



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Fernanda da Luz Efe

**Validação de um gene alvo do hsa-miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata PC-3:
inibição do miRNA como potencial estratégia terapêutica no câncer de próstata
metastático**

Florianópolis

2022

Fernanda da Luz Efe

**Validação de um gene alvo do hsa-miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata PC-3:
inibição do miRNA como potencial estratégia terapêutica no câncer de próstata
metastático**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coorientadora: Dr^a. Júlia Cisilotto

Florianópolis

2022

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

Efe, Fernanda da Luz

Validação de um gene alvo do hsa-miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata PC-3: inibição do miRNA como potencial estratégia terapêutica no câncer de próstata metastático / Fernanda da Luz Efe ; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, coorientador, Júlia Cisilotto, 2022.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. microRNA. 3. Câncer de Próstata. 4. Validação de gene alvo. 5. Bioinformática. I. Pasa, Tânia Beatriz Creczynski. II. Cisilotto, Júlia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. IV. Título.

Fernanda da Luz Efe

**Validação de um gene alvo do hsa-miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata PC-3:
inibição do miRNA como potencial estratégia terapêutica no câncer de próstata
metastático**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de agosto de 2022,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
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 Mestra em Farmácia pelo Programa de Pós-Graduação
em Farmácia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Thaís Cristine Marques Sincero, Dr.(a)
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela incrível oportunidade e conhecimentos passados durante esses longos anos de iniciação científica e mestrado. Sempre muito empática e atenciosa com seus alunos, sempre dando o melhor de si e atendendo à todas as necessidades. Sempre nos incentivando a continuar e demonstrando que o caminho da pesquisa não é fácil, mas é lindo e recompensador.

À minha coorientadora, Júlia Cisilotto, que em meio à tantos afazeres sempre arranhou um tempo para me auxiliar e aconselhar, sendo sempre muito atenciosa, paciente e generosa.

A todos os amigos e colegas do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM), os quais sempre tornaram o ambiente de trabalho acolhedor, agradável e rico em conhecimentos.

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) pela oportunidade de vaga e suporte financeiro;

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição e disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho.

Em especial, para aqueles ao qual meu coração pertence. Meus pais, Cristiane e Maurício, que sempre me apoiaram nessa trajetória, sendo um grande exemplo de perseverança e acolhimento. Meu irmão Rafael, meu melhor amigo e a minha outra metade.

Ao dono da minha paz, Ben-Hur, que sempre esteve ao meu lado dando todo o suporte necessário nos momentos de fraqueza. Por todo o amor, carinho e respeito compartilhado durante todos esses anos.

Aos meus colegas de apartamento, Anne e André, que foram essenciais durante toda a pandemia do COVID-19, oferecendo suporte psicológico, acolhimento, carinho e parceria.

A todos os meus amigos, que mesmo à distância, em quarentena e em meio ao caos da incerteza da pandemia, permaneceram presentes e tornaram esta jornada mais leve e feliz.

A todos aqui deixo meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) consistem em uma classe de pequenas moléculas de RNA que são responsáveis por regular a expressão gênica a partir da complementariedade de bases com o RNA mensageiro (mRNA), inibindo ou induzindo a tradução de proteínas. A expressão aberrante dos miRNAs tem sido associada com o desenvolvimento e evolução de doenças, incluindo neoplasias, podendo atuar como oncogene ou supressor tumoral. Desta forma, identificar os alvos moleculares de miRNAs tem atraído o interesse científico para a compreensão do papel e a importância destes ácidos nucleicos no desenvolvimento e progressão do câncer, assim como o respectivo potencial como alvo terapêutico. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar e validar um gene alvo do miR-183-5p, cuja expressão encontra-se alterada em linhagem de câncer de próstata. Inicialmente, o perfil de expressão de miRNAs nas linhagens de câncer de próstata PC-3 e LNCaP e na linhagem não tumoral da próstata RWPE-1 foram determinados por microarranjo. A partir dos valores de *p* e *fold change*, o miR-183-5p foi escolhido e a sua expressão diferencial nas diferentes linhagens foi confirmada por qPCR. Para identificar potenciais alvos moleculares do miR-183-5p foram utilizadas três ferramentas de bioinformática: LinkedOmics, miRWalk 2.0 e Gene Ontology Resource. Entre os potenciais alvos identificados, TIMP3 foi o gene selecionado para a validação experimental. Para isto, as células da linhagem PC-3 foram transfectadas com o inibidor e o mimético do miR-183-5p e a expressão de TIMP3 foi analisada por qPCR e *Western blot*. Foi observado que ao inibir a expressão do miR-183-5p nas células PC-3, obteve-se um aumento significativo na expressão de TIMP3. Além disso, foi identificado que ao inibir o miR-183-5p nas células PC-3 houve uma diminuição na capacidade de invasão celular. Adicionalmente, foi utilizada a base de dados STRING para identificar os genes modulados por TIMP3 e que desempenham papel importante para a invasão celular, sendo identificados os seguintes genes: MMP2, MMP3, MMP9 e ADAM17. Desta forma, foi observado que ao inibir a expressão do miR-183-5p nas células PC-3, houve uma redução significativa na expressão de MMP3 e MMP9. Portanto, o presente estudo demonstrou que TIMP3 é um alvo molecular do miR-183-5p nas células de câncer de próstata PC-3, assim como demonstra regular a expressão gênica das metaloproteinases MMP-3 e MMP-9. Assim, demonstrando o potencial do miR-183-5p como alvo terapêutico para terapia molecular do câncer de próstata.

Palavras-chave: microRNAs; câncer de próstata; miR-183-5p; bioinformática; TIMP3.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs responsible for regulating gene expression through the complementarity of bases with messenger RNA (mRNA), inhibiting or inducing protein translation. Aberrant expression of miRNAs has been associated with the development and evolution of diseases, including neoplasms, which may act as oncogenes or tumor suppressors. Thus, identifying miRNAs molecular targets has attracted scientific interest to understand their role and importance in cancer development and progression, as well as their potential as therapeutic targets. In view of these premises, the aim of this work was to identify and validate a molecular target of miR-183-5p, which is differentially expressed in prostate cancer cells. Initially, the miRNA expression profile in the prostate cancer cell lines PC-3 and LNCaP and in the non-tumoral prostate cell line RWPE-1 were determined by microarray. From the p and fold change values, miR-183-5p was chosen and the differential expression by the cell lineages was confirmed by qPCR. To identify a potential miR-183-5p gene target, three bioinformatics tools were used: LinkedOmics, miRWalk v. 2.0, and Gene Ontology Resource. Among all potential targets identified, TIMP3 was the gene selected for experimental validation. For this, PC-3 cells were transfected with an inhibitor and a mimic of miR-183-5p and the expression of TIMP3 was analyzed by qPCR and Western blotting. As result, it was demonstrated that the miR-183-5p downregulation in PC-3 cells significantly enhanced TIMP3 expression. Furthermore, it was identified that by inhibiting miR-183-5p expression in PC-3 cells there was a reduction in the cell invasion competence. Additionally, the STRING database was used to identify the genes modulated by TIMP3 and that play an important role in cell invasion. The following genes were identified: MMP2, MMP3, MMP9 and ADAM17. Thus, inhibit the miR-183-5p expression in PC-3 cells significantly reduces the MMP3 and MMP9 expression. Therefore, the present study demonstrated that TIMP3 is a target gene of miR-183-5p in prostate cancer cells PC-3, as well as regulates the MMP-3 and MMP-9 gene expression. Thus, demonstrating the potential of miR-183-5p to be a therapeutic target for molecular therapy to prostate cancer.

Keywords: microRNAs; prostate cancer; miR-183-5p; bioinformatic; TIMP3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema reprodutor masculino e anatomia da próstata.....	18
Figura 2 - Componentes celulares da próstata.....	19
Figura 3 - Síntese da testosterona.....	20
Figura 4 - Mecanismo de ação da testosterona.....	21
Figura 5 - Estadiamento clínico do câncer de próstata.....	23
Figura 6 - Biogênese dos miRNAs.....	27
Figura 7 - Perfil de expressão de miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais (LNCaP e PC-3) e não-tumoral (RWPE-1).....	42
Figura 8 - Intensidade e estabilidade de expressão dos potenciais miRNAs de referência.....	47
Figura 9 - Perfil de expressão dos miR-183-5p e miR-664b-3p nas linhagens de próstata.	48
Figura 10 - Associação do miR-183 com amostras de pacientes com adenocarcinoma de próstata obtidos na base de dados LinkedOmics.....	50
Figura 11 - Diagrama de Venn dos alvos preditos e genes negativamente correlacionados com o miR-183-5p.....	52
Figura 12 - Citotoxicidade da lipofectamina RNAiMAX nas células PC-3.	56
Figura 13 - Eficiência de transfecção do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.	57
Figura 14 - Expressão relativa de TIMP3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.....	59
Figura 15 - Quantidade relativa de proteína TIMP3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.	60
Figura 16 - Expressão relativa de MMP2, MMP3, MMP9 e ADAM17 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.	65
Figura 17 - Complementariedade de bases entre miR-183-5p e TIMP3.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na qPCR.....	34
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - miRNAs com expressão alterada nas linhagens tumorais LNCaP e PC-3 em relação a linhagem não-tumoral RWPE-1.....	42
Tabela 2 - Capacidade invasiva das células de câncer de próstata PC-3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p	62
Tabela 3 - Interações previstas para TIMP3 pela base de dados STRING.....	63
Tabela 4 - Genes alvos correlacionados negativamente com o miR-183-5p em pacientes com adenocarcinoma de próstata	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT	<i>androgen deprivation therapy</i>
cDNA	DNA complementar
CPRC	câncer de próstata resistente a castração
FC	<i>fold change</i>
HEPES	Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico
HSP	<i>heat shock protein</i>
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
miRNA	microRNA
MMP	metaloproteinase
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNAs	miRNA primário
PSA	<i>prostate-specific antigen</i>
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RA	receptor de andrógeno
RT-qPCR	transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa
RISC	complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAm	RNA mensageiro
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinases
UTR	<i>untranslated region</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	PRÓSTATA.....	17
2.2	CÂNCER DE PRÓSTATA	21
2.2.1	Epidemiologia e Fatores de Riscos	21
2.2.2	Desenvolvimento e Estadiamento	22
2.2.3	Migração e Metástase Tecidual	24
2.2.4	Detecção e Diagnóstico	25
2.2.5	Tratamento	25
2.3	MICRORNA.....	26
2.3.1	Identificação e Validação de Alvos Moleculares.....	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	LINHAGEM E CULTIVO CELULAR.....	31
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	31
4.3	QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO RNA TOTAL	32
4.4	REAÇÃO DE POLIADENILAÇÃO E SÍNTESE DE CDNA	32
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)	33
4.6	BIOINFORMÁTICA DE PREDIÇÃO DE ALVOS.....	35
4.7	CITOTOXICIDADE CELULAR DA LIPOFECTAMINA RNAIMAX.....	35
4.8	TRANSFEÇÃO CELULAR	36
4.9	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	37
4.10	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TIMP3 POR <i>WESTERN BLOT</i>	37
4.11	INVASÃO CELULAR.....	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	RESUMO DOS RESULTADOS ALCANÇADOS	40
5.2	SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DOS MIRNAS.....	40
5.3	VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS MIRNAS POR RT-qPCR .	46
5.4	PREDIÇÃO E SELEÇÃO DE UM GENE ALVO DO MIR-183-5P	48
5.4.1	Predição de genes alvo do miR-183-5p	48
5.4.1.1	<i>LinkedOmics</i>	49
5.4.1.2	<i>miRWalk 2.0</i>	51
5.4.1.3	<i>Intersecção dos dados obtidos pelas plataformas LinkedOmics e miRWalk</i>	52
5.4.1.4	<i>Gene Ontology Resource (GOR)</i>	53
5.4.2	Seleção de um potencial gene alvo do miR-183-5p	53
5.5	CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TIMP3 PELO MIR-183-5P NA LINHAGEM DE CÂNCER DE PRÓSTATA PC-3	55
5.5.1	Transfecção celular do miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata PC-3	55
5.5.2	Validação experimental de TIMP3 como alvo molecular do miR-183-5p.....	58
5.6	CAPACIDADE DO MIR-183-5P EM MODULAR A INVASÃO DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA PC-3	61
5.7	EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A INVASÃO CELULAR APÓS TRANSFECÇÃO CELULAR DO MIMÉTICO E INIBIDOR DO miR-183-5p NAS CÉLULAS PC-3	62
6	CONCLUSÃO	67
7	PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE A –ALVOS PREDITOS DO miR-183-5p	81
	APÊNDICE B – COMPLEMENTARIEDADE DE BASES miR-183-5p-TIMP3	82

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CP) é o segundo câncer mais incidente entre os homens no Brasil, ficando atrás do câncer de pele não-melanoma (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020). O CP é uma doença sistêmica multifatorial, o que consiste no resultado de interações desequilibradas entre fatores deletérios e fatores de proteção (BHASKARAN et al., 2018). Durante o desenvolvimento inicial, o CP é andrógeno-dependente e a terapia inicial consiste em utilizar bloqueadores de andrógenos, a fim de reduzir a concentração de hormônios androgênicos circulantes. Entretanto, as células tumorais são capazes de contornar a terapia inicial e proliferar de forma independente de andrógenos, a qual consiste em uma forma mais letal do câncer de próstata, com alta incidência de metástases e que ainda carece de uma terapia efetiva (ALEXANDRE et al., 2019; BERLIN; FERNÁNDEZ, 2015; FELDMAN; FELDMAN, 2001). A presença de metástases consiste na principal causa de morte de pacientes com câncer de próstata. O processo inicia com a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*), no qual a célula tumoral tem sua adesão celular desestabilizada, favorecendo a motilidade e migração das células tumorais para outros tecidos (NAUSEEF; HENRY, 2019; THIERY et al., 2009). O processo de EMT pode ser estimulado por diversos fatores, como a produção de enzimas de degradação da membrana extracelular, ativação de fatores de transcrição, incluindo alterações na expressão gênica de proteínas a partir da modulação de microRNAs, interferindo na expressão de proteínas-chave para a progressão metastática do câncer (KALLURI; WEINBERG, 2009; ZHANG; MA, 2013).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes de 19 a 25 nucleotídeos, responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica a partir da inibição ou indução da tradução de proteínas. A ação dos miRNA tem sido considerada fundamental no desenvolvimento e na fisiologia normal dos organismos, estando envolvidos com diversos processos biológicos como mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose celular. A alteração na expressão de miRNAs, em função de mutações, deleções ou alterações epigenéticas, podem contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer de próstata. Os miRNAs podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento e progressão do câncer, atuando como oncogenes ou supressores tumorais (ANASTASIADOU; JACOB; SLACK, 2017; XU et al., 2019). Devido a expressão de miRNAs ser dependente das características de cada tipo de câncer (características tecido-específicas) e por serem

responsáveis por regular múltiplos genes alvos, os miRNAs são de grande valor para o diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer, podendo ser alvos de antagonistas ou de miméticos (MEDINA; SLACK, 2008). Assim, identificar e validar os alvos moleculares regulados pelos miRNAs no câncer é uma etapa essencial para a compreensão das respectivas atuações, identificando potenciais alvos terapêuticos (WURDINGER; COSTA, 2007).

Diante das premissas apresentadas, o objetivo do presente trabalho foi identificar um miRNA diferencialmente expresso no câncer de próstata e validar experimentalmente um gene alvo para a confirmação e elucidação das respectivas vias moleculares reguladas. Esta abordagem pode trazer soluções mais precisas e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do câncer de próstata.

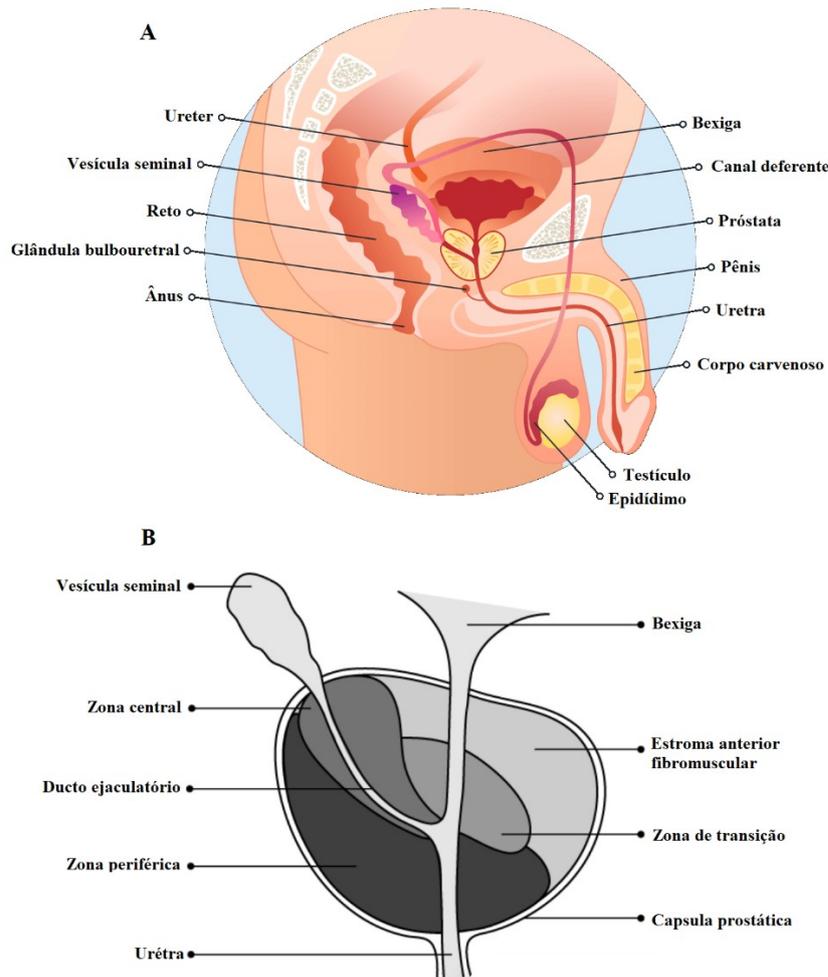
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRÓSTATA

A próstata é uma glândula exócrina essencial no sistema reprodutor masculino que está situada na pelve, abaixo da bexiga e a frente do reto (Figura 1A). É uma glândula com tamanho e formato parecidos com uma noz, em torno de 3 cm, atingindo peso fisiológico máximo de aproximadamente 20 g (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). A principal função da próstata é produzir e armazenar o líquido prostático, o qual é responsável por controlar o processo de ejaculação, liquefação do sêmen, motilidade e viabilidade espermática, sendo essencial para a fertilidade masculina (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

Anatomicamente, a próstata é composta por estroma e zonas glandulares, envoltos pela capsula prostática. As zonas glandulares consistem em zona central, zona periférica e zona de transição, as quais distinguem-se pela histologia e pela suscetibilidade a distúrbios patológicos. Além destas zonas, a próstata possui uma região anterior não glandular, composta por estroma fibromuscular (Figura 1B) (MCNEAL, 1981). A zona glandular periférica possui maior suscetibilidade a carcinogênese, em torno de 70% dos tumores de próstata são originados nesta zona, enquanto 25% são originados na zona de transição. Acredita-se que esta diferença seja justificada pela composição do estroma dessas zonas. A zona de transição possui maior composição do estroma por tecido fibromuscular, estando mais relacionada com o desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011).

Figura 1 - Sistema reprodutor masculino e anatomia da próstata.



(A) Sistema reprodutor masculino, imagem adaptada de SPERLING, 2017. (B) Anatomia da próstata, imagem adaptada de CANADIAN CANCER SOCIETY.

O desenvolvimento e maturação da próstata é iniciado a partir de complexas interações entre o estroma e o epitélio prostático, sendo controlado por fatores intrínsecos e extrínsecos à próstata. Os fatores intrínsecos estão relacionados com a ação parácrina do estroma e epitélio prostático, os quais a partir da síntese de fatores de crescimento, estimulam ou inibem a proliferação e diferenciação recíproca (CUNHA et al., 1985; LEE; KOZLOWSKI; GRAYHACK, 1997). O epitélio prostático é composto por três principais tipos celulares: basal, neuroendócrino e luminal (Figura 2). As células basais são células independentes da ação de andrógenos que dão origem a células intermediárias que proliferam e translocam para a camada luminal, gerando células colunares secretoras sensíveis a andrógeno, as quais são responsáveis por produzir o antígeno prostático específico (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*) e fosfatase ácida prostática, que farão parte do líquido seminal. Entre estas células, encontram-se

as células neuroendócrinas que possuem papel regulador através da secreção de peptídeos. O estroma prostático consiste em uma matriz extracelular composta por colágeno, glicoproteínas, células musculares lisas, células nervosas, células imunológicas e células endoteliais, as quais são sensíveis a andrógenos (Figura 2). O principal papel do estroma prostático é dar sustentação ao epitélio prostático e garantir a homeostase da glândula (BARRON; ROWLEY, 2012; CUNHA et al., 1987; NOVARA et al., 2006). Já o principal fator extrínseco envolvido com a proliferação e diferenciação da próstata são os hormônios sexuais androgênicos, sintetizados em sua maioria pelos testículos (LEE; KOZLOWSKI; GRAYHACK, 1997).

Figura 2 - Componentes celulares da próstata.

