANN, K.; FRAIZER, G. The Androgen Receptor and VEGF: Mechanisms of Androgen-Regulated Angiogenesis in Prostate Cancer. **Cancers**, v. 9, n. 12, p.32-42, 2017.
- EKSTRÖM, E. J et al. WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p.88-103, 2014.
- EMBERTON, M. et al. Progression of benign prostatic hyperplasia: systematic review of the placebo arms of clinical trials. **Bju International**, v. 102, n. 8, p.981-986, 2008.
- EPSTEIN, J. I. et al. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 5, p. 368–374, 1994.
- FOLKMAN, J. Transplacental Carcinogenesis by Stilbestrol. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 7, p.404-405, 1971.
- FRADET, Y. et al. IL-8 secretion in primary cultures of prostate cells is associated with prostate cancer aggressiveness. **Research and Reports in Urology**, v. 9, n. 6, p. 27–34, 2014.
- 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, 2010.
- GALBRAITH, S. M.; DUCHESNE, G. M. Androgens and prostate cancer: Biology, pathology and hormonal therapy. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 4, p.545-554, 1997.

- GARCIA, N. A. et al. Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. **Plos One**, v. 10, n. 9, p.138849-138849, 2015.
- GIUBELLINO, A.; BURKE, T. R; BOTTARO, D. P. Grb2 signaling in cell motility and cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 12, n. 8, p.1021-1033, 2008.
- GUAN, B. et al. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits tumor angiogenesis via targeting the mTOR component RICTOR in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p.8132-8172, 2016.
- GU, W. et al. MicroRNA-22 regulates inflammation and angiogenesis via targeting VE-cadherin. **FEBS Letters**, v. 591, n. 3, p.513-526, 2017.
- GUO, K. et al. Loss of miR-26a-5p promotes proliferation, migration, and invasion in prostate cancer through negatively regulating SERBP1. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p.12843-12854, 2016.
- GURHA, P. et al. MicroRNA-22 Promotes Heart Failure through Coordinate Suppression of PPAR/ERR-Nuclear Hormone Receptor Transcription. **Plos One**, v. 8, n. 9, p.1-10, 2013.
- HÄGGLÖF, C.; BERGH, A. The Stroma—A Key Regulator in Prostate Function and Malignancy. **Cancers**, v. 4, n. 2, p.531-548, 2012.
- HIRST, C. J.; CABRERA, C.; KIRBY, M. Epidemiology of castration resistant prostate cancer: A longitudinal analysis using a UK primary care database. **Cancer Epidemiology**, v. 36, n. 6, p.349-353, 2012.
- HIFU CLINIC. **Prostaty Rysunek**. Disponível em <<https://hifuclinic.eu/prostaty-rysunek>>. Acesso em 10 jul. 2019
- HOLLANDER, M. C.; BLUMENTHAL, G. M.; DENNIS, P. A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 4, p.289-301, 2011.
- 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.
- HSU, Y. et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. **Oncogene**, v. 36, n. 34, p.4929-4942, 2017.

HUSE, J. T. et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. **Genes & Development**, v. 23, n. 11, p.1327-1337, 2009.

HUANG, Z. et al. MicroRNA-22 Regulates Cardiac Hypertrophy and Remodeling in Response to Stress. **Circulation Research**, v. 112, n. 9, p.1234-1243, 2013.

IIVANAINEN, E. Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 12, p.1609-1621, 2003.

INDER, K. L. et al. Cavin-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p.23784-23823, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018**. 2018.

ISAACSON, W. K.; JONES, S. J.; KRUEGER, R. J. Testosterone, dihydrotestosterone, trenbolone acetate, and zeranol alter the synthesis of cortisol in bovine adrenocortical cells. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 7, p.1771-1777, 1993.

ISHII, K. et al. Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 12, p.3604-3611, 2011.

ITTMANN, M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 5, p.030346-303, 2017.

IZUMI, N. et al. Fbxw7 Controls Angiogenesis by Regulating Endothelial Notch Activity. **Plos One**, v. 7, n. 7, e.41116, 2012.

JUNG, M. K.; MUN, J. Y. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. **Journal of Visualized Experiments**, n. 13, e564824, 2018.

KHARAZIHA, P. et al. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p.21740-21754, 2015.

KIM C. W. et al. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. **Cancer Res**, v. 21, n. 62, p. 6312-7, 2002.

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, 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, 2013.

