



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

Anne Natalie Prigol

**MicroRNAs carregados por nanopartículas híbridas na modulação gênica do câncer de  
próstata metastático**

Florianópolis

2024

Anne Natalie Prigol

**MicroRNAs carregados por nanopartículas híbridas na modulação gênica do câncer de  
próstata metastático**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr<sup>a</sup>.

Florianópolis

2024

Prigol, Anne Natalie

MicroRNAs carregados por nanopartículas híbridas na modulação gênica do câncer de próstata metastático / Anne Natalie Prigol ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, 2024.

139 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer de próstata. 3. miRNA. 4. Nanopartículas. 5. Microtumores. I. Pasa, Tânia Beatriz Creczynski. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Anne Natalie Prigol

**MicroRNAs carregados por nanopartículas híbridas na modulação gênica do câncer de próstata metastático**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 27 de março de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Dr<sup>a</sup>.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Sheila Maria Brochado Winnischofer, Dr<sup>a</sup>.

Universidade Federal do Paraná

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Orientadora

Florianópolis, 2024.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vera Lucia e Valdir, que não mediram esforços para que eu realizasse essa travessia e foram o meu porto seguro, além de serem meus grandes exemplos pessoais e profissionais, e a toda a minha família que com muito carinho, se faz presente;

A professora Tânia, pela orientação ao longo desta década, e a todos que foram meus colegas no grupo GEIMM e tornaram os dias mais leves, alegres e cafeinados;

A professora Cindy, que me recebeu em solo texano e fez o possível para que parte deste trabalho fosse realizado. Para além dos servidores envolvidos no processo de doutorado sanduíche a quem sou grata, agradeço especialmente a Lissette e aos demais colegas e professores do grupo de Houston pelo acolhimento, generosidade e paciência;

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós Graduação em Farmácia pela oportunidade do ensino público de qualidade e financiamento de participações em eventos científicos nacionais, e aos órgãos de fomento pelo recebimento das bolsas CAPES/DS e CAPES/PrInT, além do financiamento de projetos, reagentes e equipamentos vinculados ao CNPq e FAPESC, e aos laboratórios parceiros e professores responsáveis pelo LAITA, LVA, LAMEB, e LCME da UFSC;

E a todas as demais pessoas especiais, amigos e amor, que me acompanharam ao longo dessa trajetória, o meu muito obrigada.

## RESUMO

O câncer de próstata em estágio metastático ósseo é um grande problema de incidência global, para o qual não há cura. O avanço tumoral, além de outros fatores, é relacionado com a desregulação da expressão de microRNAs (miRNA), pequenas moléculas de RNA não codificantes que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. A aplicação terapêutica de miRNA, para repressão ou recuperação de moléculas cuja expressão esteja alterada, exige o uso de carreadores, como nanopartículas, para evitar a degradação do ácido nucleico. O objetivo deste trabalho foi encontrar miRNA para uso na terapia de modulação gênica através da entrega por nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio (NP de CaP) neste contexto. Na primeira parte do estudo, por análise de microarranjo, foi identificado o miR-205-5p como regulado negativamente em células PC-3 e a preparação de NP de CaP com molécula mimética do miRNA resultou em estruturas homogêneas esféricas de 50 nm, estáveis por até 90 dias. As NP de CaP foram eficientes na entrega e restauração do miR-205-5p nas células, levando à diminuição da viabilidade celular, e inibição dos genes alvos *RA*, *BAMBI*, *SMAD1/5/9*, *VEGFA*, e *ZEB1*, sem causar citotoxicidade. Na segunda parte do estudo, foi demonstrado por imagens de microscopia confocal a internalização das NP de CaP em células C4-2B cultivadas de maneira bidimensional (2D) e tridimensional em formato de microtumores (3D). Posteriormente, foi confirmada a regulação negativa do miR-224-5p nas células identificado após análise de sequenciamento massivo paralelo, bem como o efeito que a baixa expressão do ácido nucleico, evidenciada por NP de CaP carregadas com molécula inibitória do miRNA, resulta ao promover microtumores migratórios, hipótese está verificada pela tendência ao aumento da expressão de  $\beta$ -catenina. Somados, estes resultados indicam os miR-205-5p e miR-224-5p como supressores tumorais no CP metastático ósseo e destacam a aplicação das NP de CaP como veículo ideal para ensaios avançados de terapia baseada em ácidos nucleicos.