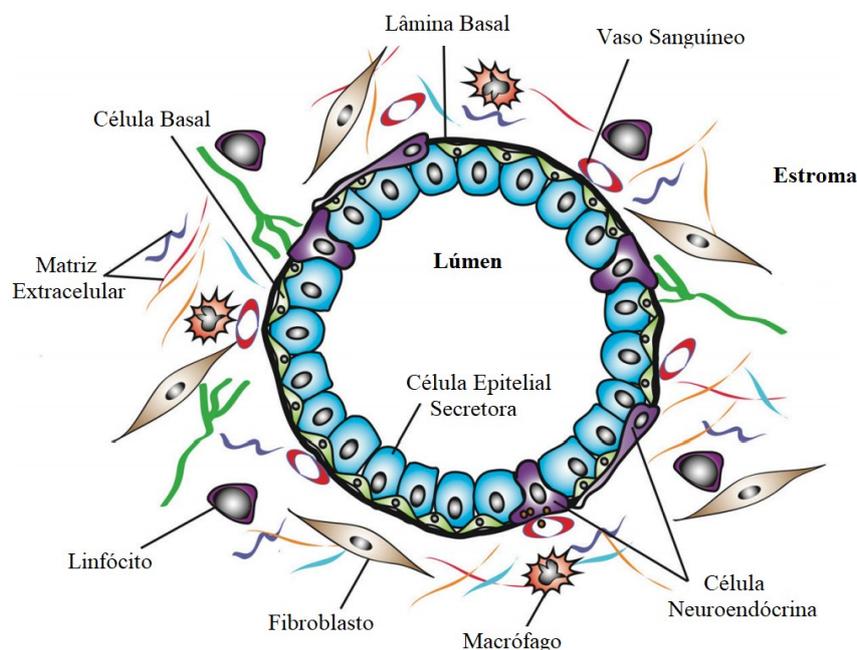
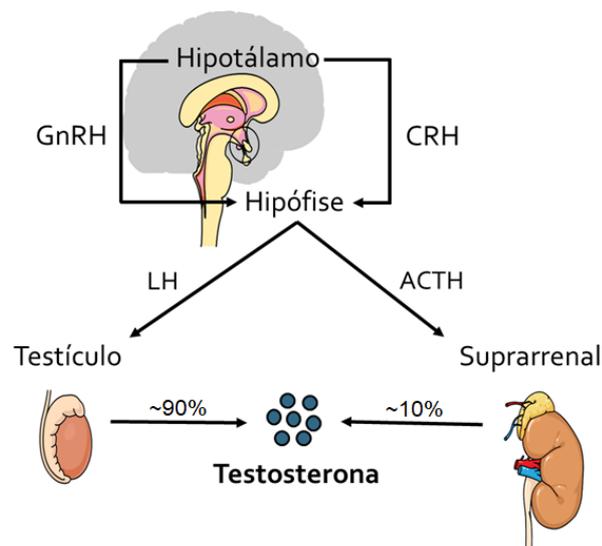


Imagem adaptada de BARRON; ROWLEY, 2012.

O receptor de andrógeno (AR, do inglês, *androgen receptor*) é um fator de transcrição dependente de ligante ativado a partir de hormônios androgênicos, estando presente em tecidos sensíveis à androgênio (CULIG; SANTER, 2014; HEINLEIN; CHANG, 2002). O andrógeno mais abundante nos homens é a testosterona, a qual é produzida principalmente nos testículos pelas células de Leydig a partir do estímulo do hormônio luteinizante (LH, do inglês, *luteinizing hormone*) sintetizado pela hipófise (MIDZAK et al., 2008). Ainda, uma pequena quantidade de testosterona é formada pelo córtex adrenal a partir da síntese de hormônios esteroides (Figura 3) (NAKAMURA et al., 2009). No sangue, a testosterona circulante liga-se à albumina ou à globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG, do inglês, *sex hormone-binding globulin*).

Quando livre, a testosterona ultrapassa a membrana plasmática das células da próstata e sofre ação da enzima 5-alfa-redutase, gerando di-hidrotestosterona (DHT), a qual possui maior afinidade pelo AR. Quando ligada ao receptor induz a fosforilação e dimerização do mesmo, ativando-o. Assim, o receptor transloca para o núcleo da célula e induz a codificação de diversas proteínas, como fatores de crescimento que são estimuladores potenciais da proliferação celular prostática e expressão de PSA (Figura 4) (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

Figura 3 - Síntese da testosterona

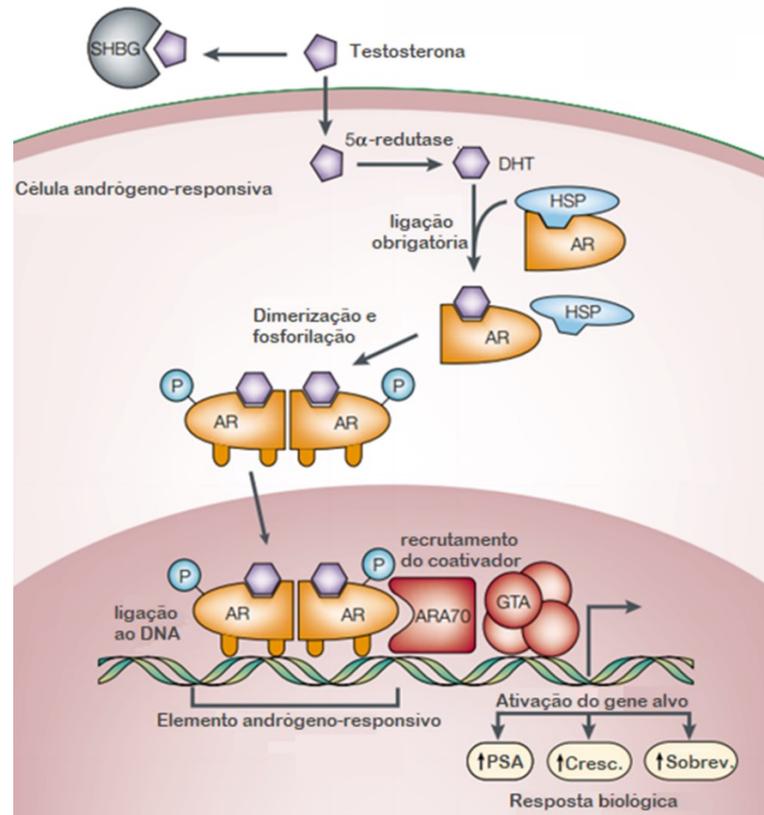


Em torno de 90% da testosterona é produzida nos testículos pelas células de Leydig a partir do estímulo do hormônio luteinizante (LH) sintetizado pela hipófise a partir do estímulo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH, do inglês, *gonadotropin-releasing hormone*), o qual é sintetizado pelo hipotálamo. Ainda, em torno de 10% da testosterona pode ser sintetizada pela glândula suprarrenal a partir do estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês, *adrenocorticotropic hormone*), sintetizado pela hipófise a partir do estímulo do hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês, *corticotropin-releasing hormone*), o qual é sintetizado pelo hipotálamo. Fonte: Elaborada pela autora.

A biossíntese da testosterona nas células de Leydig dá-se a partir do colesterol, o qual é metabolizado pela enzima CYP11A1 em pregnenolona. A pregnenolona então é convertida pela enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) em progesterona, a qual é convertida em androstenediona pela enzima 17 α -hidroxilase (CYP17). Por fim, androstenediona é metabolizada em testosterona pelo tipo 3 da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17HDS3), a qual é uma enzima restrita ao testículo (MIDZAK et al., 2008). Já no córtex adrenal a biossíntese é semelhante, sendo o colesterol metabolizado pela enzima CYP11A1 em pregnenolona, a qual é convertida em desidroepiandrosterona (DHEA) pela enzima CYP17. DHEA então é convertido pela enzima 3 β -HSD em androstenediona, a qual é metabolizada em

testosterona pelo tipo 5 da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17HDS5) (NAKAMURA et al., 2009; PAYNE; HALES, 2004).

Figura 4 - Mecanismo de ação da testosterona.



A Testosterona circula no sangue ligada à albumina ou globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG). Quando livre, a testosterona consegue entrar nas células da próstata, onde, sobre a ação da enzima 5-alfa-redutase, é convertida a di-hidrotestosterona (DHT), a qual induz a dissociação do receptor de andrôgeno (AR) com a proteína de choque térmico (HSP, do inglês, *heat shock protein*) e liga-se ao receptor induzindo a dimerização e fosforilação do mesmo. Assim, o receptor liga-se aos genes alvo no DNA. Co-ativadores como ARA70 ligam-se ao complexo para facilitar a interação com o aparelho geral de transcrição (GTA, do inglês, *general transcription apparatus*). Consequentemente, ocorre a ativação de genes alvo que aumentam a proliferação celular, sobrevivência e os níveis circulantes de PSA. (Imagem adaptada de FELDMAN; FELDMAN, 2001).

2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA

2.2.1 Epidemiologia e Fatores de Riscos

Para o Brasil é estimado que cada ano do triênio de 2020-2022 ocorram em torno de 685 mil novos casos de câncer no país, sendo o câncer de próstata o segundo câncer mais incidente entre os homens em todas as regiões brasileiras, ficando atrás do câncer de pele não melanoma, sendo estimado 65.840 novos casos de câncer de próstata no país. Sem considerar

o câncer de pele não-melanoma, o câncer de próstata será o mais frequente nos homens (29,2%), possuindo risco estimado de 62,95 casos novos a cada 100 mil homens no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Um dos fatores de risco mais importante para o câncer de próstata é a idade, visto que a maioria dos casos ocorre em homens acima de 65 anos. Além disso, a etnia, o histórico familiar e fatores exógenos como dieta, exposição à radiação ultravioleta, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e exposição ocupacional podem desempenhar papéis importantes no risco de desenvolvimento do câncer de próstata (DALGLEISH et al., 2007) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020). Isto por que quando o organismo é sujeito a um estresse ambiental sustentado, ocorre a formação excessiva de radicais livres, levando ao estresse oxidativo, o qual está relacionado com o desenvolvimento e agressividade do câncer, visto que estes radicais livres apresentam alta reatividade para biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, o que pode induzir mutações e transformações neoplásicas nas células (REUTER et al., 2010).

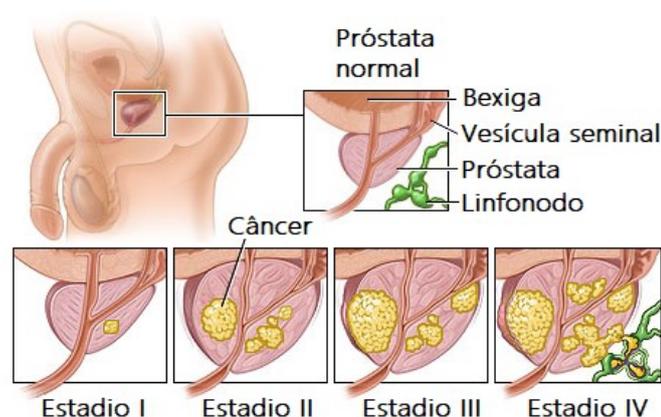
2.2.2 Desenvolvimento e Estadiamento

Para a definição do estadiamento clínico do câncer de próstata são levados em consideração o sistema TNM (do inglês, *Tumor-Node-Metastasis*), o escore de Gleason ou grau de ISUP (do inglês, *International Society of Urological Pathology*) e os níveis séricos de PSA pré-tratamento. O sistema TNM leva em consideração a extensão anatômica do tumor primário (T), a disseminação de células tumorais para linfonodos (N) e a presença de metástases distantes (M) (BUYOUNOUSKI et al., 2017). O escore de Gleason é utilizado como um fator de prognóstico do câncer de próstata e é definido a partir da análise da gradação histológica do tumor, no qual são atribuídos valores para as regiões anômalas encontradas na biópsia da próstata, podendo obter escores entre 2 e 10. O escore de Gleason ≤ 6 é representativo do Grupo 1 de ISUP, indicando um tumor com células bem diferenciadas e homogêneas, representativo do Adenocarcinoma Acinar, tumor indolente que acomete em torno de 95% dos pacientes. Escore de Gleason 7 (padrão de Gleason 3+4) é representativo do Grupo 2, com células moderadamente diferenciadas. Escore de Gleason 7 (padrão de Gleason 4+3) é representativo do Grupo 3, com células pouco diferenciadas. Escore de Gleason 8 é representativo do Grupo 4, com células praticamente indiferenciadas. O escore de Gleason ≥ 9 é representativa do Grupo

5, indicando um tumor com células indiferenciadas e com comportamento agressivo (EPSTEIN et al., 2016; LEENDERS et al., 2020).

No estadio I encontram-se os tumores que não conseguem ser detectados pelo toque retal ou vistos por exames de imagem e encontram-se localizados em um lobo da próstata (escore de Gleason ≤ 6 e PSA ≤ 10 ng/mL). No estadio II, encontram-se os tumores que podem ou não ser sentidos e vistos pelos exames e encontram-se em mais de um lobo da próstata (escore de Gleason 7 ou 8 e PSA ≥ 10 ng/mL e ≤ 20 ng/mL). No estadio III, encontram-se tumores que podem invadir tecidos adjacentes, como as vesículas seminais, mas ainda não se espalharam para os gânglios linfáticos próximos (escore de Gleason 6-8 e PSA ≥ 20 ng/mL). E no estadio IV, encontram-se tumores que já invadiram os tecidos adjacentes além das vesículas seminais, incluindo os linfonodos, e podem apresentar metástases distantes (qualquer escore de Gleason e valores de PSA) (MONTIRONI et al., 2016). Os estadios estão representados na Figura 5.

Figura 5 - Estadiamento clínico do câncer de próstata.



Extensão anatômica dos estadios clínicos do câncer de próstata (Imagem adaptada de ROAD, 2017).

Além disto, o câncer de próstata pode ser classificado de acordo com a responsividade a andrógenos. Na fase inicial, o câncer de próstata é dependente de hormônio, ou seja, a proliferação celular é dependente da ação de hormônios androgênicos, sendo denominado como câncer de próstata andrógeno-responsivo. Desta forma, a terapia inicial do câncer de próstata consiste em reduzir a concentração de andrógenos circulantes. Entretanto, alguns pacientes submetidos a terapia de privação androgênica não demonstram uma remissão permanente da doença, ou seja, é grande a possibilidade de que ocorra a recidiva do câncer (GREGORY et al., 2001). Nestes casos, a proliferação das células tumorais passa a ser de uma forma independente

de andrógeno, sendo denominado de câncer de próstata andrógeno-independente ou câncer de próstata resistente a castração, o qual é uma forma de câncer mais letal e com grande ocorrência de metástases. O mecanismo de resistência a castração ainda não está completamente elucidado, entretanto, algumas alterações já foram descritas, como: diferentes tipos de amplificação e/ou superexpressão do AR, reativando a sinalização dos receptores mesmo com baixa concentração de testosterona circulante (KOIVISTO et al., 1997; LIU et al., 2016a); mutações gênicas que resultam na redução da especificidade do AR, permitindo a ativação do receptor por esteroides não androgênicos e até mesmo por antagonistas androgênicos; desregulação do AR por fatores de crescimento (NAZARETH; WEIGEL, 1996); alterações no metabolismo androgênico local, a partir do aumento da atividade da enzima 5- α -redutase; alterações de proteínas correguladoras; e a utilização de vias paralelas para sobrevivência celular (FELDMAN; FELDMAN, 2001; SADI et al., 2011).

2.2.3 Migração e Metástase Tecidual

Durante a progressão do câncer de próstata, o desenvolvimento de metástases é frequentemente recorrente. Por ser uma doença inicialmente silenciosa, em torno de 70% dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata já apresentam metástases nos linfonodos próximos. Sendo que, frequentemente, a disseminação das células tumorais ocorre para os ossos (JACOB et al., 1999; THERIAULT; THERIAULT, 2012). Pacientes com metástases apresentam uma perda significativa na sobrevida, em que somente 28% deles sobrevivem por mais de 5 anos (POND et al., 2014). Acredita-se que a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*) tenha um papel crucial para o desenvolvimento de metástases em diversos tipos de câncer, inclusive o de próstata (HAY, 1990; NAUSEEF; HENRY, 2019). O processo de EMT é caracterizado pela redução da expressão de proteínas epiteliais, como a E-caderina e integrinas, e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como N-caderina, vimentina e a fibronectina. Desta forma, a célula epitelial adquire características fenotípicas de células mesenquimais, contribuindo para o respectivo aumento da motilidade e invasão celular (KALLURI; WEINBERG, 2009; THIERY et al., 2009). Em conjunto, algumas proteases como as metaloproteinases e desintegrinas (ADAMs) (MARETZKY et al., 2005; NAJY; DAY; DAY, 2008) e as metaloproteinases de matrix (MMPs) (LIU et al., 2016b; LOCHTER et al., 1997) já foram descritas por auxiliarem neste processo devido as respectivas capacidades em clivar E-caderina, uma glicoproteína

transmembranar responsável pela adesão célula-célula. O processo de EMT pode ser estimulado por diversos mecanismos moleculares, como ativação de fatores de transcrição, expressão de proteínas específicas de superfície celular, produção de enzimas que degradam a matriz extracelular, reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto e alterações na expressão de microRNAs, os quais demonstram possuir papel essencial neste processo (BRACKEN et al., 2009; HASSAN et al., 2012; THIERY et al., 2009).

2.2.4 Detecção e Diagnóstico

Para o diagnóstico e acompanhamento do câncer de próstata é utilizada a dosagem sérica do antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*) em associação com o exame do toque retal. Quando estes parâmetros encontram-se alterados, a biópsia da próstata é realizada para a análise histológica do tecido, como meio confirmatório e definição do estadiamento do câncer (THOMPSON et al., 2004). Porém, a dosagem de PSA e o toque retal possuem baixa sensibilidade e especificidade, pois podem estar alterados em outras doenças além do câncer de próstata, como na hiperplasia prostática benigna (HPB) e processos infecciosos e/ou inflamatórios (CANBY-HAGINO et al., 2007). A dosagem sérica de PSA tem correlação direta com o câncer de próstata, sendo assim, quanto maior a concentração de PSA mais provável a existência do câncer de próstata (CAPLAN; KRATZ, 2002; THOMPSON et al., 2004). Entretanto, alguns pacientes com câncer de próstata possuem níveis normais de PSA no sangue (≤ 4 ng/mL), o que demonstra as limitações deste parâmetro e a necessidade de caracterização de novos biomarcadores.

2.2.5 Tratamento

A terapia inicial para o câncer de próstata consiste em reduzir a atividade dos andrógenos circulantes. Quando o câncer apresenta risco intermediário, o tratamento consiste em prostatectomia total (retirada da próstata) ou radioterapia em combinação com terapia de curta duração por 4 a 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 do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH, do inglês, *Gonadotropin-releasing hormone*). Quando o câncer apresenta risco alto, há duas opções terapêuticas:

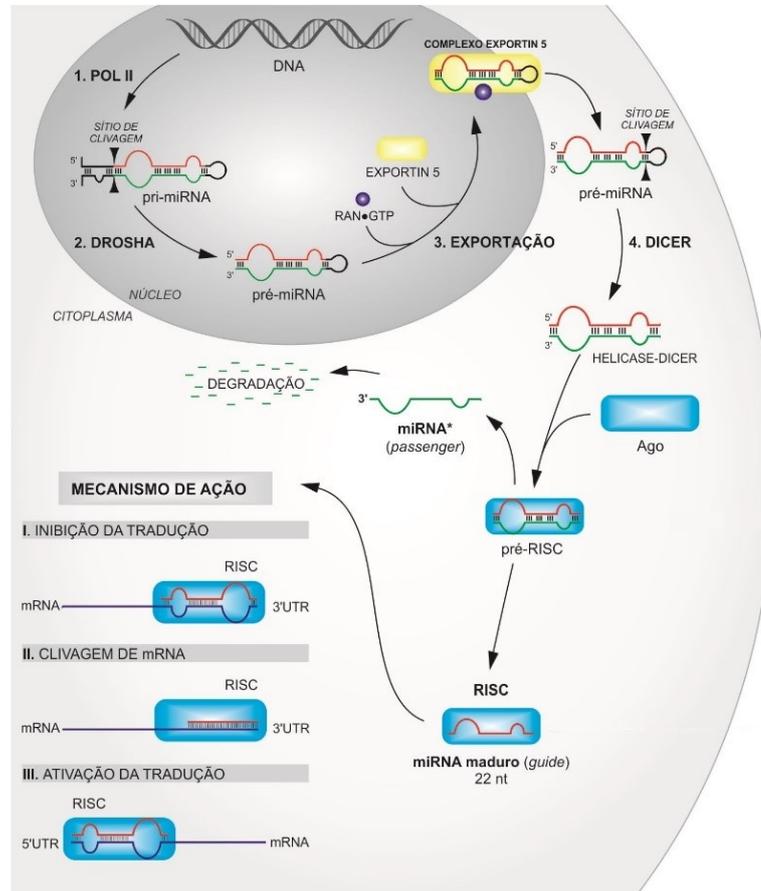
prostatectomia total ou radioterapia associada a hormonioterapia de longa duração (2-3 anos), que envolve fármacos com as possíveis ações: agonistas ou antagonistas do GnRH, anti-androgênicos e estrógenos (CONITEC, 2016). Apesar do grande avanço na terapia do câncer, para o câncer de próstata andrógeno-independente o tratamento ainda é limitado e os fármacos indicados na hormonioterapia secundária, como Abiraterona e Enzalutamida, acabam perdendo os respectivos efeitos devido ao frequente desenvolvimento de resistência pelas células tumorais (CHAN; DEHM, 2014). Portanto, esforços para a identificação de novas estratégias e alvos terapêuticos permanecem necessários.