- KYPRIANOU, N. Doxazosin and Terazosin Suppress Prostate Growth by Inducing Apoptosis: Clinical Significance. **Journal of Urology**, v. 169, n. 4, p.1520-1525, 2003.
- LERNER, M. et al. MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression. **Cell Cycle**, v. 10, n. 13, p.2172-2183, 2011.
- LI, L.ei et al. MiR-139 and miR-200c regulate pancreatic cancer endothelial cell migration and angiogenesis. **Oncology Reports**, v. 34, n. 1, 2015.
- LI, L. et al. Sequential expression of miR-182 and miR-503 cooperatively targets FBXW7, contributing to the malignant transformation of colon adenoma to adenocarcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 4, p.488-501, 2014.
- LI, S.et al. Exosomes from LNCaP cells promote osteoblast activity through miR-375 transfer. **Oncology Letters**, p.4463-4473, 2019.
- LIN, X. et al. Hepatocellular Carcinoma Cell-Secreted Exosomal MicroRNA-210 Promotes Angiogenesis In Vitro and In Vivo. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 11, p.243-252, 2018.
- LIN, Z. et al. MicroRNA-30d promotes angiogenesis and tumor growth via MYPT1/c-JUN/VEGFA pathway and predicts aggressive outcome in prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, 2017.
- LIU, Y. et al. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. **Cancer Letters**, v. 370, n. 1, p.125-135, 2016.
- LIU, Y. et al. Multiple Novel Alternative Splicing Forms of FBXW7 α Have a Translational Modulatory Function and Show Specific Alteration in Human Cancer. **Plos One**, v. 7, n. 11, p.49453-49457, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v.193, p. 265-275, 1951.
- LYTLE, J. R.; YARIO, T. A.; STEITZ, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 104, n. 23, p.9667-9672, 2007.
- MAIA, J. et al. Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v 6, 2018.
- MALIK, R. et al. Targeting the MLL complex in castration-resistant prostate cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 4, p.344-352, 30 mar. 2015.

- 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.
- MAVRAKIS, K. J. et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). **Nature Genetics**, v. 43, n. 7, p.673-678, 2011.
- MCCANN, J. V. et al. Endothelial miR-30c suppresses tumor growth via inhibition of TGF- β -induced Serpine1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 4, p.1654-1670, 2019.
- MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **The Prostate**, v. 2, n. 1, p.35-49, 1981.
- MELNYK, O. et al. Neutralizing Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Inhibits Further Growth Of Established Prostate Cancer And Metastases In A Pre-Clinical Model. **Journal of Urology**, v. 161, n. 3, p.960-963, 1999.
- MI, H. et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p.183-189, 2016.
- MINCIACCHI, V. R.; FREEMAN, M. R.; VIZIO, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, 2015.
- MINEO, M. et al. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a src-dependent fashion. **Angiogenesis**, v. 15, n. 1, p.33-45, 2011.
- MITTERBERGER, M. et al. Ultrasound of the prostate. **Cancer Imaging**, v. 10, n. 1, p.30-48, 2010.
- 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.
- MORETTI, F.; THERMANN, R.; HENTZE, M. W. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. **RNA**, v. 16, n. 12, p.2493-2502, 2010.
- MOTTET, N. et al. Guidelines on prostate cancer. **European Association of Urology**; 2016.
- MU, P. et al. Genetic dissection of the miR-17 92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. **Genes & Development**, v. 23, n. 24, p.2806-2811, 2009.
- NAKASHIMA, T. et al. Down-Regulation of mir-424 Contributes to the Abnormal Angiogenesis via MEK1 and Cyclin E1 in Senile Hemangioma: Its Implications to Therapy. **Plos One**, v. 5, n. 12, 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Angiogenesis Inhibitors**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet>> Acesso em: 27 jun. 2019.

NOGUEIRA, L. **Câncer de Próstata**. Disponível em: <<http://www.brazilhealth.com/Visualizar/Artigo/114/Cancer-de-Prostata>> Acesso em: 10 jun. 2019.

OLIVE, V. et al. MiR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. **Genes & Development**, v. 23, n. 24, p.2839-2849, 2009.

OSTROWSKI, M. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 1, p.19-30, 2009.

ØROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H.. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. **Molecular Cell**, v. 30, n. 4, p.460-471, 2008.

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.

PECOT, C. V. et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p.1-29, 2013.

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.883-891, 2012.

PEPPER, M. S. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator–Plasmin Systems in Angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 7, p.1104-1117, 2001.