**Palavras-chave:** câncer de próstata, metástase óssea, miRNA, terapia gênica, nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio, microtumores.

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) in the bone metastatic stage is a global health concern for there is no cure. Tumor advancement, in addition to other factors, is related to the deregulation of the expression of microRNAs (miRNA), small non-coding RNA molecules that act as post-transcriptional regulators of gene expression. The therapeutic application of miRNA, for repression or recovery of molecules whose expression is altered, requires the use of carriers, such as nanoparticles, to prevent degradation of the nucleic acid. The objective of this work was to find miRNA for use in gene modulation therapy through delivery by hybrid calcium phosphate nanoparticles (CaP NP) in this context. In the first part of the study, the miR-205-5p was identified by microarray analysis as downregulated in PC-3 cells, and the preparation of CaP NP with a miRNA mimic resulted in homogenous 50 nm spherical structures, stable for up to 90 days. CaP NP were efficient in delivering and restoring miR-205-5p into cells, leading to reduced cell viability, and inhibition of target genes *AR*, *BAMBI*, *SMAD1/5/9*, *VEGFA*, and *ZEB1*, without causing cytotoxicity. In the second part of the study, confocal microscopy images demonstrated the internalization of CaP NP in C4-2B cells cultured in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) microtumor formats. Subsequently, the negative regulation of miR-224-5p was confirmed in cells identified after massively parallel sequencing analysis, as well as the effect that low expression of the nucleic acid, evidenced by CaP NP with inhibitory miRNA molecule, results in promoting more migratory microtumors due to an tendency of increased  $\beta$ -catenin expression. Taken together, these results indicate miR-205-5p and miR-224-5p as tumor suppressors in bone metastatic PCa and highlight the application of CaP NP as an ideal vehicle for advanced trials of nucleic acid-based therapy.

**Keywords:** prostate cancer, bone metastasis, miRNA, gene therapy, hybrid calcium phosphate nanoparticles, microtumors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A anatomia da próstata. ....	17
Figura 2 - Alterações genéticas no câncer de próstata.....	21
Figura 3 - Diagrama esquemático do escore de Gleason.....	26
Figura 4 - Biogênese dos miRNA. ....	32
Figura 5 - Barreiras para entrega sistêmica de miRNA.....	35
Figura 6 - Estrutura de microtumores.....	42
Figura 7 - Metodologia de preparação das NP de CaP.....	45
Figura 8 - Perfil de expressão dos miRNA alterados entre as linhagens RWPE-1 e PC-3. ....	55
Figura 9 - Caracterização das NP de CaP por DLS.....	61
Figura 10 - Morfologia das NP miR-205 por MET.....	62
Figura 11 - Estabilidade das formulações por DLS e PDI. ....	64
Figura 12 - Curva padrão de miRNA ....	66
Figura 13 - Citotoxicidade das NP de CaP em meio RPMI-1640. ....	68
Figura 14 - Citotoxicidade das NP de CaP em meio DMEM.....	69
Figura 15 - Restauração da expressão do miR-205-5p.....	71
Figura 16 - Avaliação da expressão de genes alvos do miR-205-5p.....	72
Figura 17 - Internalização das NP de CaP.....	76
Figura 18 - Avaliação da internalização dinâmica das NP de CaP em modelo 2D.....	77
Figura 19 - Estabelecimento dos microtumores. ....	80
Figura 20 - Avaliação da internalização dinâmica das NP de CaP em modelo 3D.....	81
Figura 21 - Expressão de miRNA entre as linhagens C4-2B e LNCaP. ....	83
Figura 22 - Atividade funcional das NP de CaP em modelo 3D.....	91
Figura 23 - Expressão de proteínas alvo do miR-224-5p em modelo 3D. ....	93
Figura 24 - Representação esquemática das hipóteses deste estudo. ....	94



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação histológica do câncer de próstata. ....	27
Tabela 2 - Principais terapias baseadas em miRNA que estão em fase de desenvolvimento. .	34
Tabela 3 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na técnica de RT-qPCR. ....	48
Tabela 4 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na técnica de RT-qPCR .....	52
Tabela 5 - Os miRNA alterados entre as linhagens PC-3 e RWPE-1. ....	56
Tabela 6 - Tamanho médio das NP CaP por DLS. ....	60
Tabela 7 - Estabilidade das NP de CaP. ....	65
Tabela 8 - miRNA diferencialmente expressos entre as linhagens C4-2B e LNCaP. ....	84