2.3 MICRORNA

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes (ncRNA) de 19 a 25 nucleotídeos, responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica a partir da complementariedade de bases com o RNA mensageiro (mRNA), inibindo ou induzindo a tradução de proteínas, sendo classificado como RNA de interferência (RNAi). Os miRNAs são transcritos no núcleo, a partir do gene miRNA ou íntron presente no DNA, pela RNA polimerase II ou III, formando o miRNA primário (pri-miRNA), o qual é processado por um complexo formado pela endonuclease RNase III Drosha e a proteína DGCR8 (proteína de ligação a RNA) para formar o precursor do miRNA (pre-miRNA). O pre-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo de Exportina-5 com Ran-GTP, o qual é processado pelo complexo RNase Dicer e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita TRBP para retirada da alça do pre-miRNA (região não pareada), resultando na formação de um duplex de miRNA com aproximadamente 22 nucleotídeos. Em um passo seguinte, a dupla fita é desenrolada por uma helicase, separando o miRNA em duas fitas simples maduras, uma fita senso e outra antisenso. Desta forma, a fita funcional do miRNA é carregada com proteínas Argonauta (Ago2), as quais apresentam atividade endonuclease, para a incorporação no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Ao passo que a fita complementar não incorporada sofre degradação. Uma vez que o miRNA maduro está incorporado no complexo RISC, este é direcionado até o mRNA alvo, e a partir da complementariedade de bases entre o miRNA-mRNA, o mRNA será degradado ou inibido, ou ainda ativado. Processo representado na figura 6 (AMARAL et al., 2018; BARTEL, 2004; WINTER et al., 2009). Assim, de acordo com o sentido da fita madura que é incorporada ao complexo de RISC a nomenclatura do miRNA é determinada, sendo 5p para fita sense (miR-183-5p) e 3p para a fita antisense (miR-183-3p). Já

a numeração do miRNA é sequencial e de acordo com o número do último miRNA publicado (miR-183) (DESVIGNES et al., 2016).

Figura 6 - Biogênese dos miRNAs.



A transcrição do miRNA ocorre a partir do gene ou íntron presente na fita de DNA, o qual é identificado e transcrito pela RNA polimerase II ou III, formando o pri-miRNA. O pri-miRNA é clivado pelo complexo Drosha e DGCR8, formando o pre-miRNA, o qual é exportado do núcleo para o citoplasma a partir do complexo Exportina-5 e Ran-GTP. No citoplasma o pre-miRNA é clivado pela enzima Dicer em complexo com TRBP, formando o miRNA duplex. A dupla fita é desenrolada por uma helicase e a fita funcional é incorporada no complexo RISC a partir de proteínas Argonata (Ago2). Uma vez inserido no complexo, o miRNA direciona o RISC até o RNA mensageiro alvo, podendo clivar ou inibir a tradução do RNA mensageiro, ou ativar a tradução do RNA mensageiro (Imagem adaptada de AMARAL et al., 2018).

Os miRNAs podem inibir a expressão gênica via a complementariedade perfeita ou imperfeita de pares de bases entre mRNA-miRNA, no qual somente de 6-8 nucleotídeos do miRNA precisam ser complementares ao mRNA alvo para ocorrer a interação. Por esta razão, os miRNAs podem ter múltiplos mRNAs como alvo. Assim como um único mRNA, pode ter diversos miRNAs como reguladores (FRIEDMAN et al., 2009; LIM et al., 2005). Os miRNAs podem ter complementariedade com 4 regiões dos mRNAs: região promotora, região 3'-não traduzida (UTR, do inglês, untranslated region), região de codificação (CDS, do inglês, coding

domain sequence) e região 5'-UTR. A interação mais clássica conhecida dos miRNAs é pela região 3'-UTR do mRNA, na qual os miRNAs demonstram atuar como inibidores da expressão dos respectivos genes alvo através da degradação do mRNA (complementariedade perfeita entre miRNA-mRNA) ou inibição da tradução (complementariedade imperfeita entre miRNA-mRNA) (LAI, 2002). Ainda, os miRNAs demonstram poder atuar como inibidores da expressão gênica através da interação com a região CDS do mRNA (BRUMMER; HAUSSER2, 2014; TAY et al., 2008). Interações dos miRNAs com as regiões promotoras e 5'-UTR do mRNA, demonstram estar mais associadas com a ativação e indução da expressão gênica (MORETTI; THERMANN; HENTZE, 2010; ØROM; NIELSEN; LUND, 2008; PLACE et al., 2007).

Os miRNAs tem papel fundamental no desenvolvimento e na fisiologia normal dos organismos, estando envolvidos em diversos processos biológicos, como mecanismos de proliferação, diferenciação, apoptose e desenvolvimento celular. A desregulação na expressão dos miRNAs demonstra estar associada ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, principalmente no câncer, no qual diversas alterações na expressão gênica são encontradas (ANASTASIADOU; JACOB; SLACK, 2017; XU et al., 2019). No câncer, os miRNAs podem atuar como *oncomiRs*, aumentando a expressão de oncogenes ou inibindo a expressão de genes supressores tumorais, favorecendo a proliferação, migração e invasão de células tumorais. Assim como podem atuar como supressores tumorais, aumentando a expressão de genes que atuem como supressores tumorais ou inibindo a expressão de oncogenes, favorecendo a apoptose de células tumorais. Ainda, apresentam características tecido-específicas, ou seja, cada tecido apresenta um perfil de expressão de miRNAs diferente e específico. Sendo assim, os miRNAs demonstram ter grande valor para o diagnóstico, prognóstico e terapêutico em relação ao câncer (AGHDAM et al., 2019; HASSAN et al., 2012; XUE; ZHUO; SHAN, 2017).

Os miRNAs demonstram um papel interessante na terapia molecular devido a capacidade de regularem múltiplos mRNAs que são alterados durante o câncer. Desta forma, para identificar se um miRNA tem potencial terapêutico, deve-se identificar os alvos moleculares regulados por ele, a fim de definir sua função molecular e importância no desenvolvimento e progressão do câncer. Assim, ao definir a função e os alvos moleculares do miRNA, estes podem fornecer oportunidades terapêuticas interessantes com o uso de miméticos ou inibidores do miRNA (antagomiRs) (TAN et al., 2018; WURDINGER; COSTA, 2007). Os miméticos de miRNA são pequenas moléculas sintéticas de RNA de dupla fita que combinam com a sequência do miRNA alvo, levando ao aumento da expressão do miRNA. Por outro lado,

os antagomiRs são pequenas moléculas sintéticas de RNA de fita simples com a sequência complementar ao miRNA alvo (antisense), ligando-se fortemente ao miRNA alvo e levando a inibição ou bloqueio do miRNA correspondente. Ao longo dos anos, foram realizadas modificações químicas na estrutura de nucleotídeos dos miméticos de miRNA e antagomiRs para melhorias na estabilidade e afinidade de ligação ao miRNA alvo (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

2.3.1 Identificação e Validação de Alvos Moleculares

A identificação e validação de alvos moleculares de miRNAs tem sido de amplo interesse científico para a respectiva compreensão do papel regulador destes ácidos nucleicos nos processos biológicos de desenvolvimento e progressão do câncer. As ferramentas de bioinformática vêm sendo amplamente utilizadas para orientar este processo. Com esta abordagem podem ser observados dados de predição de interação entre miRNA-mRNA e alterações moleculares relacionadas, auxiliando na identificação de potenciais alvos moleculares para o miRNA de interesse. Os potenciais alvos moleculares determinados pelas ferramentas computacionais devem ser verificados experimentalmente para a obtenção de legitimidade. Desta forma, para a validação experimental da interação entre miRNA-mRNA experimentos de ganho e perda de função do miRNA devem ser realizados para demonstrar como o miRNA regula a expressão do gene alvo. A modulação da expressão gênica do miRNA pode ser realizada através da transfecção celular *in vitro* de inibidores e/ou miméticos do miRNA para a célula de interesse (KUHN et al., 2008; RIOLO et al., 2021).

A transfecção celular é o processo de introdução artificial de ácidos nucleicos para o interior das células, resultando em alterações das propriedades celulares e expressão gênica, possibilitando análises de regulação e função de genes. A introdução de material genético dentro da célula pode ser realizada de maneira estável, na qual os ácidos nucleicos são integrados ao genoma da célula e a modulação gênica mantém-se sustentada por longos períodos, ou a transfecção pode ser realizada de maneira transitória, na qual os ácidos nucleicos não são integrados ao genoma e a modulação gênica se mantém por um período limitado. A transfecção pode ser realizada a partir de métodos biológicos, físicos ou químicos, em que para a seleção do método deve-se levar em consideração o tipo de célula, toxicidade celular, eficiência de transfecção, reprodutibilidade e a finalidade do estudo, visto que cada método possui aspectos diferentes (KAESTNER; SCHOLZ; LIPP, 2015; KIM; EBERWINE, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e validar um gene alvo do miRNA miR-183-5p, cuja expressão encontra-se alterada na linhagem de câncer de próstata metastático PC-3.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar por RT-qPCR a expressão diferencial do miR-183-5p nas linhagens de próstata;
- Determinar *in silico* um potencial gene alvo do miR-183-5p no câncer de próstata;
- Analisar *in vitro* a capacidade de regulação da expressão do gene alvo determinado (TIMP3) pelo miR-183-5p na linhagem celular de câncer de próstata PC-3 por RT-qPCR e *Western blot* através da transfecção celular;
- Investigar a capacidade invasiva das células de câncer de próstata PC-3 após a transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p.
- Avaliar a expressão gênica de proteínas relacionadas com migração e invasão tumoral após a transfecção celular com o mimético e inibidor do miR-183-5p por RT-qPCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR

Para este estudo foi utilizada a linhagem celular humana de câncer de próstata PC-3, a qual é proveniente de um sítio metastático no tecido ósseo e não é responsiva a andrógeno. Também foi utilizada a linhagem celular humana de câncer de próstata LNCaP, proveniente de um sítio metastático no linfonodo e responsiva a andrógeno. Para comparações, foi utilizada a linhagem celular humana de próstata não tumoral RWPE-1, a qual é responsiva a andrógenos. Todas as linhagens possuem morfologia epitelial e propriedade aderente.

As linhagens foram mantidas a 37°C em estufa úmida com atmosfera de 5 % de dióxido de carbono (CO₂), cuja proliferação foi acompanhada em garrafa de cultura celular com o devido meio para a nutrição das células, RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 100 U/mL de penicilina e 10 mM de HEPES. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, e ao atingirem 80% de confluência as células foram dissociadas utilizando tripsina 0,25 % e recultivadas até a passagem 8.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para a extração de RNA total foi utilizado o kit mirVana PARIS™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A extração foi iniciada a partir da adição de 250 µL de tampão de lise gelado nas células previamente plaqueadas e levadas ao vórtex para a lise celular homogênea. Em seguida, foram adicionados à amostra lisada 500 µL de solução desnaturante, seguido de incubação por 5 min em gelo. Após o período de incubação, foi adicionado 1 mL de Ácido-Fenol:Clorofórmio, seguido de agitação no vórtex por 60 s e centrifugação por 5 min à 12.000 × g. Após a centrifugação, desta mistura heterogênea, 800 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo e adicionado 1 mL de etanol absoluto para a precipitação dos ácidos nucleicos. Na sequência, esta mistura foi adicionada a uma coluna com filtro de sílica e centrifugada por 1 min à 9.000 × g. A coluna de sílica retém o RNA total e o filtrado é descartado. Em seguida, foram realizadas três etapas de lavagem da coluna de sílica, sendo adicionado 700 µL da solução de lavagem 1 ao filtro, seguida por uma centrifugação por 1 min

a $9.000 \times g$. O filtrado foi descartado e foram realizadas duas lavagens com 500 μL da solução de lavagem 2/3, seguido de centrifugação por 1 min a $9.000 \times g$. O filtrado foi descartado e uma centrifugação adicional da coluna de sílica foi realizada para remoção do fluido residual do filtro. Por fim, foram aplicados 50 μL de água livre de RNase à 95°C na coluna de sílica e centrifugado por 1 min à $9.000 \times g$ para a eluição do RNA total. As amostras de RNA total obtidas foram armazenadas no *freezer* -80°C até utilização.

4.3 QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO RNA TOTAL

As análises de quantificação e pureza do RNA total foram realizadas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). A determinação do RNA total foi realizada nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm utilizando uma alíquota de 2 μL de amostra. A correlação entre 260/230 indica contaminações por solventes. A correlação 260/280 indica possíveis contaminações por DNA e proteínas, possibilitando a análise da pureza das amostras. A absorvância em 320 nm é utilizada para compensar os efeitos de *background*. Para o cálculo da concentração de RNA total a seguinte fórmula é utilizada:

$$\text{Concentração RNA (ng/\mu L)} = (\text{Abs}_{260} - \text{Abs}_{320}) \times 40$$

4.4 REAÇÃO DE POLIADENILAÇÃO E SÍNTESE DE CDNA

Para miRNAs, as reações de poliadenilação e transcrição reversa foram realizadas utilizando o kit miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), conforme instruções do fabricante. As reações de poliadenilação foram realizadas para um volume final de 25 μL com 800 ng de RNA total, sendo adicionados 4 μL de tampão 5x poly A polimerase, 1 μL de rATP, 1 μL da enzima poli A polimerase e água livre de RNase suficiente para completar o volume final. As amostras foram incubadas em termociclador Biocycler a 37°C por 30 min e à 95°C por 5 min para finalizar a adenilação. Em seguida, para a síntese de cDNA, foram adicionados 4 μL de RNA poliadenilado, 2 μL de tampão 10x affinityScript RT, 0,8 μL de dNTP, 1 μL iniciador adaptador RT, 1 μL da enzima AffinityScript RT/RNase Block e 11,2 μL de água livre de RNase. As reações foram incubadas em termociclador à 55°C por 5

min, 25 °C por 15 min, 42 °C por 30 min e à 95 °C por 5 min para finalizar a transcrição reversa. As amostras de cDNA foram diluídas em água livre de RNase e armazenadas em *freezer* à -20 °C.

Para a expressão gênica, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA), conforme instruções do fabricante. Inicialmente, a mistura 2× RT Master Mix foi preparada, sendo adicionados 2 µL de tampão 10× RT, 0,8 µL de 25× dNTP Mix (100mM), 2 µL 10× RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4,2 µL de água livre de RNase. Após o preparo da mistura, 10 µL com até 2 µg de RNA total foi misturado com 10 µL de 2× RT Master Mix. As amostras foram incubadas em termociclador Biocycler a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e à 85 °C por 5 min para finalizar a transcrição reversa. As amostras de cDNA foram diluídas em água livre de RNase e armazenadas em *freezer* à -20 °C.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)

Para análise da expressão de miRNAs, a reação de qPCR foi realizada utilizando o kit miRNA qPCR Master Mix (Agilent Technologies, California, EUA), conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas para um volume final de 25 µL com 1 µL de cDNA, sendo adicionados 12,5 µL do *master mix*, 0,375 µL de corante de referência (diluído 1:50), 1 µL do iniciador universal antisense, 1 µL do iniciador específico senso e 9,125 µL de água livre de RNase. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems, com o seguinte programa: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 s para a desnaturação do cDNA, temperatura de anelamento (TA°C) por 15 s para o anelamento do primer (temperatura variante conforme o primer utilizado) e 72 °C por 20 s para a extensão da cadeia. Por fim, a curva de dissociação foi realizada com o seguinte programa: 95°C por 1 min, TA°C por 30 s, seguido do aumento de 0,3°C/s até 95°C.

Para análise da expressão gênica, a reação de qPCR foi realizada utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA), conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas para um volume final de 15 µL com 5 µL de cDNA, sendo adicionados 7,5 µL do Sybr Green Master Mix, 0,45 µL do iniciador específico senso e antisense, e 1,6 µL de água livre de RNase. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems, com o seguinte programa: 95 °C por 15 minutos,

seguido de 45 ciclos de 95 °C por 15 s para a desnaturação do DNA, TA °C por 30 s para o anelamento do primer e 72 °C por 38 s para a extensão da cadeia. Por fim, a curva de dissociação foi realizada com o seguinte programa: 95°C por 15 s, TA °C por 60 s, seguido do aumento de 0,3°C/s até 95°C.

A seleção do miRNA de referência (endógeno) foi realizada a partir da análise dos valores de estabilidade da expressão obtidos pelo software NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; FALCK ØRNTTOFT, 2004). A expressão dos miRNAs foram normalizadas pela expressão do miRNA de referência selecionado, o miR-16-5p. O U6 snRNA (do inglês, *small nuclear RNA*) foi utilizado para normalizar os dados dos miRNAs após a transfecção dos oligonucleotídeos. Para a expressão gênica, a normalização dos dados foi realizada a partir dos valores de expressão de β -actina. As sequências dos iniciadores específicos estão representadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na qPCR.

Iniciadores	Sequência (5'– 3)'
hsa-miR-183-5p	GTATGGCACTGGTAGAATTCCTACT
hsa-miR-664b-3p	CATTTGCCTCCCAGCCTACA
hsa-miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
hsa-miR-197-5p	AGAGAGGGCAGTGGGAGG
hsa-miR-6800-5p	GTGACAGTCAGGGGCGG
U6 senso	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 antisenso	AACGCTTCACGAATTTGCGT
TIMP3 senso	ACCGAGGCTTCACCAAGATG
TIMP3 antisenso	AGCAGGACTTGATCTTGCAGT
MMP2 senso	CTCATCGCAGATGCCTGGAA
MMP2 antisenso	TTCAGGTAATAGGCACCCTTGAAGA
MMP3 senso	AGAAGAGAAATTCCATGGAGC
MMP3 antisenso	CTCCAACCTGTGAAGATCCAGTA
MMP9 senso	CGCAGACATCGTCATCCAGT
MMP9 antisenso	GGATTGGCCTTGGAAGATGA
ADAM17 senso	CAGCACAGCTGCCAAGTCATT
ADAM17 antisenso	CCAGCATCTGCTAAGTCACTTCC
β -actina senso	CCAACCGCGAGAAGATGA
β -actina antisenso	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e os dados de expressão relativa foram calculados a partir do método $2^{-\Delta Cq}$. Os valores de *fold change* foram calculados a partir do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As análises estatísticas da expressão

relativa foram realizadas no software Graphpad Prism® versão 8.0 utilizando o teste de Anova de uma via seguido do pós teste de Tukey ou Dunnett. As diferenças na expressão relativa foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ e variações superiores a 2 vezes.

4.6 BIOINFORMÁTICA DE PREDIÇÃO DE ALVOS

Para a identificação de genes correlacionados negativamente com o miRNA selecionado para este estudo foi utilizada a base de dados LinkedOmics (VASAIKAR et al., 2018), na qual a partir do módulo de análise LinkFinder, foi realizada a associação do miRNA com amostras de pacientes com adenocarcinoma de próstata ($n= 493$), sendo as correlações entre as variáveis calculadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Os genes com valores de coeficiente de Spearman entre -1 até - 0,2 foram selecionados para análise. A base de dados miRWalk versão 2.0 (DWEET; GRETZ, 2015) foi utilizada para prever, por similaridade de bases, as interações entre o miRNA com mRNA. Em conjunto, para a intersecção dos dados, foram selecionados mais 5 programas de predição de miRNA-mRNA: RNA22 (MIRANDA et al., 2006), miRDB (CHEN; WANG, 2020), miRMap (VEJNAR; ZDOBNOV, 2012), miRanda (JOHN et al., 2004) e TargetScan (AGARWAL et al., 2015). Para a intersecção dos dados obtidos nas plataformas LinkedOmics e miRWalk foi utilizado software FunRich (versão 3.1.3). A plataforma Gene Ontology PANTHER versão 14.0 (ASHBURNER et al., 2000; GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2021; MI et al., 2019) foi utilizada para analisar as funções dos genes selecionados e as vias biológicas correlacionadas. Para a associação de interações entre proteínas, a plataforma STRING foi utilizada (SZKLARCZYK et al., 2021). Adicionalmente, a plataforma miRMap também foi utilizada para identificar os possíveis sítios de ligação entre miRNA-mRNA. Todas as bases de dados utilizadas neste trabalho são de acesso gratuito.

4.7 CITOTOXICIDADE CELULAR DA LIPOFECTAMINA RNAiMAX

Antes dos ensaios de transfecção celular a análise de compatibilidade da lipofectamina com a linhagem celular utilizada deve ser realizada. Para análise da citotoxicidade celular da Lipofectamina® RNAiMAX na linhagem de câncer de próstata PC-3 foi utilizado o método de MTT (brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), o qual é um sal tetrazólio de coloração amarela que, quando em uma célula viável, é reduzido pela mitocôndria em cristais

de formazan, um composto insolúvel de coloração roxa. Nas células mortas a atividade mitocondrial é nula, sendo assim, não há a conversão do sal do MTT em formazan. Dessa forma, quanto maior a intensidade de coloração maior é a quantidade de células viáveis (RISS et al., 2004).