POLISENO, L. et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. **Blood**, v. 108, n. 9, p.3068-3071, 2006.

POLISENO, L. et al. Identification of the miR-106b 25 MicroRNA Cluster as a Proto-Oncogenic PTEN-Targeting Intron That Cooperates with Its Host Gene MCM7 in Transformation. **Science Signaling**, v. 3, n. 117, 2010.

PROSTATE CANCER UK. **Symptoms**. Disponível em: <<https://prostatecanceruk.org/prostate-information/about-prostate-cancer/prostate-cancer-symptoms>> Acesso em: 10 jun. 2019.

PROFOUND MEDICAL GMBH. **Prostate cancer – Stages**. Disponível em: <<https://www.prostate-tulsapro.com/prostate-cancer>> Acesso em: 10 jul. 2019.

RAMTEKE, A. et al. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 7, p.554-565, 2013.

- REES, J.; BULTITUDE, M.; CHALLACOMBE, B. The management of lower urinary tract symptoms in men. **British Medical Journal**, v. 348, n. 241, p.3861-3869, 2014.
- RIVEIRA-PEREZ, J. et al. Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. **Oncology Letters**, p.1072-1078, 2017.
- ROSNER, W. et al. Sex hormone-binding globulin: Anatomy and physiology of a new regulatory system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4-6, p.813-820, 1991.
- SARAMÄKI, O. R et al. Amplification of hypoxia-inducible factor 1 α gene in prostate cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 128, n. 1, 2001.
- SCHER, H. I. et al. Prevalence of Prostate Cancer Clinical States and Mortality in the United States: Estimates Using a Dynamic Progression Model. **Plos One**, v. 10, n. 10, 2015.
- SHEPHARD, A. P. et al. Prostate cancer exosomes as modulators of the tumor microenvironment. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 3, n. 12, p.288-301, 2017.
- SHARIAT, S. F. et al. Association of Preoperative Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 With Lymph Node Status and Biochemical Progression After Radical Prostatectomy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 9, p.1655-1663, 2004.
- SHIAO, S. L.; CHU, G. C.; CHUNG, L. W.K. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p.340-348, 2016.
- SIGMA-ALDRICH. **Sample Purification and Quality Assessment**. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/sample-purification-and-qualityassessment.html> >. 2017. Acesso em: 20 jun. 2019.
- SNOWDON, J. et al. The MicroRNA-200 Family Is Upregulated in Endometrial Carcinoma. **Plos One**, v. 6, n. 8, e22828, p.1-7, 2011.
- SOKOLOVA, V. et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 1, 2011.
- SRINIVAS-SHANKAR, U.; WU, F. C. W. Drug Insight: testosterone preparations. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 3, n. 12, p.653-665, 2006.
- SU, H. et al. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. **Genes & Development**, v. 23, n. 3, p.304-317, 2009.
- TAI, S. et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. **The Prostate**, v. 71, n. 15, p.1668-1679, 2011.

TAN, M. E. et al. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 36, n. 1, p.3-23, 2014.

TANG, B. et al. MicroRNA-155-3p promotes hepatocellular carcinoma formation by suppressing FBXW7 expression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 35, n. 1, 2016.

TAVERNA, S. et al. Exosomal shuttling of miR-126 in endothelial cells modulates adhesive and migratory abilities of chronic myelogenous leukemia cells. *Molecular Cancer*, v. 13, n. 1, p.169-182, 2014.

TAY, Y. et al. Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs. *Cell*, v. 147, n. 2, p.344-357, 2011.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. 1, p. D330-338, 2018.

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.

TIWARI, A.; MUKHERJEE, B.; DIXIT, M. MicroRNA Key to Angiogenesis Regulation: MiRNA Biology and Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, v. 18, n. 3, p.266-277, 2018.

TRIPATHI, M.; BILLET, S.; BHOWMICK, N. A. Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell Adhesion & Migration*, v. 6, n. 3, p.231-235, 2012.

UHLEN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, v. 347, n. 6220, p.1260419-1260419, 2015.

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.

VAN BOKHOVEN, A. et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*, v. 57, n. 3, p.205-225, 2003.

VAN MOORSELAAR, R. J. A.; VOEST, E. E. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 197, n. 1-2, p.239-250, 2002.

VELICEASA, D. et al. Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b. *Vascular Cell*, v. 7, n. 1, p.1-13, 2015.

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, 2013.

VLAEMINCK-GUILLEM, V. Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p.1-1, 13 2018.