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Genes alvo do miR-224-5p validados experimentalmente .....	86
-----------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2D - bidimensional
- 3D - tridimensional
- AA - acetato de abiraterona
- ACLY - do inglês *ATP citrate lyase*
- AGO2 - argonauta 2
- AKT - do inglês *Serine/Threonine Protein Kinase*
- ALPL - do inglês *Alkaline Phosphatase*
- APC - do inglês *Adenomatous Polyposis Coli*
- ATM - do inglês *Ataxia Telangiectasia Mutate*
- AURKA - do inglês *Aurora Kinase A*
- BAMBI - do inglês *BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor*
- BAX - do inglês *BCL2 Associated X Protein*
- Bcl2 - do inglês *B Cell Lymphoma 2 Apoptosis Regulator*
- BCL2L2 - do inglês *BCL2 Like 2*
- BIRC5 - do inglês *Baculoviral IAP Repeat Containing 5*
- BMPs - do inglês *Bone Morphogemtic Proteins*
- BRCA2 - do inglês *Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein*
- CaP - fosfato de cálcio
- CBFA1 - do inglês *RUNX Family Transcription Factor 2*
- CDH1 - do inglês *Cadherin 1*
- CDH2 - do inglês *Cadherin 2*
- CHD1 - do inglês *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*
- CHIT1 - do inglês *Chitinase 1*
- COL1A1/3 - do inglês *Collagen Type I Alpha 1/3 Chain*
- CP - câncer de próstata
- CRISP - do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
- CSTP1 - do inglês *Cystatin Pseudogem 1*
- CTH - células-tronco hematopoiéticas
- CTNNB1 - do inglês *Catenin Beta 1*
- CXCL12 - do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 12*

Cy3 - cianina 3

DLS - espalhamento dinâmico de luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*

DMEM - do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

E2F1/F5 - do inglês *E2F Transcription Factors*

EC<sub>50</sub> - concentração efetiva 50

EGF - do inglês *Epidermal Growth Factor*

EI - eficiência de incorporação

EMT - transição epitélio-mesenquimal, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*

EPR - do inglês *Enhanced Permeability and Retention*

ERG - do inglês *ETS Transcription Factor ERG*

ETV1 - do inglês *ETS Variant Transcription Factor 1*

EZH2 - do inglês *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*

FAC - fibroblastos associados ao câncer, do inglês *Cancer Associated Fibroblasts*

FDA - do inglês *Food and Drug Administration*

FGF - do inglês *Fibroblast Growth Factor*

FOXA1 - do inglês *Forkhead Box Protein A1*

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

HCV - hepatite C

HEPES - ácido hidróxi-etil-piperazina-etano-sulfônico

HER3 - do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor 3*

HK2 - do inglês *Hexokinase 2*

IDH - índice de desenvolvimento humano

IL1/6/24/32 - interleucinas

IL6ST - do inglês *Interleukin 6 Cytokine Family Signal Transducer*

ISUP - do inglês *International Society of Urological Pathology*

KLK3 - do inglês *Kallikrein Related Peptidase 3*

LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC

LH - hormônio luteinizante

LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante

LNCaP - do inglês *Lymph Node Carcinoma of the Prostate*

MAPK - do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MET - microscopia eletrônica de transmissão

miRNA - microRNA

MMP - do inglês *Matrix Metalloproteinases*

MMSET - do inglês *Multiple Myeloma SET Domain Containing Protein*

MTS - [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]

mV - milivolt

MRX34 - do inglês *miR-34 mimic*

MYC - do inglês *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma*

NCOR1 - do inglês *Nuclear Receptor Corepressor 1*

NIH - *National Institute of Health (US)*

NKX3-1 - do inglês *NK3 Homeobox 1*

NP - nanopartículas

NP ácido nucleico\_Cy3 - nanopartículas contendo molécula controle de siRNA associada a cianina 3 fluorescente

NP miR-205 - nanopartículas contendo a molécula mimética do miR-205-5p

NP AntagomiR - nanopartículas contendo a molécula inibidora do miR-224-5p

NP de CaP - nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio

NP Mock- nanopartículas sem miRNA

NP Scramble- nanopartículas contendo sequência de miRNA sem homologia com sequências de genes humanos

nt - nucleotídeos

OCLN - do inglês *Occludin*

ONECUT2 - do inglês *One Cut Homeobox 2*

OPG - do inglês *Osteoprotegerin*

OPN - do inglês *Opsin*

PARP - poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase

PBS - tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PDI - índice de polidispersão, do inglês *Polydispersity Index*