Para a realização da metodologia, as células da linhagem PC-3 foram plaqueadas na densidade de 10.000 células/poço em placa de 96 poços. Após 24 horas, 2,4 μ L da Lipofectamina RNAiMAX foi diluída em 80 μ L de OPTI-MEM I. Sendo assim, foi adicionado 10 μ L de lipofectamina diluída em cada poço e incubado por 6 horas. No poço controle foi adicionado somente OPTI-MEM I. Após o período de incubação, o meio de cultura das células foi retirado e adicionado 100 μ L de RPMI 10% SBF, com posterior incubação por 48 horas. Após este período, o meio de cultura presente nos poços foi retirado e uma solução de meio com MTT 10% (0,5mg/mL) foi adicionada. Após 2 horas de incubação, o meio com MTT foi retirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μ L DMSO, seguida de homogeneização dos cristais em agitador orbital por 5 minutos. A absorbância foi determinada em um leitor de microplacas Microwell Systems® (Organon, Teknika) no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram calculados como porcentagem relativa ao controle. Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e utilizada a análise estatística de teste t não pareado, considerando valores significativos quando $p \leq 0,05$.

4.8 TRANSFECCÃO CELULAR

O precursor do miR-183-5p (pré-miR-183-5p ou *mimic*-miR-183-5p), o inibidor do miR-183-5p (anti-miR-183-5p) e o controle negativo (ath-miR-416 ou CN) foram suspensos em água livre de nuclease para obtenção de uma solução com concentração de 10 μ M. Em seguida, cada solução foi diluída em meio próprio para transfecção celular (OPTI-MEM I, meio isento de soro e antibiótico), para obter as concentrações de interesse (10, 50, 100 e 200 nM). A seguir, o reagente de transfecção, Lipofectamine® RNAiMAX (ThermoFisher, Massachusetts, EUA), foi diluído em meio OPTI-MEM I, o qual é um meio sem soro e antibiótico. O soro pode reduzir a eficiência da transfecção devido à presença de organelas lipídicas, o que interfere na formação de complexos entre os ácidos nucleicos e os lipossomas catiônicos (Lipofectamina). Na sequência, o reagente de transfecção diluído e o mimético, inibidor e controle negativo diluído foram misturados e incubados por 5 min à temperatura ambiente para a formação do complexo de transfecção. Após o período de incubação, os

complexos de transfecção foram adicionados a uma placa de cultura de 24 poços previamente semeadas com 100.000 células por poço da linhagem PC-3 e incubados por 6 h. Após o período de incubação, o meio com o complexo de transfecção foi retirado da placa e o meio de cultivo foi adicionado (RPMI + 10% SBF), sendo as células incubadas por 48 h em estufa à 37°C com 5% de CO₂. No ensaio, foram determinados 3 controles internos: Controle de células, utilizado para identificar qualquer tipo de problema relacionado às células, no qual as células eram incubadas somente com meio de cultura; Controle da Lipofectamina (CL), utilizado para identificar qualquer alteração causada pelo reagente de transfecção, no qual as células foram transfectadas com a lipofectamina vazia; Controle negativo (CN), utilizado para comparação dos resultados, no qual as células foram transfectadas com o ath-miR-416, sequência de *Arabidopsis thaliana* sem homologia com sequências de genes humanos.

4.9 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As células da linhagem PC-3 foram previamente semeadas com 500.000 células por poço em placa de 6 poços e a transfecção celular com 100 nM do mimético e inibidor do miR-183-5p foi realizada. Após o período de incubação da transfecção, as células foram lizadas a partir da adição do tampão RIPA gelado (10 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100®, 0,1% de SDS e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil) junto aos inibidores de protease (Aprotinina 2mg/mL, Leupeptina 1mg/mL e Pepstatina 1 mg/mL), seguido de incubação a 4°C por 30 min, sendo submetidas a agitação em vórtex a cada 5 min. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3.000 × g por 10 min a 4°C, no qual o *pellet* foi descartado e o sobrenadante contendo as proteínas foi aliquoteado e armazenado a -20°C.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). O princípio do método baseia-se na adição de uma solução cupro-alcalina à proteína, a qual induz a redução do cobre presente na solução de Cu²⁺ para Cu⁺. Em seguida, ao adicionar o reagente Folin (mistura de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico), o íon Cu⁺ é capaz de reduzir o reagente Folin, formando tungstato e molibdato, os quais possuem absorção em 750 nm. Assim, uma curva padrão com BSA (1 - 20 µg/µL) (BSA, do inglês *bovine serum albumine*) foi utilizada para calcular a concentração de proteínas totais nas amostras por regressão linear.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TIMP3 POR *WESTERN BLOT*

Para a quantificação relativa de proteína TIMP3, 50 µg de proteína total das células transfectadas foi misturado com tampão de amostra (1:1) e incubado por 5 min a 95°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15% com tampão de corrida. Após a corrida das amostras, a transferência eletroforética das proteínas foi realizada, em que as proteínas separadas são transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês polyvinylidene fluoride) utilizando um tampão de transferência. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em solução salina tamponada com Tris (TBS) e incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários TIMP3 (1:500) e β-actina (1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com Tris e Tween[®] 20 (TBS-T) e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:16000). Os complexos imunes foram visualizados por quimioluminescência usando o *SuperSignal[™] Western Blot Enhancer* detectado pelo equipamento ChemiDoc MP disponível no Laboratório Multiusuário em Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). As proteínas foram quantificadas pelo *software* de análise de imagem *Image Lab 6.1* (Bio-Rad) e a proteína β-actina foi utilizada para normalização dos dados. A análise estatística da quantidade relativa de proteína de TIMP3 foi realizada no software *Graphpad Prism[®]* versão 8.0 utilizando o teste de Anova de uma via seguido do pós teste de Dunnett. Diferenças nas quantidades relativas de proteínas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4.11 INVASÃO CELULAR

As células da linhagem PC-3 foram previamente semeadas em placa de 24 poços e após 24 h foi realizada a transfecção celular com 100 nM do mimético e 100 e 200 nM do inibidor do miR-183-5p. Após o período de incubação de 24 h, as células foram soltas com tripsina e em torno de 50.000 células transfectadas foram semeadas com meio RPMI sem SBF na membrana basal reconstituída (Matrigel[®]), diluído 1:1 em meio RPMI, disposto sob os *Inserts Millicell[®]* com filtros de policarbonato de 12 mm e poros de 8 µm em placa de 24 poços. Abaixo dos *inserts* do controle lipofectamina, controle negativo, mimético, inibidor e controle positivo do ensaio (CPE), foram adicionados 300 µL de RPMI suplementado com 10% de SBF no poço da placa. Para o controle negativo do ensaio (CNE) foram adicionados 300 µL de RPMI sem SBF abaixo do *insert*. Após 48 h de incubação, as células que foram capazes de atravessar o matrigel foram fixadas no filtro do *insert* a partir da adição de metanol 100%, coradas com

cristal violeta 0,5%, eluídas em ácido acético 33% e então a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de fluorescência Perkin-Elmer LS55 (Boston, Massachusetts, USA) no comprimento de onda de 600 nm. Absorbância do controle negativo foi considerada como 100%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESUMO DOS RESULTADOS ALCANÇADOS

A partir dos resultados obtidos pela técnica de microarranjo e qPCR, o miR-183-5p demonstrou possuir expressão diferencial nas células tumorais da próstata (LNCaP e PC-3) quando comparado com a célula não tumoral da próstata (RWPE-1). Assim, o miR-183-5p foi selecionado para a identificação e validação de um alvo molecular no câncer de próstata. Para isto, ferramentas de bioinformática foram implementadas, resultando na identificação de TIMP3 como potencial alvo molecular do miR-183-5p no câncer de próstata. Desta forma, a transfecção celular com o mimético e inibidor do miR-183-5p foi realizada nas células de câncer de próstata metastático PC-3, seguido pela análise da expressão de TIMP3 por qPCR e *western blot*. Em suma, como resultados: 1) foi observado que ao inibir a expressão do miR-183-5p nas células da PC-3, houve um aumento significativo na expressão de TIMP3, tanto a nível de mRNA quanto a nível de proteico; 2) foi identificado que o miR-183-5p é capaz de favorecer a capacidade invasiva das células PC-3 através da supressão de TIMP3, um potente inibidor de MMPs; e 3) foi demonstrado por RT-qPCR que ao inibir a expressão do miR-183-5p as expressões de MMP3 e de MMP9 nas células de câncer de próstata PC-3 foram diminuídas significativamente.

A seguir mostramos os resultados detalhadamente, juntamente com a discussão.

5.2 SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DOS MIRNAS

Primeiramente, o perfil de expressão de miRNAs das linhagens de próstata foi analisado. As linhagens utilizadas nesta análise foram as de câncer de próstata LNCaP e PC-3, e a linhagem não tumoral de próstata RWPE-1. A RWPE-1 é uma linhagem humana proveniente do epitélio prostático e imortalizada com o papilomavírus humano 18 (HPV18). Além disso, esta linhagem é responsiva a andrógenos e produz PSA. Por outro lado, a LNCaP é uma linhagem celular humana de câncer de próstata proveniente de um sítio metastático no linfonodo, sendo responsiva a andrógenos e produz PSA (CUNNINGHAM; YOU, 2015). Já a PC-3 é uma linhagem celular humana de câncer de próstata proveniente de um sítio metastático no tecido ósseo, a qual não produz PSA e não é responsiva a hormônios androgênicos, apesar de expressar o receptor de andrógenos (AR) (ALIMIRAH et al., 2006). Estas linhagens

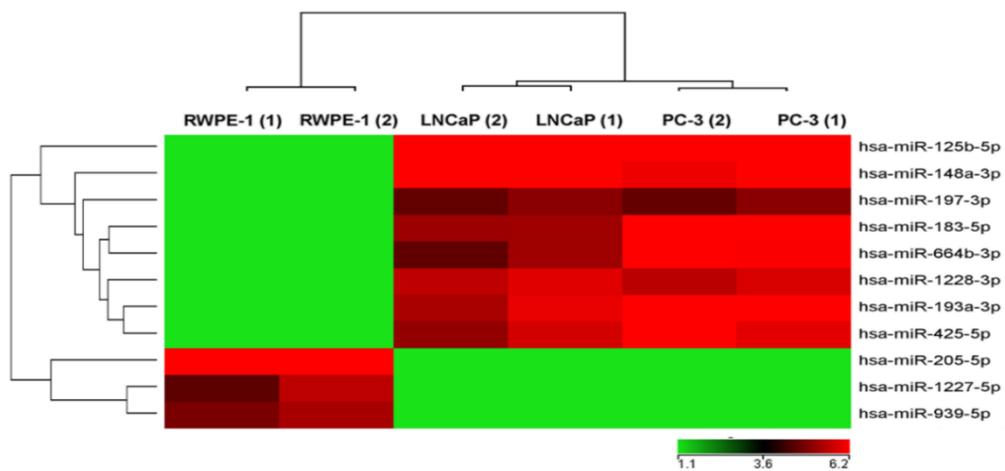
tumorais foram selecionadas por apresentarem diferentes respostas a andrógenos e por representarem diferentes evoluções clínicas do câncer de próstata, sendo a LNCaP andrógeno-dependente e com um comportamento biológico relativamente indolente e a PC-3 andrógeno-independente com características mais agressivas (TAI et al., 2011).

Existem evidências demonstrando que a linhagem PC-3 tem características semelhantes à de tumores neuroendócrinos de células pequenas da próstata, comumente chamado de carcinoma prostático de pequenas células (CPPC) (TAI et al., 2011). Estes tumores são raros e altamente agressivos, com alta extensão de metástase e baixa taxa de sobrevida. O CPPC é característico por não responder à terapia hormonal e apresentar baixos níveis de PSA, características às quais a linhagem PC-3 compartilha. O CPPC é composto por células anaplásicas da próstata, tendo maiores semelhanças às células do carcinoma de pulmão de células pequenas, e por esta razão, a terapia do CPPC é baseada na terapia do câncer de pulmão de células pequenas. Entretanto, na maioria dos casos, o CPPC está associado ao adenocarcinoma prostático, cujo surgimento demonstra estar associado a pacientes com adenocarcinoma que foram tratados previamente com terapia de privação androgênica (NADAL et al., 2014; PALMGREN; KARAVADIA; WAKEFIELD, 2007). Devido à alta agressividade dos CPPC e pelas células da linhagem PC-3 possuírem um perfil semelhante, torna-se interessante a investigação de miRNAs alterados nesta linhagem e a validação de alvos moleculares, com o intuito de melhorar o entendimento das modificações moleculares neste tipo de câncer, contribuindo para busca de novas estratégias terapêuticas. Por estas razões, este trabalho deu enfoque para a linhagem de câncer de próstata metastático PC-3.

A avaliação do perfil de expressão de miRNAs das linhagens de próstata foi realizada em trabalho anterior do grupo, em que foi utilizada a técnica de microarranjo (RODE, 2019; RODE et al., 2021). O microarranjo é uma técnica amplamente utilizada para a determinação do perfil de expressão de miRNAs, sendo disponível 2549 sondas de miRNAs com sequências conhecidas em lâminas Realase 21 provenientes da plataforma Agilent Technologies. Inicialmente, foram detectados 181 miRNAs nas amostras, sendo alguns miRNAs únicos de cada linhagem e a grande maioria em comum entre as três linhagens. A partir destes resultados, foram selecionados os miRNAs com expressão diferencial ($fold\ change \geq 2$) entre as linhagens tumorais (LNCaP e PC-3) e linhagem não tumoral (RWPE-1). Para a análise dos dados foi utilizado o teste-t moderado ($p \leq 0,01$) no *software* GeneSpring, resultando um total de 11 miRNAs alterados, representados na figura 7 na forma de mapa de calor (*heatmap*). Os valores de *fold change* (FC), de p , bem como a regulação, estão apresentados na tabela 1 (RODE et

al., 2021). Os 11 miRNAs alterados foram organizados de acordo com o valor de FC obtido para a linhagem tumoral PC-3 e foram separados em dois grupos conforme a regulação, oito miRNAs *up-regulated* (miR-125b-5p, miR-183-5p, miR-193a-3p, miR-148a-3p, miR-664b-3p, miR-425-5p, miR-1228-3p, miR-197-3p), ou seja, com expressão aumentada nas linhagens tumorais e três miRNAs *down-regulated* (miR-205-5p, miR-939-5p, miR-1227-5p), ou seja, com expressão reduzida nas linhagens tumorais quando comparada a linhagem não tumoral.

Figura 7 - Perfil de expressão de miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens tumorais (LNCaP e PC-3) e não-tumoral (RWPE-1).



Mapa de calor da intensidade de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens de próstata com valor de $p \leq 0,01$ e *fold change* ≥ 2 . A coloração verde indica ausência de expressão, preto indica baixa expressão e vermelho indica alta expressão do miRNA (RODE et al., 2021).

Tabela 1 - miRNAs com expressão alterada nas linhagens tumorais LNCaP e PC-3 em relação a linhagem não-tumoral RWPE-1

microRNA	Linhagens tumorais (LNCaP e PC-3) versus Linhagem não-tumoral (RWPE-1)			LNCaP versus RWPE-1	PC-3 versus RWPE-1
	Regulação	FC	Valor de p	FC	FC
miR-125b-5p	<i>up</i>	804,75	6,77E ⁻⁰⁵	879,13	736,66
miR-183-5p	<i>up</i>	60,89	0,0055	36,34	101,99
miR-193a-3p	<i>up</i>	61,64	0,0004	49,16	77,27
miR-148a-3p	<i>up</i>	102,49	0,001	142,55	73,68
miR-664b-3p	<i>up</i>	45,77	0,0044	29,60	70,77
miR-425-5p	<i>up</i>	53,23	0,0006	42,04	67,39
miR-1228-3p	<i>up</i>	50,26	4,33E ⁻⁰⁵	51,20	49,34
miR-197-3p	<i>up</i>	27,76	6,77E ⁻⁰⁵	27,76	27,76

miR-205-5p	<i>down</i>	771,07	4,39E ⁻⁰⁵	771,07	771,07
miR-939-5p	<i>down</i>	33,12	4,32E ⁻⁰⁵	33,12	33,12
miR-1227-5p	<i>down</i>	32,39	0,0004	32,39	32,39

FC: *fold change*.

A seleção dos miRNAs utilizados neste estudo foi baseada no valor de FC obtido na linhagem PC-3, na descrição funcional do miRNA na literatura e na quantidade de estudos publicados envolvendo o miRNA no câncer de próstata. Sendo assim, como pode ser observado na tabela 1, em relação ao valor de FC, destacam-se dois miRNAs: miR-125b-5p e miR-205-5p. O miR-125b-5p possui alta intensidade de expressão nas linhagens tumorais LNCaP e PC3 (FC de 804,75), sendo amplamente descrito na literatura como um miRNA com propriedades oncogênicas e está relacionado com a proliferação do câncer de próstata a partir da supressão de genes pró-apoptóticos, como PUMA e BAK-1 (AMIR et al., 2013a; SHI et al., 2012; WHITE et al., 2009), e também demonstra regular a sinalização p14ARF / Mdm2, estimulando a proliferação de células de câncer de próstata (AMIR et al., 2013b; LE et al., 2009). O miR-205-5p tem expressão diminuída nas linhagens tumorais LNCaP e PC3 (FC de 771,07) e atua como um supressor tumoral, o qual inibe a migração e invasão celular do câncer de próstata a partir da regulação do gene ZEB1 (LI; LI, 2018) e é capaz de sensibilizar as células à apoptose induzida pela quimioterapia e reduzir a agressividade das células do câncer de próstata através da regulação do oncogene BCL-W (BCL2L2) e HMGB3 (BHATNAGAR et al., 2010; YAMADA et al., 2017). Os miRNAs mencionados neste parágrafo estão extensamente descritos na literatura do câncer de próstata e diversos genes alvos já foram validados experimentalmente, conseqüentemente optou-se por selecionar miRNAs alternativos.

O miR-183-5p possui o terceiro FC mais alto na linhagem PC-3 (FC de 101,99) e é descrito na literatura como um miRNA com propriedades oncogênicas em diversas doenças malignas além do câncer de próstata, como câncer de mama (CHENG et al., 2016), câncer pancreático (MIAO et al., 2016), câncer colorretal, câncer de pulmão, entre outros (ZHANG et al., 2013). Alguns estudos vêm demonstrando que a expressão do miR-183-5p encontra-se mais elevada em pacientes com câncer de próstata mais agressivo e com metástases. A alta expressão deste miRNA já foi associada com uma maior concentração de PSA no diagnóstico, maior estágio patológico do tumor (pT3 – extensão extraprostática) e menor sobrevida global após prostatectomia radical, o que indica que o miR-183-5p pode estar associado com a progressão e agressividade do câncer de próstata (UENO et al., 2013; WASEEM et al., 2019). Ainda, o

miR-183 demonstra ter um papel essencial para a sobrevivência das células tumorais, uma vez que quando inibido em linhagens de câncer de próstata foi observada uma redução significativa na proliferação e motilidade celular, reduzindo o crescimento tumoral (UENO et al., 2013). Gao e colaboradores (2018) demonstraram que o miR-183 pode promover a proliferação e sobrevivência tumoral, e ser um dos responsáveis pela quimio-resistência ao docetaxel no câncer de próstata a partir da supressão do gene *Sprouty2* (*SPRY2*), um importante antagonista na sinalização extracelular de proteínas cinases (ERK, do inglês, *Extracellular Regulated protein Kinases*) (GAO et al., 2018).

O miR-183 é localizado como um cluster no cromossomo 7q32.2, sendo transcrito junto a miRNAs fisicamente adjacentes, o miR-96 e miR-182, que compartilham perfis de expressão similares (NCBI, 2021). Tanto o cluster miR-183-96-182 quanto os miRNAs sozinhos, encontram-se com a expressão aumentada no câncer de próstata. O cluster miR-183-96-182 demonstra ser responsável pela regulação intracelular da concentração de zinco nas células da próstata. O zinco é um micronutriente que demonstra ter papel protetor contra o desenvolvimento do câncer, regulando vias cruciais na carcinogênese, como proliferação, apoptose e metabolismo celular. Consequentemente, este cluster demonstra estar relacionado com o processo de carcinogênese a partir da supressão de transportadores de zinco (DAMBAL et al., 2017; MIHELICH et al., 2011). Como já mencionado, os níveis séricos de PSA elevado nem sempre estão relacionados com o câncer de próstata, podendo estar elevados em outras condições, como a hiperplasia prostática benigna (HPB). Waseem e colaboradores (2019) demonstraram que o miR-183-5p tem boa sensibilidade e especificidade para ser um potencial biomarcador para diferenciar pacientes com câncer de próstata de pacientes com HPB. Foi verificado que ocorre uma diferença na expressão do miRNA nestes pacientes, com uma expressão significativamente maior em pacientes com câncer de próstata do que em pacientes com HPB e em pacientes saudáveis (WASEEM et al., 2019).

O seguinte miRNA com um valor expressivo de FC na PC-3 foi o miR-193a-3p (FC de 77,27). Este miRNA possui dados contraditórios na literatura quanto a atuação no câncer de próstata. JIA e colaboradores (2017) demonstraram que o miR-193a-3p atua como promotor tumoral no câncer de próstata, o qual demonstrou ser responsável por promover migração celular em linhagens de câncer de próstata a partir da supressão do gene *AJUBA*. Este gene é essencial em diversos processos celulares, como adesão célula-célula, diferenciação, proliferação e migração celular (JIA et al., 2017). Entretanto, LIU e colaboradores (2017) demonstraram que o miR-193a-3p atua como supressor tumoral e possui expressão reduzida no

câncer de próstata, sendo responsável por inibir a proliferação celular das células tumorais através da regulação da expressão de CCND1 (ciclina D1), uma proteína reguladora do ciclo celular (LIU et al., 2017).