VO, B. T. et al. TGF- β Effects on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Are Mediated by PGE₂ through Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway. **Endocrinology**, v. 154, n. 5, p.1768-1779, 2013.

WEBBER, J. P. et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. **Oncogene**, v. 34, n. 3, p.290-302, 2014.

WHO, W. H. O. **Câncer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acesso em: 10 jun. 2019.

WISLOW, T. **Combination Therapy Improves Survival for Some Men with Recurrent Prostate Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/androgen-deprivation-therapy-prostate>> Acesso em: 10 jun. 2019.

WONG, N.; WANG, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. 146-152, 2015.

WOOD, M. et al. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 15, n. 3, p.246-258, 1997.

XIA, W. et al. MicroRNA-32 promotes cell proliferation, migration and suppresses apoptosis in breast cancer cells by targeting FBXW7. **Cancer Cell International**, v. 17, n. 1, 2017.

XIAO, C. et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. **Nature Immunology**, v. 9, n. 4, p.405-414, 2008.

XIE, T. et al. Association between MMP-2 expression and prostate cancer: A meta-analysis. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 2, p.241-245, 2015.

XU, F. et al. Exosomal miR-423-5p mediates the proangiogenic activity of human adipose-derived stem cells by targeting Sufu. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, 2019.

XU, K.; CLEAVER, O. Tubulogenesis during blood vessel formation. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 9, p.993-1004, 2011.

XU, Y. et al. MicroRNA-223 Regulates Cyclin E Activity by Modulating Expression of F-box and WD-40 Domain Protein 7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p.34439-34446, 2010.

YANAIHARA, N. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 189-198, 2006.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p.27066-27128, 2015.

- YANG, J. C. et al. A Randomized Trial of Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, for Metastatic Renal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 5, p.427-434, 2003.
- YANG, H. et al. Exosome-Derived miR-130a Activates Angiogenesis in Gastric Cancer by Targeting C-MYB in Vascular Endothelial Cells. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 10, p.2466-2475, 2018.
- YANG, M. et al. MiR-497~195 cluster regulates angiogenesis during coupling with osteogenesis by maintaining endothelial Notch and HIF-1 α activity. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.
- YUKAWA, H. et al. Imaging of angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by uptake of exosomes secreted from hepatocellular carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.1-12, 2018.
- ZHANG, L. et al. The 786-0 renal cancer cell-derived exosomes promote angiogenesis by downregulating the expression of hepatocyte cell adhesion molecule. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p.272-276, 2013.
- ZHANG, C. et al. Exosome: Function and Role in Cancer Metastasis and Drug Resistance. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 17, p.1-12, 2018.
- ZHANG, S. et al. Exosomes promote cetuximab resistance via the PTEN/Akt pathway in colon cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 1, p.1-8 2017.
- ZHAO, N. et al. SZRD1 is a Novel Protein that Functions as a Potential Tumor Suppressor in Cervical Cancer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 11, p.2132-2141, 2017.
- ZHONG H. et al. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1 in rat and human prostate cancer. **Cancer Research**, v.58, p.5280–5284, 1998.
- ZHOU, Q. et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23 27 24 clusters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 20, p.8287-8292, 2011.

APÊNDICE A – Os miRNAs alterados entre exossomos derivados da linhagem LNCaP em relação a linhagem PC-3.