PDGF - do inglês *Platelet Derived Growth Factor*

PEBP1 - do inglês *Phosphatidylethanolamine Binding Protein 1*

PEG - polietilenoglicol

PEG-GLU - polietilenoglicol com ácido glutâmico

PIK3CA/B - do inglês *Phosphoinositide 3-Kinases*

PiRNA - do inglês *PIWI-interacting RNAs*

PKC $\epsilon$  - do inglês *Protein Kinase C Epsilon*

pré-miRNA - precursores de miRNA

pri-miRNA - miRNA primário

PSA - antígeno específico da próstata, do inglês *Prostate-Specific Antigen*

PSMA - do inglês *Proteasome 20S*

PTEN - do inglês *Phosphatase and Tensin Homologue*

PTH - hormônio da paratireoide

qPCR - do inglês *quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*

RA - receptor de andrógeno

RAC1 - do inglês *Rac Family Small GTPase 1*

RANKL - do inglês *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

RASSF1 - do inglês *Ras Association Domain Family Member 1*

RB1 - do inglês *RB Transcriptional Corepressor 1*

RES - retículo endoplasmático

RISC - complexo de indução do silenciamento, do inglês *RNA-induced silencing complex*

RNAi - RNA de interferência

RPMI-1640 - do inglês *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RRM2 - do inglês *Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2*

RUNX2 - do inglês *RUNX Family Transcription Factor 2*

SBOC - Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica

SFB - soro fetal bovino

SHBG - globulina de ligação a hormônios sexuais, do inglês *Sex Hormone Binding Globulin*

sh-STAT3 - do inglês *Short Hairpin RNA - Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

siRNA - do inglês *small interfering RNA*

Slug - do inglês *Snail Family Transcriptional Repressor 2*

SMADs - do inglês *Mothers Against Decapentaplegic Homolog Family*

SMP - Sequenciamento Massivo em Paralelo

Snail - do inglês *Snail Family Transcriptional Repressor 1*

snoRNA - do inglês *small nucleolar RNA*

SPOP - do inglês *Speckle Type BTB/POZ Protein*

STAT3A/B - do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 3 A/B*

TGF - do inglês *Transforming Growth Factor*

TMPRSS2 - do inglês *Transmembrane Protease Serine 2*

TNM - do inglês *Tumor-Node-Metastasis*

TOP2A - do inglês *DNA topoisomerase II alpha*

TP53 - do inglês *Tumor Protein 53*

TP63 - do inglês *Tumor Protein 63*

TRIS - tris (hidroximetil)aminometano

TWIST1 - do inglês *Twist Family Bhlh Transcription Factor 1*

UAP1 - do inglês *UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase 1*

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UTR - do inglês *untranslated region*

VCAM1 - do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

VEGF - do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

WHO - Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

Wnt - do inglês *Wingless-Type MMTV Integration Site Family*

ZBTB16 - do inglês *Zinc Finger and BTB Domain Containing 16*

ZEB1 - do inglês *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*

ZNF292 - do inglês *Zinc Finger Protein 292*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	19
LISTA DE FIGURAS .....	20
LISTA DE TABELAS .....	21
LISTA DE QUADROS .....	22
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	23
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1 PRÓSTATA .....	16
2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA .....	18
2.2.1 Epidemiologia.....	18
2.2.2 Sinais e sintomas .....	19
2.2.3 Desenvolvimento tumoral e alterações moleculares .....	19
2.2.4 Diagnóstico e classificações .....	24
2.2.5 Tratamento.....	27
2.3 RNA DE INTERFERÊNCIA .....	30
2.3.1 miRNA .....	31
2.4 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS .....	36
2.4.1 Nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio .....	37
2.5 MODELOS TRIDIMENSIONAIS PARA PESQUISA DO CÂNCER DE PRÓSTATA .....	39
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
3.2.1 No Brasil.....	43
3.2.2 Nos EUA .....	43
4 METODOLOGIA.....	44
4.1 METODOLOGIA REALIZADA NO BRASIL.....	44
4.1.1 Identificação do miRNA alvo.....	44
4.1.2 Preparação das nanopartículas.....	44
4.1.3 Caracterização das nanopartículas.....	45