O miR-148a-3p também possui um valor expressivo de FC na PC-3 (FC de 73,68) e de acordo com a literatura o miRNA possui funções variadas conforme a dependência hormonal do câncer de próstata. É relatado na literatura que, em estudos com linhagem de câncer de próstata andrógeno-dependente, como a LNCaP, o miR-148a atua como promotor tumoral e induz a proliferação celular tumoral a partir da supressão do gene CCND1 (MURATA et al., 2010). Já em linhagens de câncer de próstata andrógeno-independente, como a PC-3, foi demonstrado que o miR-148a possui expressão reduzida quando comparado a linhagens hormônio-dependentes e atua como supressor tumoral. Foi demonstrado que o miR-148a inibiu a proliferação, migração e invasão celular da linhagem PC3PR (PC-3 Resistente ao Paclitaxel), e também atenuou a resistência ao paclitaxel a partir da supressão do gene MSK1 (FUJITA et al., 2010). Acredita-se que a expressão do miR-148a altere conforme a progressão do câncer de próstata.

O miR-664b-3p apresentou um valor expressivo de FC na PC-3 (FC de 70,77) e vem demonstrando possuir um papel importante na progressão tumoral. A expressão aumentada do miR-664 foi associada a um mau prognóstico em pacientes com carcinoma hepatocelular, auxiliando a progressão do tumor através da supressão dos genes MAT1A e SIVA1, favorecendo proliferação, migração e invasão tumoral (WANG et al., 2019; YANG et al., 2013a). Em células de câncer de pulmão, o miR-664 desempenha um papel importante na regulação da tumorigênese a partir da regulação da via de sinalização PTEN/AKT (ZHU et al., 2017). Em contraste, o miR-664 demonstrou atuar como um supressor tumoral em células de câncer cervical, inibindo a proliferação celular tumoral e induzindo a apoptose (MINGFEN et al., 2019; ZHANG; QIN; YANG, 2016). Assim como em células de melanoma maligno cutâneo o miR-664 demonstrou reduzir a proliferação tumoral através da supressão do gene PLP2 (DING et al., 2015), demonstrando que a expressão do miR-664 pode variar de acordo com o tipo celular tumoral. Entretanto, até o presente momento, o miR-664b-3p não foi descrito no câncer de próstata.

A partir da análise dos miRNAs com valores de FC mais expressivos, buscou-se selecionar dois miRNAs para a validação da expressão diferencial por qPCR nas linhagens de câncer de próstata. Foi optado por selecionar um miRNA com atuação e expressão conhecidas no câncer de próstata e um segundo miRNA ainda inexplorado no câncer de próstata. Desta

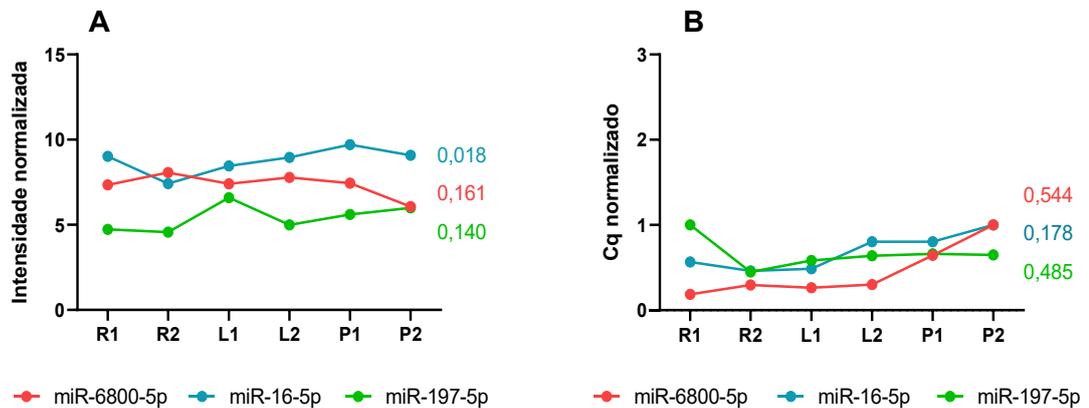
forma, um dos miRNAs selecionados foi o miR-183-5p, visto que este miRNA possui expressão bem definida no câncer de próstata e demonstra ter grande potencial em ser um biomarcador de prognóstico e/ou ser utilizado como alvo terapêutico devido ao seu papel no desenvolvimento, proliferação e motilidade de células tumorais. O segundo miRNA selecionado foi o miR-664b-3p, o qual demonstra possuir um papel importante na progressão tumoral, entretanto, pouco estudado em relação ao câncer de próstata.

5.3 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS MIRNAS POR RT-qPCR

Após a seleção dos miRNAs, foi realizada a validação da expressão do miR-183-5p e miR-664b-3p pela técnica de RT-qPCR nas linhagens de câncer de próstata. Faz-se necessário validar os dados do microarranjo para aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, visto que dependendo da normalização dos dados e a plataforma de análise utilizada, os resultados tendem a ter grande variabilidade, assim como hibridizações inespecíficas e/ou cruzadas (CHUAQUI et al., 2002; YANG et al., 2002). Para evitar possíveis vieses durante as análises de qPCR e aumentar a precisão dos resultados, a normalização dos dados de expressão utilizando miRNA de referência é uma etapa essencial. Portanto, para a escolha do miRNA de referência foi levado em consideração os valores de estabilidade calculados pelo software normFinder a partir dos valores de intensidade normalizada obtida no microarranjo entre aqueles miRNAs que obtiveram um perfil de expressão semelhante entre todas as linhagens celulares. Sendo assim, levando em consideração os valores de intensidade e estabilidade, o miR-197-5p, miR-16-5p e miR-6800-5p foram selecionados como potenciais candidatos para serem utilizados como miRNA de referência (Figura 8A). Assim, a validação da expressão destes miRNAs foi realizada por RT-qPCR e os valores de estabilidade foram calculados a partir dos valores de Cq normalizado pelo *software* normFinder (Figura 8B). Como resultado, o miR-16-5p apresentou o melhor valor de estabilidade e foi selecionado como miRNA de referência com o valor de estabilidade igual a 0,178. Em concordância, ZHAO e colaboradores (2018) demonstraram que o miR-16 apresenta boa estabilidade e é apropriado para ser utilizado como miRNA de referência para as linhagens de câncer de próstata LNCaP, 22RV1, PC-3 e DU145. Consideravelmente, o miR-16 tem sido identificado em diferentes estudos como um bom normalizador dos dados de qPCR em diversos tipos de câncer como: câncer de mama (DAVOREN et al., 2008; MCDERMOTT; KERIN; MILLER, 2013), câncer

colorretal (CHANG et al., 2010), câncer de bexiga (WANG et al., 2015) e câncer gástrico (SONG et al., 2012).

Figura 8 - Intensidade e estabilidade de expressão dos potenciais miRNAs de referência.

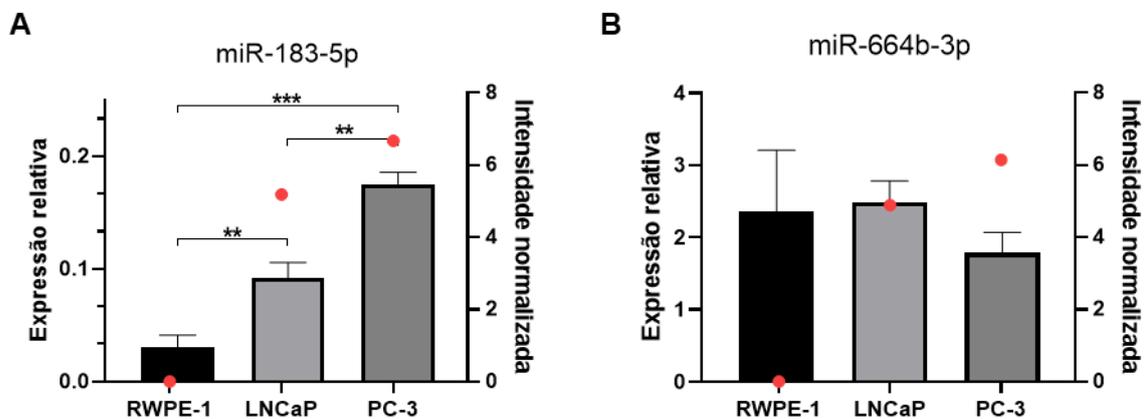


(A) Intensidade de expressão normalizada e valores de estabilidade calculados pelo software normFinder com base nos dados do microarranjo. (B) Valores de Cq normalizado e estabilidade de expressão dos miRNAs com base nos dados do qPCR. R1 e R2: replicatas da linhagem RWPE-1; L1 e L2: replicatas da linhagem LNCaP; P1 e P2: replicatas da linhagem PC-3.

A validação da expressão do miR-183-5p e miR-664b-3p por RT-qPCR foi realizada nas linhagens tumorais LNCaP e PC-3 e não tumoral RWPE-1. Os resultados de expressão relativa obtidos por RT-qPCR e os valores de intensidade normalizada obtidos no microarranjo estão representados na figura 9. Como pode ser observado na figura 9A, a expressão diferencial do miR-183-5p foi confirmada pela técnica de RT-qPCR ($FC \geq 2$ e $p \leq 0,05$), validando os dados obtidos no microarranjo. Pode ser observado que o miR-183-5p possui expressão significativamente maior nas células tumorais quando comparado com a linhagem não tumoral da próstata. Ainda, o miR-183-5p apresentou uma expressão significativamente maior na linhagem tumoral PC-3 quando comparada com a linhagem tumoral LNCaP, sugerindo que a expressão deste miRNA está mais elevada em células com características mais agressivas e que não respondem a andrógenos. A expressão diferencial do miR-183-5p nas linhagens tumorais de próstata está de acordo com a literatura (SCHAEFER et al., 2010; UENO et al., 2013; WASEEM et al., 2019). Quanto ao miR-664b-3p, pode ser observado na figura 9B que pelos resultados por RT-qPCR não houve diferença significativa na expressão deste miRNA entre as linhagens de próstata, o qual difere do resultado obtido pelo microarranjo. A diferença entre os resultados obtidos pela técnica de qPCR e microarranjo é comumente relatada na literatura, isto porque são técnicas com metodologias de detecção e sensibilidades diferentes, em que existem

variações sistemáticas e experimentais, como a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, hibridizações não específicas e/ou cruzadas, eficiência de incorporação do corante, assim como a normalização dos resultados, o que pode resultar em dados discordantes entre as técnicas. Sendo assim, em função da metodologia do qPCR ter maior especificidade e sensibilidade, os resultados obtidos pelo microarranjo do miR-664b-3p não foram considerados (CHEN et al., 2009; MOREY; RYAN; VAN DOLAH, 2006; YANG et al., 2002). Por esta razão, somente o miR-183-5p foi selecionado para as conseguintes análises de predição de genes alvos, o qual apresentou uma expressão diferencial entre as linhagens tumorais e não tumoral da próstata.

Figura 9 - Perfil de expressão dos miR-183-5p e miR-664b-3p nas linhagens de próstata.



Perfil de expressão dos miRNAs. (A) miR-183-5p. (B) miR-664b-3p. As colunas representam a média \pm desvio padrão dos valores de expressão relativa obtidos por RT-qPCR (n=3). Pontos em vermelho representam a média dos valores de intensidade normalizados obtidos no microarranjo. Asteriscos representam a diferença estatística entre os valores de expressão relativa (Teste de Anova de uma via e pós teste de Tukey; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.4 PREDIÇÃO E SELEÇÃO DE UM GENE ALVO DO MIR-183-5P

5.4.1 Predição de genes alvo do miR-183-5p

Para definir o gene alvo a ser estudado, foram realizadas análises computacionais de interações entre miRNA-mRNA para determinar os possíveis genes regulados pelo miR-183-5p. Para isto, foram utilizadas três ferramentas de bioinformática: LinkedOmics, miRWalk versão 2.0 e Gene Ontology Resource (GOR). A bioinformática é uma ferramenta que vem crescendo no meio científico nos últimos anos, principalmente no estudo de neoplasias. Basicamente, a bioinformática combina a ciência computacional com as ciências ômicas,

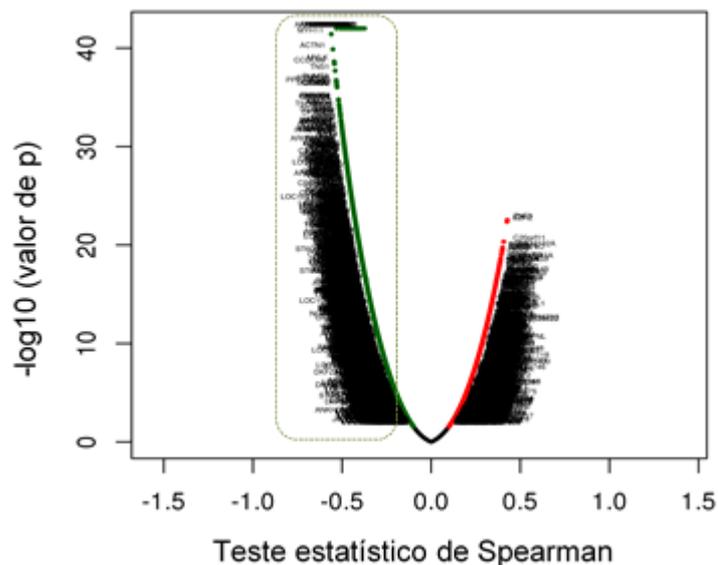
possibilitando análises exploratórias de dados biológicos. Com a bioinformática é possível explorar mecanismos moleculares associados ao câncer, como vias metabólicas e de sinalizações, mutações genéticas, expressão e perfil de proteínas, RNAs transcritos e miRNAs, sendo possível correlacionar estes dados com informações clínicas associadas à progressão das doenças e estratégias terapêuticas, como nível patológico do tumor, presença de metástases, doença residual mínima, expectativa de vida, aplicação de radioterapia e/ou quimioterapia. A bioinformática direcionada ao câncer abriu diversos caminhos na pesquisa científica, principalmente na identificação e validação de biomarcadores e alvos moleculares (WANG; LIOTTA, 2011; WU; RICE; WANG, 2012). Visto que para qualquer miRNA existe um grande número de alvos moleculares, uma abordagem computacional para simplificar e auxiliar neste procedimento é utilizada, a qual é capaz de prever e identificar aqueles genes com maiores potenciais de serem alvos moleculares de um miRNA. Atualmente já existem diversas ferramentas para análise computacional de potenciais alvos de miRNAs, e o número vem aumentando. A escolha da base de dados a ser utilizada vai depender da pergunta de cada pesquisador e a familiaridade com cada algoritmo.

5.4.1.1 *LinkedOmics*

A base de dados LinkedOmics é uma plataforma que contém dados multiômicos e clínicos de 32 tipos de câncer e um total de 11.158 pacientes. Estes dados foram integrados do projeto *The Cancer Genoma Atlas* (TCGA), o qual definiu perfis moleculares de tumores humanos a partir de plataformas genômicas, epigenômicas, transcriptômicas e proteômicas, com aproximadamente 100.000 atributos moleculares para cada tumor (TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015). A plataforma LinkedOmics foi desenvolvida para permitir a exploração e interpretação sistemática das complexas relações entre a grande quantidade de atributos clínicos e moleculares que foram disponibilizados pelo projeto TCGA. Assim, LinkedOmics inclui dados de mutações gênicas, metilação, expressão de mRNA, expressão de miRNA e dados clínicos, como estadiamento patológico do tumor, tipo histológico, presença de tumor residual e idade (VASAIKAR et al., 2018). O módulo de análise disponibilizada pela plataforma LinkedOmics e utilizada neste trabalho foi a LinkFinder, a qual permite realizar associações entre diversos atributos moleculares, proporcionando análises e associações entre bilhões de pares de atributos para cada coorte de câncer.

Desta forma, o módulo de análise LinkFinder foi utilizado para identificar possíveis genes regulados negativamente pelo miR-183 em amostras de tecido de pacientes com adenocarcinoma de próstata através da técnica de sequenciamento RNA-Seq. Esta técnica identifica o perfil de transcriptomas em amostras biológicas, possibilitando catalogar com alta qualidade e profundidade todos os transcritos de um tecido ou órgão (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Portanto, foi realizada a associação do miR-183 com os genes identificados nas amostras de pacientes com adenocarcinoma de próstata (n=493) a partir do coeficiente de correlação de Spearman, resultando em um total de 20.049 genes alvo. Destes alvos encontrados, foram selecionados particularmente aqueles com coeficiente de Spearman negativo até um valor máximo de -0,2 (Figura 10), pois quanto mais próximo a -1,0 maior é a correlação entre as variáveis. Valores negativos demonstram que a expressão do gene tende a diminuir conforme a expressão do miR-183 aumenta, ou seja, são genes que estão correlacionados negativamente com a expressão do miR-183. Com esta estratégia, foram selecionados 3.500 alvos correlacionados negativamente com o miR-183, os quais foram resguardados para serem utilizados posteriormente.

Figura 10 - Associação do miR-183 com amostras de pacientes com adenocarcinoma de próstata obtidos na base de dados LinkedOmics.



Associação do miR-183 com mRNA de amostras de pacientes com adenocarcinoma de próstata. Verde: genes negativamente correlacionados com o miR-183. Vermelho: genes positivamente correlacionados com o miR-183. Linha pontilhada: genes selecionados (3500 alvos). Medida não paramétrica de correlação de Spearman.

5.4.1.2 *miRWalk 2.0*

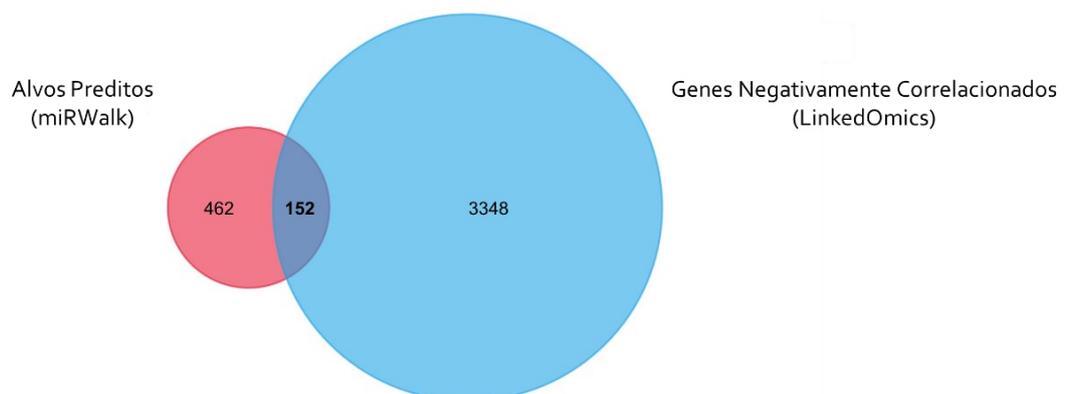
O *miRWalk* é um banco de dados que fornece as interações validadas ou preditas entre miRNAs e mRNAs. Para o desenvolvimento do módulo de alvos moleculares preditos, todas as informações genômicas referentes aos mRNAs foram retiradas dos bancos de dados GenBank, o qual incorpora todas as sequências de DNA disponíveis publicamente (BENSON et al., 2000), e Ensembl, o qual é um navegador de genoma que fornece informações genômicas para diversas espécies diferentes (FLICEK et al., 2010). E todas as informações referentes aos miRNAs foram retiradas do banco de dados miRBase, o qual consiste em um navegador que fornece informações e sequências de miRNAs publicados (GRIFFITHS-JONES et al., 2007). A partir destas informações, o algoritmo do *miRWalk* utiliza uma abordagem computacional para identificar sequências complementares entre o miRNA e o mRNA, classificando os sítios de ligação do miRNA em 4 regiões do mRNA: região promotora, 5'-UTR, região codificadora (CDS) e 3'-UTR (DWEET et al., 2011). É comum na comunidade científica a coleta de dados de interações entre miRNA-mRNA de diversos programas de predição distintos, seguido da intersecção dos dados obtidos em cada programa para aumentar a especificidade dos resultados obtidos e evitar ao máximo falsas interações (DWEET; GRETZ, 2015; SETHUPATHY; MEGRAW; HATZIGEORGIOU, 2006). Desta forma, o algoritmo *miRWalk 2.0* possibilita a intersecção dos resultados utilizando vários programas de predição de miRNA-mRNA no próprio banco de dados.

Para a coleta de dados da predição de alvos do miR-183-5p, foram selecionados os sítios de ligação do miRNA na região 3'-UTR do mRNA, visto que comumente é neste sítio de ligação que ocorre a regulação negativa do mRNA. Para a intersecção dos dados, foram selecionados seis programas de predição de miRNA-mRNA: *miRWalk* (DWEET; GRETZ, 2015), RNA22 (MIRANDA et al., 2006), miRDB (CHEN; WANG, 2020), miRMap (VEJNAR; ZDOBNOV, 2012), miRanda (JOHN et al., 2004) e TargetScan (AGARWAL et al., 2015). Como resultado, foi obtido uma tabela comparativa entre todos os programas selecionados com as predições de sítios de ligação do miR-183-5p na região 3'-UTR, no qual os genes alvo foram organizados de acordo com um somatório de presença ou ausência de predição nos programas selecionados, resultando em uma lista com mais de 9.000 genes preditos. Desta lista, foram selecionados os genes que estiveram preditos em comum com 6 ou 5 dos programas de predição de alvos selecionados, resultando em uma lista com 614 genes alvo preditos para o miR-183-5p.