LNCaP X PC-3			
miRNA	Regulação	Fold Change	p
hsa-miR-141-3p	<i>up</i>	1263,615	0,0001
hsa-miR-6726-5p	<i>up</i>	1044,613	2,3E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4655-5p	<i>up</i>	933,0814	0,0004
hsa-miR-6874-5p	<i>up</i>	647,5527	0,0013
hsa-miR-584-5p	<i>up</i>	496,9283	0,0001
hsa-miR-5196-5p	<i>up</i>	493,347	0,0001
hsa-miR-200c-3p	<i>up</i>	394,3673	0,0004
hsa-miR-6851-5p	<i>up</i>	354,3062	7,5E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4754	<i>up</i>	311,2745	7,9E ⁻⁰⁵
hsa-miR-513b-3p	<i>up</i>	287,0785	8,4E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4660	<i>up</i>	276,6802	0,0001
hsa-miR-3065-3p	<i>up</i>	253,9271	6,8E ⁻⁰⁵
hsa-miR-6721-5p	<i>up</i>	241,4914	0,0001
hsa-miR-7845-5p	<i>up</i>	222,7588	0,0003
hsa-miR-500a-3p	<i>up</i>	208,4762	0,0001
hsa-miR-3621	<i>up</i>	188,3779	3,7E ⁻⁰⁵
hsa-miR-365b-5p	<i>up</i>	178,4521	0,0007
hsa-miR-345-3p	<i>up</i>	176,4945	4,1E ⁻⁰⁵
hsa-miR-6754-5p	<i>up</i>	165,5855	0,0001
hsa-miR-6766-3p	<i>up</i>	151,1651	0,0001
hsa-miR-7114-5p	<i>up</i>	148,0497	6,5E ⁻⁰⁵
hsa-miR-502-3p	<i>up</i>	143,7788	0,0002
hsa-miR-3180	<i>up</i>	136,2536	3,8E ⁻⁰⁵
hsa-miR-1234-3p	<i>up</i>	133,0801	0,0019
hsa-miR-8089	<i>up</i>	128,1279	0,0002
hsa-miR-1343-5p	<i>up</i>	118,1019	0,0002
hsa-miR-1238-3p	<i>up</i>	114,5614	0,0012
hsa-miR-4632-5p	<i>up</i>	111,8433	0,0004
hsa-miR-198	<i>up</i>	110,084	0,001
hsa-miR-195-5p	<i>up</i>	93,77003	0,0002
hsa-miR-4433a-5p	<i>up</i>	82,91391	0,0005
hsa-miR-6892-5p	<i>up</i>	81,59924	0,0002
hsa-miR-4274	<i>up</i>	80,56335	6,8E ⁻⁰⁵
hsa-miR-3138	<i>up</i>	74,46778	3,8E ⁻⁰⁵
hsa-miR-1250-5p	<i>up</i>	72,55073	0,0012
hsa-miR-3646	<i>up</i>	64,13065	0,0001
hsa-miR-550a-5p	<i>up</i>	39,40266	0,0002
hsa-miR-99a-5p	<i>up</i>	29,91993	3,1E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4271	<i>up</i>	21,90159	2,1E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4485-5p	<i>up</i>	20,6701	0,0011
hsa-miR-6829-5p	<i>up</i>	20,14245	0,0005
hsa-miR-4257	<i>up</i>	19,02122	4,8E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4430	<i>up</i>	9,763912	0,0014
hsa-miR-3124-5p	<i>up</i>	8,675465	0,0005

hsa-miR-4487	<i>up</i>	7,765837	0,0017
hsa-miR-150-3p	<i>up</i>	6,472592	0,0002
hsa-miR-4513	<i>up</i>	6,385293	0,0003
hsa-miR-939-5p	<i>up</i>	5,915779	0,0007
hsa-miR-6858-5p	<i>up</i>	5,536855	0,0003
hsa-miR-6086	<i>up</i>	5,247605	0,0006
hsa-miR-6124	<i>up</i>	3,753689	8,6E ⁻⁰⁵
hsa-miR-4497	<i>up</i>	3,711057	0,0014
hsa-miR-7110-5p	<i>down</i>	2,17118	0,0008
hsa-miR-6831-5p	<i>down</i>	2,26867	0,0009
hsa-miR-331-3p	<i>down</i>	2,82271	0,0007
hsa-miR-7107-5p	<i>down</i>	3,05365	0,0006
hsa-miR-1587	<i>down</i>	3,39857	0,0015
hsa-miR-183-5p	<i>down</i>	4,9766	0,0001
hsa-miR-4505	<i>down</i>	5,05521	0,0012
hsa-miR-92a-3p	<i>down</i>	5,30072	0,0009
hsa-miR-151a-5p	<i>down</i>	5,63559	0,0011
hsa-miR-22-3p	<i>down</i>	5,73506	0,0008
hsa-miR-6785-5p	<i>down</i>	9,72603	8,9E ⁻⁰⁵
hsa-miR-1275	<i>down</i>	11,635	0,0008
hsa-miR-1273g-3p	<i>down</i>	13,4412	0,0008
hsa-miR-29b-3p	<i>down</i>	20,5162	0,0008
hsa-miR-100-5p	<i>down</i>	37,4878	0,0001
hsa-miR-196b-5p	<i>down</i>	84,7925	0,0017
hsa-miR-221-3p	<i>down</i>	113,622	0,0017
hsa-miR-424-5p	<i>down</i>	115,34	0,0015
hsa-miR-27a-3p	<i>down</i>	783,141	0,0009
hsa-miR-24-3p	<i>down</i>	1011,53	0,0008