4.1.4 Avaliação morfológica das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	46
4.1.5 Eficiência de encapsulação de miRNA .....	46
4.1.6 Cultura celular .....	47
4.1.7 Citotoxicidade.....	47
4.1.8 RT-qPCR .....	47
4.2. METODOLOGIA REALIZADA NOS EUA .....	49
4.2.1 Cultura celular 2D .....	49
4.2.2 Incorporação estática das nanopartículas em modelo 2D.....	49
4.2.3 Incorporação dinâmica das nanopartículas em modelo 2D .....	50
4.2.4 Estabelecimento de modelo 3D .....	50
4.2.5 Incorporação dinâmica das nanopartículas em modelo 3D .....	51
4.2.6 Identificação do miRNA alvo.....	51
4.2.7 Tamanho e viabilidade celular do modelo 3D.....	52
4.2.8 Imunofluorescência indireta .....	53
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1 MODULAÇÃO DO MIR-205-5P – RESULTADOS OBTIDOS NO BRASIL.....	54
5.1.1 Escolha do miR-205-5p .....	54
5.1.2 Caracterização das nanopartículas.....	60
5.1.3 Estudos funcionais.....	67
5.2 MODULAÇÃO DO MIR-224-5P – RESULTADOS OBTIDOS NOS EUA .....	74
5.2.1 Incorporação 2D e 3D das nanopartículas.....	74
5.2.2 Escolha do miR-224-5p.....	82
5.2.3 Estudos funcionais.....	90
6 CONCLUSÕES .....	96
7 PERSPECTIVAS .....	97
REFERÊNCIAS .....	98
ANEXO A – Artigos .....	132

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer caracteriza-se por um amplo grupo de doenças que possuem em comum o descontrole na proliferação celular, que pode resultar na invasão de órgãos ou partes do corpo adjacentes ou mesmo distantes do foco inicial, culminando em complicações fisiológicas e morte. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022), cerca de 10 milhões de pessoas foram a óbito em decorrência de câncer em 2020, ou seja, a causa de uma em cada seis mortes. Entre os tipos mais comuns, estão o câncer de mama, de próstata, de pulmão, de bexiga, tumores uterinos, e o melanoma (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024). No Brasil, o câncer de próstata (CP) é o segundo mais incidente na população masculina, atrás apenas do câncer de pele do tipo não melanoma (Brasil, 2023).

Em fases iniciais, o CP tem alta taxa de resposta aos tratamentos e sobrevida em 5 anos próxima a 100% para o tumor localizado ou regional. Entretanto, a presença de metástases em locais distantes é acompanhada da redução da taxa de sobrevida em 5 anos para 30% (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024). As atuais opções terapêuticas para o CP aprovadas no Brasil consistem em vigilância ativa, prostatectomia radical, radioterapia, quimioterapia, e hormonioterapia, uma vez que a proliferação de células prostáticas é dependente de andrógenos como a testosterona e a di-hidrotestosterona (Brasil, 2016). Contudo, o avanço da doença é frequentemente acompanhado da resistência à andrógenos, condição em que as células continuam a proliferar mesmo na condição de quantidade reduzida de hormônios (Pienta; Bradley, 2006; Howard *et al.*, 2019). Para os casos de CP metastático resistente a andrógenos, não há terapia efetiva disponível.

Na busca por novos medicamentos para a doença avançada destaca-se a imunoterapia (Bansal *et al.*, 2021) e RNAs de interferência (RNAi) como siRNA (do inglês, *small interfering RNAs*), e miRNA (Tian *et al.*, 2021). Os miRNA consistem em pequenas moléculas de RNA não codificantes com cerca de 18 a 26 nucleotídeos, que atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica (Cai *et al.*, 2009). Uma vez desregulados, podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias doenças, inclusive do câncer. Os miRNA foram inicialmente creditados pela redução da expressão gênica ao ligarem-se na região 3' dos respectivos alvos, através da indução da clivagem ou da repressão da tradução gênica. Entretanto, recentemente a capacidade de miRNA ligarem-se com a região promotora e também

ativarem a expressão gênica foi evidenciada. Este processo é denominado de ativação do RNA (Ramchandran; Chaluvally-Raghavan, 2017).