5.4.1.3 Intersecção dos dados obtidos pelas plataformas *LinkedOmics* e *miRWalk*

Após obter a lista de alvos preditos para o miR-183-5p pelo banco de dados miRWalk 2.0 e a lista de genes correlacionados negativamente com o miR-183-5p no *LinkedOmics*, foi realizado a intersecção entre estas duas listas pelo diagrama de Venn (Figura 11). Como pode ser observado na figura 11, 152 genes, descritos no Apêndice A, estão em comum entre as duas listas, ou seja, estes genes são alvos preditos e estão correlacionados negativamente com a expressão do miR-183-5p. Os outros 462 genes são alvos preditos, mas não estão correlacionados negativamente com o miR-183-5p em amostras de pacientes com câncer de próstata e os 3348 genes estão correlacionados negativamente com a expressão do miR-183-5p, mas não possuem similaridade e não são previstos como alvos moleculares deste miRNA. Ao realizar a intersecção destes dados, torna-se a seleção dos genes mais precisa, visto que além da predição de interação do miR-183-5p com a região 3'-UTR dos respectivos genes, também é levado em consideração a expressão gênica quando o miR-183 encontra-se elevado em pacientes com adenocarcinoma de próstata. Assim, aumenta a probabilidade de que estes genes sejam alvos moleculares reais do miR-183-5p. Finalmente, os 152 genes preditos e correlacionados negativamente com o miR-183-5p foram analisados utilizando a base de dados Gene Ontology Resource.

Figura 11 - Diagrama de Venn dos alvos preditos e genes negativamente correlacionados com o miR-183-5p.



Intersecção dos 614 genes preditos para o miR-183-5p na base de dados miRWalk 2.0 com os 3500 genes correlacionados negativamente com o miR-183-5p em amostras de pacientes com adenocarcinoma de próstata. 152 genes estão preditos e correlacionados negativamente com o miR-183-5p. 462 genes são alvos preditos e não estão correlacionados negativamente com o miR-183-5p. 3348 genes estão correlacionados negativamente com o miR-183-5p e não são alvos preditos.

5.4.1.4 Gene Ontology Resource (GOR)

A plataforma GOR é um modelo computacional que fornece informações sobre as funções dos genes e produtos gênicos, como proteínas e RNAs não codificantes, o qual tem por objetivo facilitar a análise de vários genes. A plataforma GOR possui informações dos sistemas biológicos de diversas espécies e atualmente é o recurso mais abrangente de informações sobre as funções gênicas. Esta plataforma obtém a maioria dos dados derivados diretamente de experimentos publicados em periódicos, assim como conta com cientistas e pesquisadores para organizar os dados. Ainda, para organismos menos estudados, os dados da plataforma são derivados a partir de métodos de inferência ou por homologia de sequência. Nesta plataforma há três tipos de informações acessíveis sobre os genes: processos biológicos ao qual o gene contribui; função molecular; e componente celular, especificando o local da célula onde o gene é ativo (ASHBURNER et al., 2000; GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2021).

Para a análise dos 152 genes preditos e correlacionados negativamente com o miR-183-5p, foi utilizada a plataforma GOR a partir do software PANTHER, o qual permite a análise entre os genes e fornece informações sobre as funções e os processos biológicos correlacionados aos genes (MI et al., 2019). Como resultado, foi obtido uma lista com 191 processos biológicos correlacionados com os 152 genes selecionados, e em cada via biológica é possível identificar quais genes especificamente estão relacionados, identificando sua função molecular. A partir destes resultados, foram realizadas análises para a seleção do gene alvo a ser estudado.

5.4.2 Seleção de um potencial gene alvo do miR-183-5p

Para a escolha do gene alvo, foram definidos três critérios. O primeiro critério levou em consideração a relação do gene com processos biológicos do câncer, visto que o miR-183-5p demonstra ter papel fundamental na agressividade e progressão do câncer de próstata. Portanto, foram selecionados para as análises somente aqueles genes que fizessem parte de processos biológicos na plataforma GOR correlacionados com proliferação, migração, motilidade, invasão e apoptose celular. O segundo critério levou em consideração o papel do gene sobre as células tumorais, sendo selecionados somente aqueles genes que fossem supressores tumorais, uma vez que os 152 genes estão correlacionados negativamente com a

expressão do miR-183-5p. O terceiro critério levou em consideração o valor do coeficiente de Spearman, dando preferência para os genes que obtivessem uma correlação mais próxima a -1. Desta forma, os genes que respeitaram estes três critérios foram selecionados para a pesquisa na literatura. Em relação a cada gene foi buscado na literatura o respectivo papel no câncer de próstata, levando em consideração a função e a importância na progressão do câncer. Também foi levado em consideração se já existia algum estudo na literatura validando a regulação do gene pelo miR-183-5p, e caso tivesse, o gene era desconsiderado. Sendo assim, o gene alvo do miR-183-5p selecionado para a validação experimental foi o inibidor tecidual de metaloproteinase 3 (TIMP3). Adicionalmente, foi identificada a complementariedade de bases entre TIMP3 e o miR-183-5p a partir da base de dados miRMap, em que foi observado que o miR-183-5p possui dois potenciais sítios de ligação no TIMP3 e que a interação entre miRNA-mRNA é imperfeita, tendo complementariedade de 6-7 bases nitrogenadas (Apêndice B), indicativo de que o miR-183-5p potencialmente inibe a tradução do mRNA de TIMP3.

Um passo essencial para a progressão e metástase do tumor é a aquisição da capacidade de migração e invasão, e as metaloproteinases de matrix (MMP) desempenham um papel essencial neste processo a partir da degradação da matrix extracelular, a qual é responsável por manter a estruturação tecidual, comportamento e função celular, atuando como uma barreira física para a migração celular (ITOH; NAGASE, 2002). As ADAMs (do inglês, *A Disintegrin and Metalloprotease*) e ADAMTSs (do inglês, *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) também desempenham funções importantes na progressão do câncer a partir da liberação proteolítica de citocinas, fatores de crescimento, receptores de superfície celular e moléculas de adesão celular (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2009). O TIMP3 demonstra ter um papel essencial em inibir diversas MMPs, ADAMs e ADAMTSs, atuando como supressor tumoral em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de próstata. TIMP3 possui um papel essencial em inibir processos como a proliferação, migração e invasão tumoral, angiogênese, EMT e ainda é responsável por inibir a resistência a alguns quimioterápicos (SU et al., 2019). Em amostras clínicas de câncer de próstata, a expressão de TIMP3 encontra-se frequentemente diminuída e está associada com câncer de próstata de alto grau e com lesões metastáticas (SHINOJIMA et al., 2012). A perda da expressão de TIMP3 no câncer de próstata leva a inibição da apoptose celular, aumento da proliferação celular e crescimento tumoral, angiogênese, migração e invasão celular (ADISSU et al., 2015; WANG et al., 2018b; YANG et al., 2013b; ZHANG et al., 2010). Ainda, a expressão aumentada de TIMP3 em linhagens de câncer de próstata torna a terapia por Paclitaxel mais sensível (DENG

et al., 2006). Visto que a regulação negativa de TIMP3 está associada a diversos processos malignos do câncer de próstata, torna-se interessante o estudo e a possível validação de que TIMP3 possa ter sua expressão modulada pelo miR-183-5p.

5.5 CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TIMP3 PELO MIR-183-5P NA LINHAGEM DE CÂNCER DE PRÓSTATA PC-3

Após TIMP3 ser identificado como potencial alvo do miR-183-5p a partir da análise de predição de alvos pela bioinformática, a ligação do miR-183-5p com o alvo predito TIMP3 foi avaliada experimentalmente para validar a interação entre miRNA-mRNA. Para isto, foi realizada a transfecção celular do inibidor e do mimético do miR-183-5p nas células PC-3, a fim de modular a expressão do miRNA, seja inibindo ou mimetizando a expressão. Desta forma, é possível identificar se a expressão molecular de TIMP3 é modulada pelo miR-183-5p nas células de câncer de próstata PC-3.

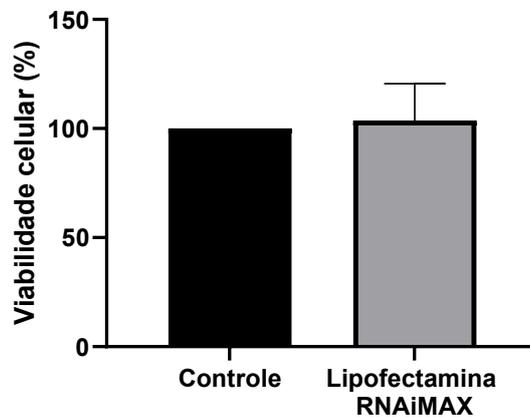
5.5.1 Transfecção celular do miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata PC-3

Para a modulação na expressão gênica do miR-183-5p na linhagem de câncer de próstata metastático PC-3, foi realizada a transfecção transitória a partir do método químico, com a utilização da Lipofectamina RNAiMAX para a transferência do inibidor e mimético do miR-183-5p para o interior das células. A Lipofectamina é um reagente de transfecção comumente utilizado em biologia celular por ser um procedimento simples e rápido, com alta eficiência de transfecção e reprodutibilidade (KAESTNER; SCHOLZ; LIPP, 2015), sendo esta técnica amplamente utilizada em análises de regulação entre miRNAs e mRNAs. A lipofectamina é composta por vesículas lipídicas catiônicas, que devido à diferença de carga, conseguem ligar-se aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos e formar um complexo com o miRNA, transportando-o através da membrana celular. Devido a carga negativa da membrana celular e a carga positiva do complexo de transfecção, ocorrem interações eletrostáticas e as células internalizam os complexos de transfecção por endocitose, formando um endossoma. Este endossoma é desestabilizado pelo próprio reagente de transfecção, ocorrendo o escape endossomal, em que o miRNA é liberado no citoplasma da célula, local onde atua.

A lipofectamina apresenta algumas limitações de uso, a eficiência de transfecção e eventual citotoxicidade são dependentes do tipo de célula utilizada. Consequentemente, o

reagente de transfecção deve ser testado e o protocolo otimizado antes da utilização (WANG et al., 2018a). Para isto, foi realizado um teste de citotoxicidade celular da Lipofectamina RNAiMAX na linhagem celular PC-3 com 6 horas de exposição, seguida de 48 horas de incubação somente com meio de cultura, tempo que foi definido a partir dos dados da literatura (CHEN et al., 2019; PIMENTA et al., 2018; LEWIS et al., 2014). Como pode ser observado na figura 12, não houve diferença de viabilidade celular entre as células expostas à lipofectamina e as células controle, demonstrando que este tempo de incubação é adequado. Sendo assim, neste trabalho, este foi o tempo de incubação definido para realização dos experimentos.

Figura 12 - Citotoxicidade da lipofectamina RNAiMAX nas células PC-3.

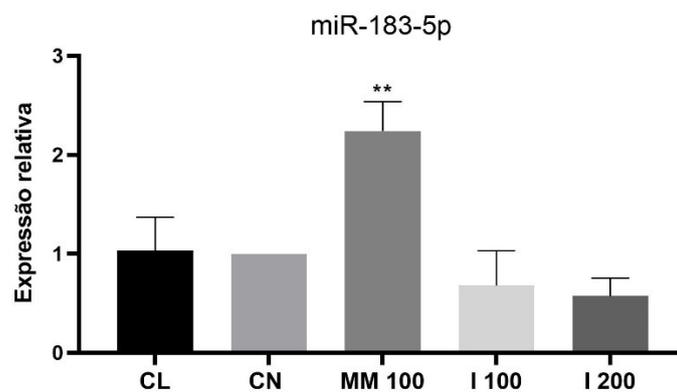


Análise da viabilidade celular em porcentagem de células PC-3 quando expostas à lipofectamina RNAiMax por 6 h, com posterior incubação por 48 h somente com meio de cultura, determinada pelo método do MTT. Valores representam a média \pm desvio padrão. Teste t não pareado.

Em seguida, a concentração do mimético e do inibidor do miR-183-5p para as células da linhagem PC-3 foi definida e a eficiência de transfecção foi avaliada por RT-qPCR. Para isto, as células foram transfectadas com 10, 50 e 100 nM do *mimic*-miR-183-5p (MM), com 10, 50, 100 e 200 nM do anti-miR-183-5p (I) e com as mesmas concentrações no controle negativo (CN) e controle da lipofectamina (CL). Os resultados foram analisados em relação ao CN. O CN é utilizado para determinar eficiência de transfecção, no qual a transfecção é realizada com um miRNA específico de planta (*ath*-miR-416) que não possui homologia com os genes humanos. Já no CL, o processo de transfecção é realizado com o vetor vazio (lipofectamina RNAiMAX sem miRNA) e permite examinar se o reagente de transfecção ou o próprio processo de transfecção possui algum efeito citotóxico ou inesperado nas células. Desta forma, as células PC-3 foram expostas aos complexos de transfecção e incubadas por 6 horas, seguida

de 48 horas de incubação somente com meio de cultivo, para que as células pudessem proliferar e a modulação da expressão do miR-183-5p ocorrer. Após o período de incubação, foi realizada a técnica de RT-qPCR para analisar a expressão do miR-183-5p nas células transfectadas, a fim de identificar se a modulação na expressão do ácido nucleico ocorreu. Como resultado, é possível observar na figura 13 que houve um aumento significativo da expressão do miR-183-5p na concentração de 100 nM do *mimic*-miR-183-5p quando comparado ao controle negativo, demonstrando que a transfecção com 100 nM do *mimic*-miR-183-5p foi eficiente. Nas concentrações do *mimic*-miR-183-5p de 10 e 50 nM não houve diferença significativa (resultados não mostrados). Quanto ao inibidor, é possível observar somente uma tendência em reduzir a expressão do miR-183-5p nas células da PC-3 transfectadas com as concentrações de 100 e 200 nM quando comparado ao controle negativo. Nas concentrações de 10 e 50 nM do inibidor não houve diferença quando comparado ao controle negativo (resultados não mostrados).

Figura 13 - Eficiência de transfecção do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.



Valores de expressão relativa do miR-183-5p nas células da PC-3 após a transfecção celular de 100nM do mimético e 100 e 200nM do inibidor do miR-183-5p determinados por RT-qPCR. Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Asteriscos representam a diferença estatística entre os valores de expressão relativa (Teste de Anova de uma via e pós teste de Dunnett; ** $p \leq 0,01$). CL: controle lipofectamina; CN: controle negativo; MM: *mimic*-miR-183-5p; I: inibidor-miR-183-5p.

Foram realizadas algumas tentativas para aprimorar a transfecção do inibidor a fim de obter eficiência na transfecção, como: o meio de transfecção OPTI-MEM foi testado e o pH acertado; variações e revisões no protocolo de transfecção foram feitas, como variações de tempo de incubação; a lipofectamina RNAiMAX foi substituída e a transfecção com lipofectamina 3000 foi realizada e testada. Mesmo que a lipofectamina RNAiMAX seja a lipofectamina com maior eficiência de transfecção para miRNA (WANG et al., 2018a), por

termos disponibilidade da lipofectamina 3000, foi decidido realizar um teste. Entretanto, não houve diferença nos resultados obtidos após realizar estas modificações. Algumas hipóteses foram levantadas para que não tenha sido possível observar uma diferença significativa na expressão do miRNA quando utilizado o inibidor. Acredita-se que possa ter ocorrido alguma interferência dos reagentes de transfecção com a metodologia da qPCR, como por exemplo, o iniciador do miR-183-5p utilizado na qPCR hibridizar com o inibidor do miR-183-5p utilizado na transfecção, e assim, quantificar um valor incorreto da expressão do miR-183-5p. Sendo assim, foi optado por dar continuidade aos experimentos e analisar a expressão de TIMP3 pós transfecção.

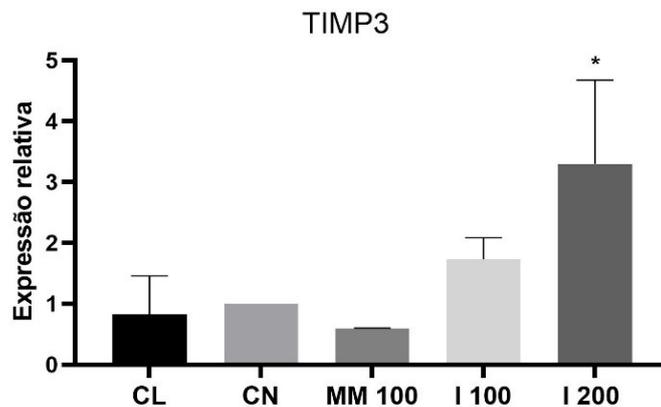
Adicionalmente, existem outras formas de avaliar a eficiência da transfecção celular a partir da análise de incorporação do complexo de transfecção nas células. Pode-se realizar a marcação do oligonucleotídeo de miRNA com um fluoróforo, permitindo identificar a localização subcelular do miRNA pós transfecção celular a partir de microscopia de fluorescência, analisando a eficiência de incorporação do miRNA nas células (BYROM et al., 2002). Da mesma forma, pode-se realizar a transfecção celular com um controle fluorescente, sendo o siRNA BLOCK-iT Alexa Fluor particularmente indicado para a transfecção celular com a lipofectamina RNAiMAX. Assim, a partir de microscopia de fluorescência, é possível identificar a incorporação do fluoróforo. A utilização de um controle fluorescente permite a emissão de um sinal mais claro e persistente do que a utilização de um miRNA marcado, sendo esta determinação a mais recomendada (INVITROGEN, 2006). A partir da utilização destas metodologias, tornam-se mais evidentes possíveis falhas do processo de transfecção.

5.5.2 Validação experimental de TIMP3 como alvo molecular do miR-183-5p

Para determinar e validar experimentalmente a interação entre miRNA-mRNA, uma combinação entre as técnicas de qPCR, ensaio de luciferase, *Western blot* e análise imunohistoquímica geralmente é utilizada para obter uma resposta mais definitiva sobre as interações (TARANG; WESTON, 2014). Desta forma, as metodologias de qPCR e *western blot* foram utilizadas para validar a interação molecular entre miR-183-5p e TIMP3. Sendo assim, a expressão de TIMP3 após a transfecção celular com 100 nM do mimético e com 100 e 200 nM do inibidor do miR-183-5p nas células da PC-3 foi analisada a partir da técnica de RT-qPCR. Como pode ser observado na figura 14, nas células transfectadas com o *mimic*-miR-183-5p, houve uma tendência a reduzir a expressão de TIMP3, entretanto este resultado não foi

significativo. O TIMP3 possui expressão inibida no câncer de próstata e possui baixa expressão nas células da PC-3 (SHINOJIMA et al., 2012), desta forma, acredita-se que uma redução significativa induzida pelo aumento na expressão do miR-183-5p seria dificilmente enxergada, justamente pela expressão celular de TIMP3 ser baixa nestas células. Por outro lado, utilizando 200 nM do inibidor do miR-183-5p, a expressão de TIMP3 aumentou significativamente nas células da PC-3 quando comparado com o controle negativo. Sendo assim, é possível identificar que a inibição deste miRNA interfere na expressão de TIMP3, corroborando com os dados de bioinformática mencionados anteriormente.

Figura 14 - Expressão relativa de TIMP3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.

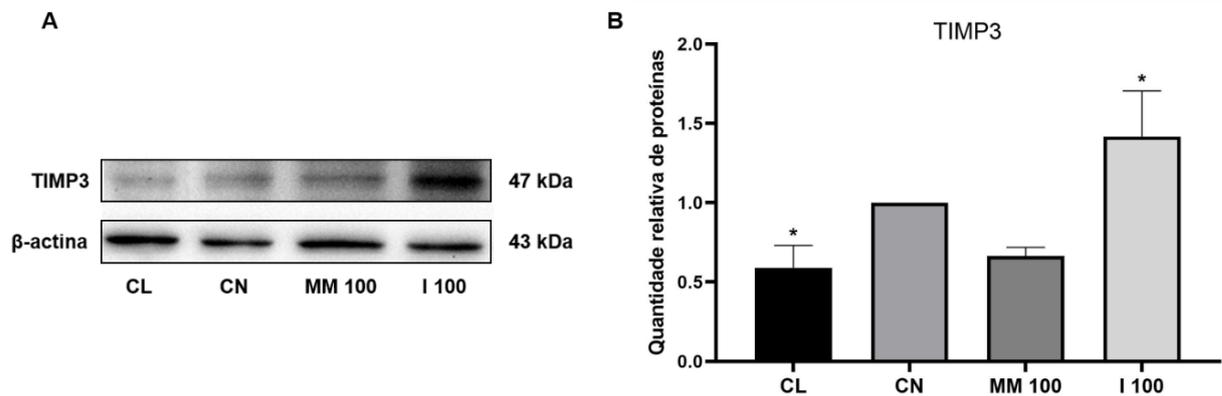


Valores de expressão relativa do TIMP3 nas células da PC-3 após a transfecção celular de 100 nM do mimético e 100 e 200 nM do inibidor do miR-183-5p determinados por RT-qPCR. Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Asteriscos representam a diferença estatística entre os valores de expressão relativa (Teste de Anova de uma via e pós teste de Dunnett; * $p \leq 0,05$). CL: controle lipofectamina; CN: controle negativo; MM: *mimic*-miR-183-5p; I: inibidor-miR-183-5p.

A fim de obter uma resposta mais definitiva da interação entre miRNA-mRNA, a quantidade relativa de proteína TIMP3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p foi analisada por *western blot*. Visto que a complementariedade de bases entre TIMP3 e miR-183-5p é imperfeita e que potencialmente o miR-183-5p atua suprimindo a tradução de mRNA de TIMP3, acredita-se que para visualizar resultados em relação à quantidade relativa de proteínas TIMP3 não necessite de grandes concentrações. Sendo assim, para esta metodologia optou-se por não utilizar a concentração de 200 nM do inibidor do miR-183-5p e utilizar somente as concentrações de 100 nM do mimético e do inibidor do miR-183-5p. Como pode ser observado na figura 15A e B, houve um aumento significativo na quantidade relativa de proteína TIMP3 nas células expostas ao inibidor quando comparado com o controle negativo.

Constata-se que ao inibir o miR-183-5p nas células da PC-3 a expressão em nível proteico de TIMP3 é restaurada, demonstrando que o miR-183-5p atua como um inibidor de TIMP3 nas células de câncer de próstata PC-3. Estes resultados possibilitaram validar por outra metodologia os resultados obtidos pela análise computacional.

Figura 15 - Quantidade relativa de proteína TIMP3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.



Análise da quantidade relativa da proteína TIMP3 após transfecção celular com 100 nM do *mimic*-miR-183-5p e 100 e 200 nM do anti-miR-183-5p nas células da PC-3 pela técnica de *western blot*. (A) Imagem da proteína em membrana PVDF após marcação com anticorpo específico. (B) Quantificação relativa da proteína TIMP3 normalizada pela β -actina. Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Teste de Anova de uma via e pós teste de Dunnett; * $p \leq 0,05$.

Ainda, na figura 15B, é possível observar que houve uma redução significativa na quantidade relativa de TIMP3 no controle da lipofectamina quando comparada ao controle negativo. A lipofectamina é um excelente reagente de transfecção, entretanto, o procedimento de transfecção não é inerte e tem potencial de causar alterações gênicas inesperadas nas células. Entretanto, a interferência da lipofectamina na expressão de TIMP3 não prejudicou os resultados obtidos pela regulação do miR-183-5p sobre TIMP3, visto que são regulações opostas.

Como mencionado anteriormente, os miRNAs têm atuação pós-transcricional e a complementariedade de bases entre miRNA-mRNA define o grau de repressão do mRNA, no qual a complementariedade de bases perfeita afeta a estabilidade do mRNA e leva a sua degradação (modificações em nível de mRNA e proteico), e a complementariedade de bases imperfeita induz a supressão da tradução do mRNA (modificações em nível proteico). Desta forma, alterações mais expressivas na produção de proteína do que a observada na expressão de mRNA é um grande indicativo de que a atuação do miRNA sobre o mRNA seja por inibição

da tradução de mRNA (TARANG; WESTON, 2014). Entretanto, isto não é uma regra. Vem sendo demonstrado que mesmo com complementariedade de bases imperfeita entre miRNA-mRNA, muitos genes podem ser regulados em nível de mRNA (GUO et al., 2010; LIM et al., 2005). Sendo assim, a diferença encontrada entre os níveis de mRNA e de proteína de TIMP3 com 100 nM do inibidor do miR-183-5p pode ser justificada devido a interação entre TIMP3 e miR-183-5p ser potencialmente por inibição da tradução, isto é, modificações a nível de mRNA são mais difíceis de identificar do que a nível proteico.

5.6 CAPACIDADE DO MIR-183-5P EM MODULAR A INVASÃO DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA PC-3

Identificar o papel funcional de um miRNA é essencial para a compreensão da respectiva atuação e importância para a condição analisada. Uma vez identificado o alvo molecular de um miRNA, é de grande importância identificar se o mRNA alvo é responsável por mediar o efeito fisiológico predito. Ação necessária para poder determinar se a interação entre o miRNA e o mRNA alvo tem relevância para a condição analisada (KARBIENER; GLANTSCHNIG; SCHEIDELER, 2014). Sendo assim, a partir da modulação da expressão do miR-183-5p nas células de câncer de próstata, torna-se interessante a realização de ensaios funcionais, como de angiogênese, migração e invasão celular, a fim de compreender se TIMP3 é responsável por mediar os efeitos fisiológicos do miR-183-5p no câncer de próstata.

Visto que o miR-183-5p demonstra estar relacionado com a agressividade do câncer de próstata, a análise da capacidade do miR-183-5p de modular a invasão celular das células de câncer de próstata PC-3 foi realizada. Para isto, a transfecção celular com 100 nM do mimético e 100 e 200 nM do inibidor do miR-183-5p foi realizada nas células PC-3 e em seguida o ensaio de invasão foi realizado. Para isto, as células transfectadas foram transferidas para *inserts* com filtros de policarbonato de 12 mm e poros de 8 μ m sob uma membrana basal reconstituída, a qual tem por papel mimetizar a matriz extracelular. As partes superior e inferior dos *inserts* foram expostas à diferentes gradientes de nutrientes, induzindo a migração das células para o meio com maior suporte nutricional. Após 72 h de incubação, as células que foram capazes de atravessar o *insert* foram fixadas com metanol 100%, coradas com cristal violeta 0,5%, e a capacidade invasiva foi determinada por espectroscopia de fluorescência. Como pode ser observado na tabela 2, ao aumentar a expressão do miR-183-5p nas células de câncer de próstata PC-3 não houve diferença significativa na capacidade invasiva das células. Entretanto, ao inibir

a expressão do miR-183-5p nas células houve uma redução na capacidade de invasão celular. Desta forma, constata-se que o miR-183-5p pode ser responsável em modular a capacidade invasiva das células de câncer de próstata PC-3. Visto que TIMP3 possui papel essencial em manter a integridade da matriz extracelular e que a perda da expressão do gene no câncer de próstata promove a proliferação, migração e invasão celular (ADISSU et al., 2015), sugere-se que o miR-183-5p promova a invasão celular no câncer de próstata a partir da supressão de TIMP3.

Tabela 2 - Capacidade invasiva das células de câncer de próstata PC-3 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p

Condição Experimental	Invasão Celular (%)
CL	96
CN	100
MM 100	87
I 100	78
I 200	63

CL: controle lipofectamina; CN: controle negativo; MM: *mimic*-miR-183-5p; I: inibidor-miR-183-5p.

5.7 EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A INVASÃO CELULAR APÓS TRANSFECÇÃO CELULAR DO MIMÉTICO E INIBIDOR DO miR-183-5p NAS CÉLULAS PC-3

Visto que o miR-183-5p promove invasão celular a partir da supressão de TIMP3 nas células de câncer de próstata PC-3, torna-se interessante identificar a atuação do miRNA em outros genes relacionados à invasão celular tumoral. Desta forma, levando em consideração a atuação de TIMP3 no câncer de próstata, a expressão gênica de importantes proteínas para a capacidade invasiva das células foram analisadas. Para isto, foi utilizada a base de dados STRING para identificar as interações previstas para TIMP3, a fim de selecionar aquelas proteínas relacionadas com migração e invasão celular. STRING é uma base de dados que integra todas as associações conhecidas e previstas entre proteínas, incluindo interações físicas e associações funcionais. A coleta de dados do STRING é feita a partir de evidências de mineração de texto automatizada da literatura (*text mining*), da utilização de bases de dados

com conhecimento prévio e consolidado sobre associações proteína-proteína (experimentalmente determinados) e de previsões de associação computacional com base em comparações de todo o genoma. Todas estas evidências de interação são avaliadas e pontuadas de 0 a 1, e estas pontuações são integradas em uma pontuação final. Quanto mais próximo a 1 for esta pontuação, maior é a estimativa de confiança sobre uma associação ser biologicamente significativa (SZKLARCZYK et al., 2021). Para este trabalho, foram selecionadas as seguintes associações entre proteínas disponibilizadas pela base de dados STRING: interações conhecidas, determinadas a partir de bases de dados experimentalmente determinadas; e interações preditas, determinadas a partir de *text mining* e homologia de proteínas. A partir da análise de todas estas associações, a base de dados calcula a pontuação final, dando um representativo da significância entre a interação proteína-proteína. Desta forma, foram selecionadas as proteínas que possuíram uma pontuação final de interação com TIMP3 maior que 0,900. A partir disto, as proteínas obtidas foram organizadas de acordo com a pontuação obtida na interação determinada experimentalmente e aquelas mais relevantes foram selecionadas para análise (tabela 3). Desta forma, visto que o miR-183-5p promove a invasão celular tumoral e que TIMP3 atua como inibidor de MMPs e ADAMs, as quais desempenham um papel essencial em estimular a degradação da matriz extracelular e induzir o processo de EMT durante o câncer para favorecer a invasão e migração celular (ITOH; NAGASE, 2002; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; LIU et al., 2016b), os genes selecionados para analisar a expressão celular foram: ADAM17, MMP2, MMP3 e MMP9.

Tabela 3 - Interações previstas para TIMP3 pela base de dados STRING

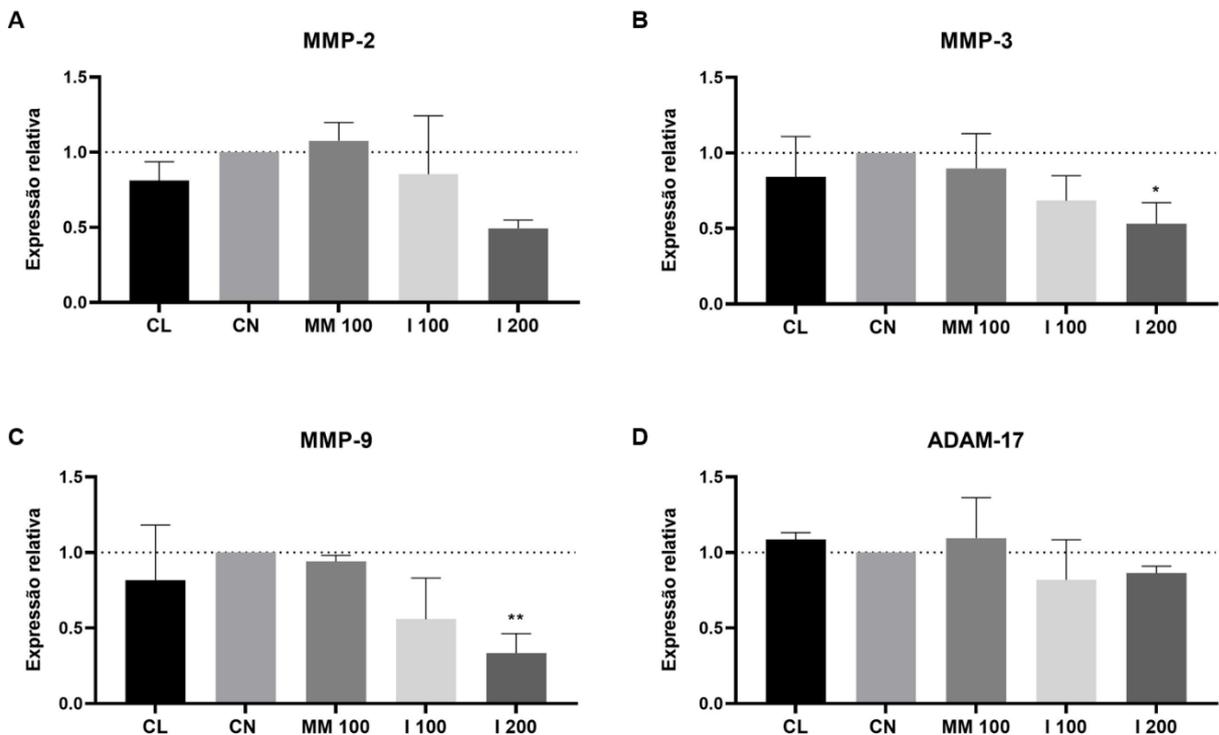
Proteína 1	Proteína 2	Interação determinada experimentalmente	Pontuação final
	ADAM17	0,847	0,987
	MMP2	0,670	0,998
	MMP3	0,568	0,930
	MMP9	0,327	0,987
TIMP3	ADAMTS5	0,270	0,902
	EFEMP1	0,213	0,982
	KDR	0,213	0,981
	TP53	0	0,948
	LRP1	0	0,910

A fim de identificar o papel do miR-183-5p em modular a expressão gênica de proteínas relacionadas à TIMP3 e ao processo de invasão celular, a transfecção celular com 100 nM do mimético e 100 e 200 nM do inibidor do miR-183-5p foi realizada nas células PC-3. Posteriormente, a expressão de MMP2, MMP3, MMP9 e ADAM17 pós transfecção celular foi determinada pela técnica de RT-qPCR. Como pode ser observado na figura 16, com a transfecção celular do *mimic*-miR-183-5p não foi observada diferença significativa em nenhuma proteína analisada, o que demonstra que aumentar a expressão do miR-183-5p não interferiu com a expressão de MMP2, MMP3, MMP9 e ADAM17. Quanto ao inibidor, é possível observar nas figuras 16A e D que não houve diferença significativa na expressão de MMP2 e ADAM17 quando comparado ao controle negativo. Entretanto, é possível observar uma convergência em diminuir a expressão de MMP2 e ADAM17 principalmente quando foi utilizado 200 nM do inibidor, concentração a qual também foi possível identificar uma redução significativa na expressão de TIMP3. Desta forma, sugere-se que com algumas alterações no protocolo de transfecção, como aumentar o tempo de exposição ao complexo de lipofectamina-miRNA ou aumentar o tempo de incubação das células, a redução na expressão de MMP2 e ADAM17 torne-se significativa no inibidor. Já nas figuras 16B e C, é possível observar que a expressão de MMP3 e MMP9 demonstrou uma redução significativa quando utilizado 200 nM do inibidor do miR-183-5p quando comparado ao controle negativo. Sendo assim, foi identificado que o miR-183-5p é capaz de modular a expressão gênica de MMP3 e MMP9 nas células PC-3, as quais são MMPs essenciais para a progressão e invasão celular do câncer de próstata. Constata-se também que, além do miR-183-5p inibir a expressão gênica de TIMP3 para impedir a inibição proteica de MMPs, o miR-183-5p também é capaz de promover a expressão gênica de algumas MMPs no câncer de próstata, como a MMP3 e MMP9. Desta forma, torna-se interessante a análise da quantidade relativa de proteínas de MMP3 e MMP9 após a transfecção celular através da técnica de *western blot* para a confirmação do papel do miR-183-5p proposto.

Além disto, TIMP3 é um potente inibidor de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, os quais são importantes atores na estimulação da expressão gênica de MMPs (CHAKRABORTI et al., 2003; LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011). Desta forma, além de TIMP3 inibir a nível proteico as MMPs, é possível que este gene também seja capaz de suprimir de forma indireta a expressão gênica de MMPs. Ou melhor, é possível que a redução na expressão gênica de MMP-3 e MMP-9 pela inibição do miR-183-5p nas células PC-3 possa

ter sido em razão do aumento na expressão de TIMP3. Desta forma, torna-se interessante a análise da expressão gênica e da quantidade relativa de proteínas de MMP3 e MMP9 após a modulação da expressão de TIMP3 nas células PC-3, através das técnicas de RT-qPCR e *western blot*, para analisar o papel inibitório de TIMP3 sob estas proteínas, no intuito de trazer algumas novas percepções neste sentido para o câncer de próstata.

Figura 16 - Expressão relativa de MMP2, MMP3, MMP9 e ADAM17 pós transfecção celular do mimético e inibidor do miR-183-5p nas células PC-3.



Valores de expressão relativa de (A) MMP2 (B) MMP3 (C) MMP9 e (D) ADAM17 nas células da PC-3 após a transfecção celular de 100 nM do mimético e 100 e 200 nM do inibidor do miR-183-5p determinados por RT-qPCR. Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Asteriscos representam a diferença estatística entre os valores de expressão relativa (Teste de Anova de uma via e pós teste de Dunnett; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). CL: controle lipofectamina; CN: controle negativo; MM: *mimic*-miR-183-5p; I: inibidor-miR-183-5p.

O miR-183-5p vem ganhando destaque na literatura e seu papel vem sendo cada vez mais elucidado no câncer de próstata. Recentemente foi demonstrado por Rizzo e colaboradores que o principal papel do miR-183-5p no câncer de próstata é modular a adesão celular, no qual foi identificado que ITGB1, um potente mediador da adesão celular, seja um alvo molecular do miR-183-5p (RIZZO et al., 2022). A regulação da adesão celular é um processo importante para a invasão e metástase tumoral, em que diversas proteínas tem a expressão alterada a fim de auxiliar na perda da adesão celular, como caderinas e integrinas (BRAS; TAUBENSLAG;

ANDL, 2012; JANISZEWSKA; PRIMI; IZARD, 2020). TIMP3 possui um papel importante em resguardar a adesão celular a partir da inibição da atividade das MMPs e ADAMs, as quais possuem papel essencial em inibir E-caderina, induzindo a EMT (ou transição epitélio-mesenquimal), favorecendo a migração e invasão celular (LIU et al., 2016b; MARETZKY et al., 2005; NAJY; DAY; DAY, 2008). A confirmação de que TIMP3 têm a expressão inibida pelo miR-183-5p no câncer de próstata é mais uma demonstração de que este miRNA possui importante papel em modular a adesão célula-célula nesta doença, assim como em favorecer a invasão celular a partir da modulação de MMP3 e MMP9. Além disto, foi demonstrado que o miR-183 aumenta a proliferação, migração e invasão celular no câncer de próstata a partir da supressão dos genes TPM1 (DAI; GAO, 2021), Dkk3 e SMAD4 (UENO et al., 2013). Sendo assim, o miR-183-5p demonstra grande potencial em ser utilizado como alvo terapêutico em pacientes com câncer de próstata metastático a fim de reduzir a agressividade do tumor, reduzindo o potencial de migração e invasão celular.

O câncer é uma doença altamente fatal e a terapia tradicional, como cirurgia, hormonioterapia, radioterapia e quimioterapia, desencadeiam diversos efeitos colaterais aos pacientes. Assim, com a procura de novas terapias para o câncer, a utilização de RNAi na clínica vem chamando a atenção. Entretanto, devido à alta instabilidade dos RNAi, quando administrados direto na circulação sistêmica sofrem degradação por nucleases e possuem rápida depuração renal (BRAVO et al., 2007). Portanto, o uso de nanocarreadores vem sendo empregado para garantir a integridade do RNAi e aprimorar a eficácia de entrega nas células de interesse (PECOT et al., 2011). Como estratégias de manipulação dos miRNAs *in vivo*, pode-se utilizar antagonistas do miRNA (antagomiR ou oligonucleotídeo anti-miRNA) ou um mimético do miRNA (miRNA artificial), estratégia similar ao que é visto na transfecção celular *in vitro* (CHRISTOPHER et al., 2016). Atualmente, em torno de 16 formulações com miRNAs estão em testes de fase pré-clínica e clínica para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. A terapia baseada em RNAi vem demonstrando ser extremamente promissora, e tudo indica que será a próxima geração de medicamentos para a cura de diversas doenças (CHAKRABORTY et al., 2021). Desta forma, visto o papel essencial do miR-183-5p no câncer de próstata, tem-se como futuras perspectivas o desenvolvimento e análise de nanocarreadores com o inibidor do miR-183-5p (anti-miR-183-5p) no câncer de próstata como terapia molecular, metodologia que vem sendo desenvolvida em nosso laboratório.

6 CONCLUSÃO

A partir da análise de predição de alvos pela bioinformática e validação experimental, foi identificado que o miR-183-5p é capaz de modular a expressão celular de TIMP3 nas células de câncer de próstata metastático PC-3. Além disto, foi mostrado que o miR-183-5p é responsável por favorecer a capacidade invasiva do câncer de próstata através da supressão de TIMP3. Adicionalmente, foi identificado que o miR-183-5p é capaz de modular a expressão de genes importantes para a invasão celular, como MMP3 e MMP9. Com estes resultados e com os dados presentes na literatura, o miR-183-5p demonstra possuir grande potencial em ser utilizado como alvo molecular para a terapia do câncer de próstata metastático.

7 PERSPECTIVAS

- Modificar os parâmetros experimentais como o tempo de incubação com a lipofectamina, a fim de identificar alterações na expressão de MMP2 e ADAM17;
- Identificar por western blot a quantidade relativa de proteínas de MMP3 e MMP9 após modular a expressão do miR-183-5p;
- A partir da modulação da expressão de TIMP3 analisar por RT-qPCR e western blot a expressão de MMP3 e MMP9 nas células de câncer de próstata PC-3.
- Como proposta de terapia molecular, desenvolver e avaliar um sistema nanocarreador para o anti-miR-183-5p em modelo 2D de câncer de próstata metastático.

REFERÊNCIAS

- ADISSU, H. A. et al. Timp3 loss accelerates tumour invasion and increases prostate inflammation in a mouse model of prostate cancer. **The Prostate**, v. 75, n. 16, p. 1831–1843, 2015.
- AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, n. AUGUST2015, p. 1–38, 2015.
- AGHDAM, S. G. et al. the role of microRNAs in prostate cancer migration, invasion, and metastasis. **Cellular Physiology**, v. 234, p. 9927–9942, 2019.
- ALEXANDRE, I. et al. **Diretrizes Oncológicas: Câncer de próstata** *Brazilian Journal of Health Economics*, 2019.
- ALIMIRAH, F. et al. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. **FEBS Letters**, v. 580, n. 9, p. 2294–2300, 2006.
- AMARAL, A. E. et al. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 274–287, 2018.
- AMIR, S. et al. Oncomir miR-125b Suppresses p14 ARF to Modulate p53- Dependent and p53-Independent Apoptosis in Prostate Cancer. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2013a.
- AMIR, S. et al. Oncomir miR-125b Suppresses p14ARF to Modulate p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis in Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2013b.
- ANASTASIADOU, E.; JACOB, L. S.; SLACK, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 5–18, 2017.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; FALCK ØRNTØFT, T. 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, p. 5245–5250, 2004.
- ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.
- BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 6, p. 187–204, 2012.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell Press**, v. 116, p. 281–297, 2004.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 15–18, 2000.
- BERLIN, A.; FERNÁNDEZ, M. Advances in the treatment of castration-resistant prostate cancer: emphasis in new hormonal therapies. **Rev Med Chile**, v. 143, p. 223–236, 2015.