Após a identificação da sub expressão dos miR-15 e miR-16 com o desenvolvimento de leucemia de células B (Calin *et al.*, 2002), o controle da expressão destas moléculas como um potencial alvo terapêutico vem sendo amplamente estudado (Chakraborty *et al.*, 2021). Contudo, como as moléculas de miRNA administradas de forma livre não possuem as propriedades necessárias para serem internalizadas por células alvo (Dasgupta; Chatterjee, 2021), faz-se necessário o uso de carreadores para promover a proteção do ácido nucleico, garantir a respectiva entrada no citoplasma das células e execução da função (Pecot *et al.*, 2011). Nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio vêm sendo utilizadas para a entrega de miRNA por serem biocompatíveis, biodegradáveis, e possuírem afinidade para ligação à ácidos nucleicos (Qiu *et al.*, 2022). No CP, estas nanopartículas mostraram-se eficientes para promover a entrega do miR-34a em células PC-3, diminuindo a proliferação e migração celular (Jung *et al.*, 2015).

No presente trabalho, que foi parcialmente desenvolvido durante Estágio de Doutorado Sanduíche na Rice University e University of Texas Health Science Center (Houston, Texas, Estados Unidos da América - EUA) e, portanto, assim dividido ao longo do texto, nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio foram utilizadas para modulação da expressão de miRNA em modelos de câncer de próstata metastático, como investigação preliminar de agente terapêutico no CP avançado. A abordagem aqui realizada para prospecção de alvos no câncer de próstata não se limita a esta condição, uma vez que a alteração do perfil de expressão de miRNA já é conhecido para diversas doenças e pode ser adaptada a miRNA alvo-específicos, assim como contribuir para a busca de biomarcadores não invasivos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRÓSTATA

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino localizada abaixo da bexiga, que possui maior taxa de crescimento durante a puberdade, atingindo o peso fisiológico máximo na idade adulta de aproximadamente 20 gramas (Ismail; Gomella, 2001), tendo como função principal a secreção de fluido alcalino para proteção dos espermatozoides no ambiente ácido vaginal. O fluido também contém proteínas e enzimas de suporte que fornecem nutrição ao esperma. O volume adicionado do fluido prostático ao fluido seminal e ao esperma permite uma propulsão mecânica mais fácil através da uretra (Singh; Bolla, 2021).

A próstata é uma glândula fibromuscular densa com formato de cone invertido, tendo a base superior próxima ao colo da bexiga urinária, e o ápice inferior situado no esfíncter uretral externo. Uma cápsula fibrosa envolve a glândula, com nervos e um plexo vascular, que é circundado por uma camada visceral de fâscia pélvica (Verze; Cai; Lorenzetti, 2016).

Clinicamente, a próstata é dividida em cinco lobos, sendo dois laterais, um posterior, um anterior, e um médio. Histologicamente, a glândula pode ser dividida em zona central, de transição, e periférica. Em adultos jovens, a zona periférica compõe 70% do tecido glandular e é a maior responsável pela função normal da próstata. É também o local mais comum de origem de neoplasias, quase 80% dos tumores prostáticos surgem nesta região. Ainda, há uma área denominada estroma fibromuscular anterior dentro da próstata, esta área não é glandular e contém principalmente tecido muscular e fibroso (Figura 1A) (Mcneal, 1981; Mcneal *et al.*, 1988).

A glândula consiste em ductos e ácinos embutidos no estroma. Os ductos e ácinos compreendem uma única camada de epitélio colunar simples envolto por uma camada de epitélio basal, a membrana basal. Essa camada de matriz extracelular está ancorada às células do estroma, que são predominantemente miócitos de músculo liso que promovem a contratilidade espontânea e previnem a estagnação de fluídos (Abate-Shen; Shen, 2000; 2002) (Figura 1B). O epitélio prostático consiste basicamente de três tipos celulares: células basais, células do lúmen, e células neuroendócrinas, que constituem menos de 1% do total (Hu; Choo; Huang, 2015). O estroma também contém fibroblastos, que sustentam os ductos. Estas células epiteliais expressam altos níveis do receptor de andrógenos (RA) e também secretam o antígeno prostático específico (PSA, do inglês, *Prostate-Specific Antigen*), uma serina protease que é

ativada transcricionalmente pelo RA e frequentemente elevada em homens com CP (Toivanen; Shen, 2017).

Figura 1 - A anatomia da próstata.