BHASKARAN, K. et al. Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3.6 million adults in the UK. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 6, n. 12, p. 944–953, 2018.

BHATNAGAR, N. et al. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. **Cell Death and Disease**, p. 1–8, 2010.

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

BRAS, G. F. LE; TAUBENSLAG, K. J.; ANDL, C. D. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. **Cell Adhesion and Migration**, v. 6, n. 4, p. 365–373, 2012.

BRAVO, V. et al. Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 4, p. 1052–1055, 2007.

BRUMMER, A.; HAUSSER2, J. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. **Bioessays**, v. 36, n. 1, p. 617–626, 2014.

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. 3, p. 1–9, 2017.

BYROM, M. et al. RNAi in mammalian cells: visualizing siRNA and analyzing induction of RNAi. **Ambion TechNotes**, v. 9, n. 3, p. 6–8, 2002.

CANADIAN CANCER SOCIETY. **The prostate**. Disponível em: <<https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/the-prostate/?region=on>>. Acesso em: 12 maio. 2020.

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. 7–30, 2007.

CAPLAN, A.; KRATZ, A. Prostate-specific antigen and the early diagnosis of prostate cancer. **American journal of clinical pathology**, v. 117, n. 1, 2002.

CHAKRABORTI, S. et al. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1–2, p. 269–285, 2003.

CHAKRABORTY, C. et al. Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. **Journal of Advanced Research**, v. 28, p. 127–138, 2021.

CHAN, S. C.; DEHM, S. M. Constitutive Activity of the Androgen Receptor. **Advances in pharmacology**, v. 70, p. 327–366, 2014.

CHANG, K. H. et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

- CHEN, D. et al. **Circular RNA circHIPK3 promotes cell proliferation and invasion of prostate cancer by sponging miR-193a-3p and regulating MCL1 expression** *Cancer Management and Research*, 2019.
- CHEN, Y. et al. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, v. 10, p. 407, 2009.
- CHEN, Y.; WANG, X. MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, p. D127–D131, 2020.
- CHENG, Y. et al. MiRNA-183-5p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting the PDCD4. *Reproductive Biology*, v. 16, n. 3, p. 225–233, 2016.
- CHRISTOPHER, A. et al. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspectives in Clinical Research*, v. 7, n. 2, p. 68, 2016.
- CHUAQUI, R. F. et al. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature Genetics*, v. 32, n. 4S, p. 509–514, 2002.
- CONITEC. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata** Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia /Ministério da Saúde, 2016.
- CULIG, Z.; SANTER, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 33, n. 2–3, p. 413–427, 2014.
- CUNHA, G. R. et al. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differentiation*, v. 17, n. 3, p. 137–148, 1985.
- CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *The Endocrine Society*, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.
- CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *Journal of Biological Methods*, v. 2, n. 1, 2015.
- DAI, Y.; GAO, X. Inhibition of cancer cell-derived exosomal microRNA-183 suppresses cell growth and metastasis in prostate cancer by upregulating TPM1. *Cancer Cell International*, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021.
- DALGLEISH, T. et al. Firmagon (degarelix). *Journal of Experimental Psychology: General*, v. 136, n. 1, p. 23–42, 2007.
- DAMBAL, S. et al. **The miR-183 family cluster alters zinc homeostasis in benign prostate cells, organoids and prostate cancer xenografts** *Scientific Reports*, 2017.
- DAVOREN, P. A. et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Molecular Biology*, v. 9, p. 1–11, 2008.
- DENG, X. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in prostate cancer cells and confers increased sensitivity to paclitaxel. *European Journal of Cancer*, v. 42, n. 18, p. 3267–3273, 2006.

- DESVIGNES, T. et al. microRNA nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. **Trends Genet**, v. 31, n. 11, p. 613–626, 2016.
- DING, Z. et al. Loss of MiR-664 expression enhances cutaneous malignant melanoma proliferation by upregulating PLP2. **Medicine (United States)**, v. 94, n. 33, p. e1327, 2015.
- DWEEP, H. et al. MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 44, n. 5, p. 839–847, 2011.
- DWEEP, H.; GRETZ, N. MiRWalk 2.0: A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 697, 2015.
- EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 258–289, 2009.
- EPSTEIN, J. I. et al. The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 244–252, 2016.
- FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 34–45, 2001.
- FLICEK, P. et al. Ensembl 2011. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 10.1093, p. 1–7, 2010.
- FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92, 2009.
- FUJITA, Y. et al. MiR-148a Attenuates Paclitaxel Resistance of Hormone-refractory, Drug-resistant Prostate Cancer PC3 Cells by Regulating MSK1 Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19076–19084, 2010.
- GAO, W. et al. Long non-coding RNA CASC2 regulates Sprouty2 via functioning as a competing endogenous RNA for miR-183 to modulate the sensitivity of prostate cancer cells to docetaxel. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 665, p. 69–78, 2018.
- GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology resource: Enriching a Gold mine. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D325–D334, 2021.
- GREGORY, C. W. et al. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. **Cancer Research**, v. 61, n. 11, p. 4315–4319, 2001.
- GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 1–5, 2007.
- GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–840, 2010.
- HASSAN, O. et al. Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. **Journal of**

Hematology and Oncology, v. 5, p. 1–10, 2012.

HAY, E. D. Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. **Cell Differentiation and Development**, v. 32, n. 3, p. 367–375, 1990.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 2, p. 175–200, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil**. Serviço de ed. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer de Próstata**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>.

INVITROGEN. **BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo**, 2006.

ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays in Biochemistry**, v. 38, p. 21–36, 2002.

JACOB, K. et al. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: A possible mechanism for metastasis to bone. **Cancer Research**, v. 59, n. 17, p. 4453–4457, 1999.

JANISZEWSKA, M.; PRIMI, M. C.; IZARD, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 8, p. 2495–2505, 2020.

JIA, L. et al. **Androgen receptor-regulated miRNA-193a-3p targets AJUBA to promote prostate cancer cell migration** *Prostate*, 2017.

JOHN, B. et al. Human microRNA targets. **PLoS Biology**, v. 2, n. 11, 2004.

KAESTNER, L.; SCHOLZ, A.; LIPP, P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 6, p. 1171–1176, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1–9, 2009.

KARAN, D. et al. Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. **International journal of oncology**, v. 23, n. 5, p. 1365–1371, 2003.

KARBIENER, M.; GLANTSCHNIG, C.; SCHEIDELER, M. Hunting the needle in the haystack: A guide to obtain biologically meaningful microRNA targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20266–20289, 2014.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: The present and the future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3173–3178, 2010.

- KOIVISTO, P. et al. Androgen receptor gene amplification: A possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 57, n. 2, p. 314–319, 1997.
- KUHN, D. E. et al. Experimental validation of miRNA targets. **Methods**, v. 44, n. 1, p. 47–54, 2008.
- LAI, E. C. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. **Nature Genetics**, v. 30, n. 1, p. 363–364, 2002.
- LE, M. T. N. et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. **Genes and Development**, v. 23, n. 7, p. 862–876, 2009.
- LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, 2011.
- LEE, C.; KOZLOWSKI, J. M.; GRAYHACK, J. T. Intrinsic and Extrinsic Factors Controlling Benign Prostatic Growth. **The Prostate**, v. 138, n. February 1996, p. 131–138, 1997.
- LEENDERS, G. J. L. H. VAN et al. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 45, n. 7, p. 1005–1007, 2020.
- LEWIS, H. et al. **MiR-888 is an expressed prostatic secretionsderived microRNA that promotes prostate cell growth and migration** *Cell Cycle*, 2014.
- LI, L.; LI, S. miR - 205 - 5p inhibits cell migration and invasion in prostatic carcinoma by targeting ZEB1. **Oncology Letters**, v. 16, p. 1715–1721, 2018.
- LIM, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, p. 769–773, 2005.
- LIU, C. et al. Niclosamide enhances abiraterone treatment via inhibition of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32210–20, 2016a.
- LIU, Y. et al. **MT2-MMP induces proteolysis and leads to EMT in carcinomas** *Oncotarget*, 2016b.
- LIU, Y. et al. MicroRNA-193a-3p inhibits cell proliferation in prostate cancer by targeting cyclin D1. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5121–5128, 2017.
- 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.
- LOCHTER, A. et al. Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 Triggers a Cascade of Molecular Alterations That Leads to Stable Epithelial-to-Mesenchymal Conversion and a Premalignant Phenotype in Mammary Epithelial Cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 7, p. 1861–1872, 1997.
- LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Biological role of matrix

metalloproteinases: A critical balance. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 1, p. 191–208, 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MARETZKY, T. et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell–cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. **CELL BIOLOGY**, v. 102, n. 26, p. 9182–9187, 2005.

MCDERMOTT, A. M.; KERIN, M. J.; MILLER, N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

MCNEAL, J. E. The Zonal Anatomy of the Prostate. **The Prostate**, n. 2, p. 35–49, 1981.

MEDINA, P. P.; SLACK, F. J. MicroRNAs and cancer: An overview. v. 4101, n. 7:16, p. 2485–2492, 2008.

MI, H. et al. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D419–D426, 2019.

MIAO, F. et al. MicroRNA-183-5p promotes the proliferation, invasion and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 11, n. 1, p. 134–140, 2016.

MIDZAK, A. S. et al. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. **Elsevier Ireland Ltd.**, v. 15, n. 4, p. 23–31, 2008.

MIHELICH, B. L. et al. miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 44503–44511, 2011.

MINGFEN, L. et al. MicroRNA-664 suppresses the growth of cervical cancer cells via targeting c-kit. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 13, p. 2371–2379, 2019.

MIRANDA, K. C. et al. A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1203–1217, 2006.

MONTIRONI, R. et al. Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital System: Clinical Implications of the 4th Edition of the WHO Classification and Beyond. **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.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C.; VAN DOLAH, F. M. **Microarray validation: Factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR** *Biological Procedures Online*, 2006.

MURATA, T. et al. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 13, n. 4, p. 356–361, 2010.

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

NAJY, A. J.; DAY, K. C.; DAY, M. L. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18393–18401, 2008.

NAKAMURA, Y. et al. Type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in the adrenal reticularis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 6, p. 2192–2198, 2009.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **MIR183 microRNA 183 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=406959>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

NAUSEEF, J. T.; HENRY, M. D. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? **Nature Reviews Urology**, v. 8, n. 8, p. 428–439, 2019.

NAZARETH, L. V.; WEIGEL, N. L. Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 33, p. 19900–19907, 1996.

NOVARA, G. et al. Inflammation, apoptosis, and BPH: What is the evidence? **European Urology Supplements**, v. 5, n. 4, p. 401–409, 2006.

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.

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

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 6, p. 947–970, 2004.

PECOT, C. V. et al. RNAi in the clinic: challenges and future directions. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 1, p. 59–67, 2011.

PIMENTA, R. C. et al. MicroRNA-23b and microRNA-27b plus flutamide treatment enhances apoptosis rate and decreases CCNG1 expression in a castration-resistant prostate cancer cell line. **Tumor Biology**, p. 1–9, 2018.

PLACE, R. F. et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. **PNAS**, v. 105, n. 1, p. 1608–1613, 2007.

POND, G. R. et al. The prognostic importance of metastatic site in men with metastatic

- castration-resistant prostate cancer. **European Urology**, v. 65, n. 1, p. 3–6, 2014.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.
- RIOLO, G. et al. miRNA targets: From prediction tools to experimental validation. **Methods and Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 2021.
- RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- RIZZO, C. O. et al. Hsa-miR-183-5p Modulates Cell Adhesion by Repression of ITGB1 Expression in Prostate Cancer. **Non-coding RNA**, v. 8, n. 1, p. 1–21, 2022.
- ROAD, V. D. **Treatments Related to Various Stages of Prostate Cancer**. Disponível em: <<http://www.mpuh.org/centreforroboticsurgery/treatments-related-to-various-stages-of-prostate-cancer/>>. Acesso em: 13 jul. 2021.
- RODE, M. P. **Perfil de expressão de microRNAs nos exossomos derivados de linhagens de câncer de próstata: prosteccção de biomarcadores**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- RODE, M. P. et al. miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. **Cellular Signalling**, v. 87, 2021.
- RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 203–221, 2017.
- SADI, M. V. et al. Câncer da próstata resistente à castração (CPRC). **Comitê Brasileiro de Estudos em Uro-Oncologia (CoBEU)**, v. 25, 2011.
- SCHAEFER, A. et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 5, p. 1166–1176, 2010.
- SETHUPATHY, P.; MEGRAW, M.; HATZIGEORGIOU, A. G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. **Nature Methods**, v. 3, n. 11, p. 881–886, 2006.
- SHI, X.-B. et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. **National Institutes of Health**, v. 71, n. 5, p. 538–549, 2012.
- SHINOJIMA, T. et al. Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer. **Epigenetics**, v. 7, n. 11, p. 1279–1289, 2012.
- SONG, J. et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 4, p. 897–904, 2012.
- SPERLING, D. **Prostate Anatomy**. Disponível em: <<https://sperlingprostatecenter.com/wp-content/uploads/2018/11/Prostate-anatomy.png>>. Acesso em: 11 maio. 2020.

SRIVASTAVA, P.; KAPOOR, R.; MITTAL, R. D. Impact of MMP-3 and TIMP-3 gene polymorphisms on prostate cancer susceptibility in North Indian cohort. **Gene**, v. 530, n. 2, p. 273–277, 2013.

SU, C.-W. et al. TIMP-3 as a therapeutic target for cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2019.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D605–D612, 2021.

TAI, S. et al. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. **National Institutes of Health**, v. 71, n. 15, p. 1668–1679, 2011.

TAN, W. et al. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 3, p. 2735–2742, 2018.

TARANG, S.; WESTON, M. D. Macros in microRNA target identification: A comparative analysis of in silico, in vitro, and in vivo approaches to microRNA target identification. **RNA Biology**, v. 11, n. 4, p. 324–333, 2014.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1124–1128, 2008.

THERIAULT, R. L.; THERIAULT, R. L. Biology of bone metastases. **Cancer Control**, v. 19, n. 2, p. 92–101, 2012.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, 2009.

THOMPSON, I. M. 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*, 2004.

TOMCZAK, K.; CZERWIŃSKA, P.; WIZNEROWICZ, M. **The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge** *Wspolczesna Onkologia*, 2015.

UENO, K. et al. MicroRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 8, p. 1659–1667, 2013.

VASAIKAR, S. V. et al. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D956–D963, 2018.

VEJNAR, C. E.; ZDOBNOV, E. M. MiRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. 11673–11683, 2012.

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. 1–8, 2016.

WANG, L. et al. Identification and validation of reference genes for the detection of serum microRNAs by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in patients with bladder cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 615–622, 2015.

- WANG, T. et al. Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides. **Molecules**, v. 23, n. 10, 2018a.
- WANG, X. et al. Upregulation of miR-191 promotes cell growth and invasion via targeting TIMP3 in prostate cancer. **Journal of B.U.ON.**, v. 23, n. 2, p. 444–452, 2018b.
- WANG, X. et al. Overexpression of miR-664 is associated with poor overall survival and accelerates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 2373–2381, 2019.
- WANG, X.; LIOTTA, L. Clinical bioinformatics: A new emerging science. **Journal of Clinical Bioinformatics**, v. 1, n. 1, p. 2–4, 2011.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **National Institutes of Health**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.
- WASEEM, M. et al. MicroRNA-183-5p: A New Potential Marker for Prostate Cancer. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 207–212, 2019.
- WHITE, R. W. et al. MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 27, n. 3, p. 307–311, 2009.
- WINTER, J. et al. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.
- WU, D.; RICE, C. M.; WANG, X. Cancer bioinformatics: A new approach to systems clinical medicine.pdf. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 17, p. 1–4, 2012.
- WURDINGER, T.; COSTA, F. F. Molecular therapy in the microRNA era. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 7, n. 5, p. 297–304, 2007.
- XU, B. I. N. et al. MicroRNA-135a induces prostate cancer cell apoptosis via inhibition of STAT6. **Oncology Letters**, v. 17, n. 2, p. 1889–1895, 2019.
- XUE, M.; ZHUO, Y.; SHAN, B. MicroRNAs, long noncoding RNAs, and their functions in human disease. **Methods in Molecular Biology**, v. 1617, p. 1–25, 2017.
- YAMADA, Y. et al. Regulation of HMGB3 by antitumor miR-205-5p inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in prostate cancer pathogenesis. **Journal of Human Genetics**, p. 1–11, 2017.
- YANG, H. et al. MicroRNAs regulate methionine adenosyltransferase 1A expression in hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 285–298, 2013a.
- YANG, X. et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 21, p. 9688–9704, 2013b.
- YANG, Y. H. et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 4,

p. 2–10, 2002.

ZHANG, J.; MA, L. MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. **Cancer metastasis reviews**, v. 31, n. 0, p. 653–662, 2013.

ZHANG, L. et al. Inhibition of tumor growth and induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3. **Cancer Gene Therapy**, v. 17, n. 3, p. 171–179, 2010.

ZHANG, Q. H. et al. Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. **Gene**, v. 527, n. 1, p. 26–32, 2013.

ZHANG, Y. X.; QIN, L. L.; YANG, S. Y. Down-regulation of miR-664 in cervical cancer is associated with lower overall survival. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, n. 9, p. 1740–1744, 2016.

ZHAO, H. et al. Identification of valid reference genes for mRNA and microRNA normalisation in prostate cancer cell lines. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

ZHU, X. et al. microRNA-664 enhances proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 6, p. 3555–3562, 2017.

APÊNDICE A –ALVOS PREDITOS DO miR-183-5p

As listas de genes preditos para o miR-183-5p pelas bases de dados LinkedOmics e miRWalk v. 2.0 foram intersectadas a partir do diagrama de Venn, obtendo um total de 152 genes preditos em comum.

Tabela 4 - Genes alvos correlacionados negativamente com o miR-183-5p em pacientes com adenocarcinoma de próstata

ATP2B4	TMEM106A	SMAD3	VGLL3	THRA	URB1	HRH1	LCK
SYNPO2	PLEKHG3	PAM	C11orf63	OPCML	PNMA2	AFAP1	GRIA1
SORBS1	NTRK2	CTSB	NR3C1	SOX6	IDS	LTBP2	PDE3A
PALLD	NCAM1	ZFPM2	C9orf47	PLAG1	TGFA	AKAP12	ZNF319
SCARA3	FOXO1	MEF2C	MECP2	RABGAP1L	FUT2	MICB	TFCP2L1
KCNMB1	MCC	SCRN1	HLA-DOA	UNC5B	ANK1	ITGB1	TIAM1
PRICKLE2	KANK4	RHBDL3	SPRY3	ADCY2	SLC6A6	GALNT13	RAPGEF4
EYA4	NRG1	LHFPL2	RBMS1	SEMA5A	CD93	SLC35D1	LDLRAD2
GNAL	TACC1	APCDDL	ASTN1	CSDC2	ARHGAP26	IL6ST	IL15RA
CELF2	ZEB1	KIAA0513	SPRY2	NTN4	PI15	SACS	RAPGEF1
ATP1A2	TIMP3	RUNX1T1	PRKCA	EMP1	KCNK2	KIAA1671	PDE4C
MPP2	RASGRF2	KCNA2	PRRG4	KLRD1	MBNL1	SH2B3	PHF15
SLC16A2	PLEKHA2	SHROOM4	DEPDC5	SPRED1	IRS1	IPCEF1	IQGAP1
CDC42EP3	ADAMTS5	MPO	CYYR1	CSRNP3	BCL11B	MTR	PHOX
KIAA1644	AJAP1	FBXO32	TAL1	LMO3	EPHA4	BNIP3L	LATS2
RND2	MASP1	HECTD2	TBC1D2B	MAF	FAM115C	MICA	TRPS1
HLF	C1orf95	TCF4	AMOT	FKBP7	CDS2	SNX1	PTGS2
FRMD6	DYNC11I	EDA2R	GNG12	NOTCH1	PTPN14	ARHGEF18	CDC14B
P2RX1	RSU1	GPR173	BVES	BACH2	KCNE3	CPM	IL1RL1

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

APÊNDICE B – COMPLEMENTARIEDADE DE BASES miR-183-5p-TIMP3

A complementariedade de bases entre o miR-183-5p e o gene alvo TIMP3 foi identificada pela base de dados miRMap, demonstrando uma complementariedade de bases imperfeita com interação entre 6-7 nucleotídeos e dois possíveis sítios de ligação.

Figura 17 - Complementariedade de bases entre miR-183-5p e TIMP3

miRNA ▾	Gene ▾
hsa-miR-183-5p	TIMP3
Target site(s)	
	33257328 (chr 22) 1964
5' (mRNA)	
GUGUACCUUUCCTCAUUGUGGUC AUGCCAUUUGGCAGGG	
UCACUUAAGAUGGUCACGGUAU	
	33255609 (chr 22) 245
5' (mRNA)	
CAUUUCCACCGGGAUUUCUGGUC CAUGCCAGAAAG	
UCACUUAAGAUGGUCACGGUAU	

Imagem retirada da base de dados miRMap. *Target sites*: locais de ligação.