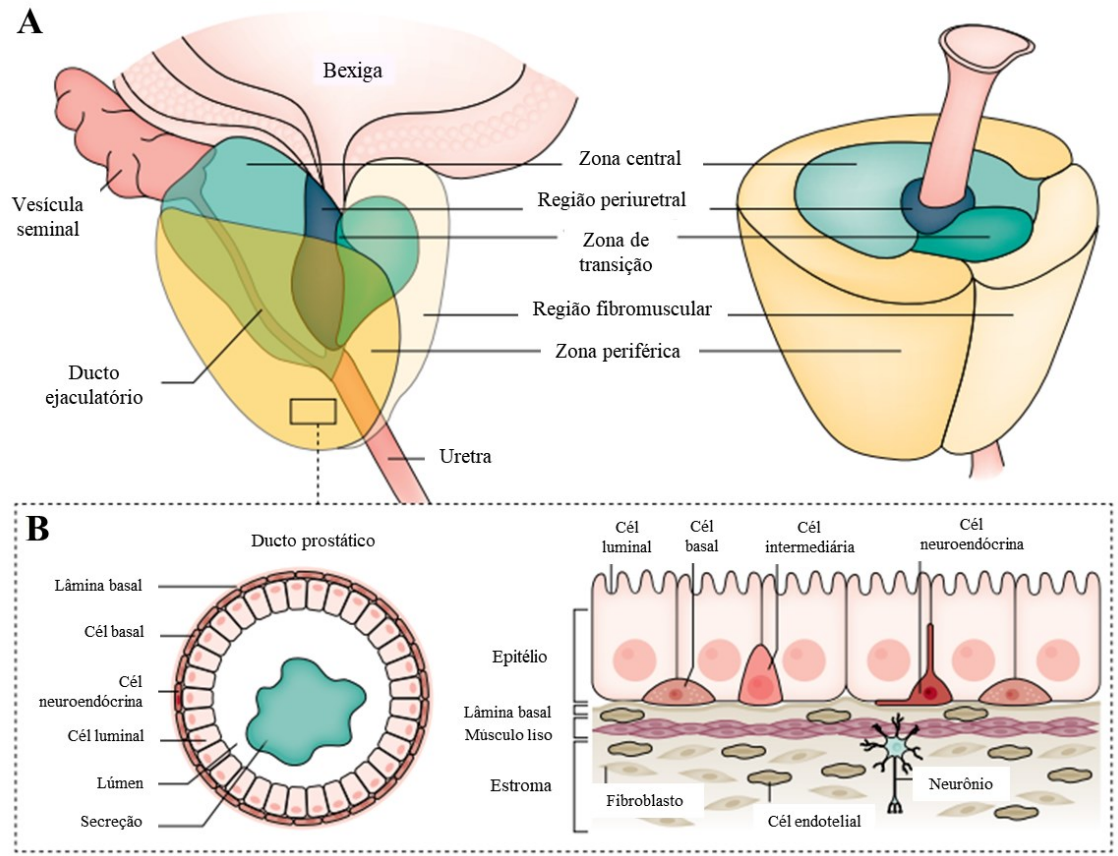


Figura adaptada de Rebello *et al.* (2021).

No adulto, após atingir o tamanho fisiológico, a próstata entra em uma fase de manutenção, na qual a taxa de proliferação celular diária (1 a 2%) é contrabalanceada por igual taxa de morte celular programada (Kyprianou, 2003; Shariat *et al.*, 2004). A diferenciação e o desenvolvimento glandular são finamente regulados por andrógenos, sendo em sua grande maioria através da testosterona produzida nas células de Leydig dos testículos (95%), por estímulo do hormônio luteinizante (LH) da hipófise que, por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo (Tan *et al.*, 2015). A síntese de testosterona inicia a partir da conversão de pregnenolona e progesterona a deidroepiandrosterona e androstenediona, por ação da enzima  $17\alpha$ -hidroxilase, que são então transformadas a androstenediol e testosterona, pela ação da  $17\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (Galbraith; Duchesne, 1997). O androstenediol também é convertido a testosterona pela ação da  $3\beta$ -

hidroxiesteroide desidrogenase. A testosterona total é então liberada na circulação sanguínea e liga-se à albumina (Baker, 2002) e a globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG, do inglês, *Sex Hormone Binding Globulin*), restando apenas 5% livre no plasma e biologicamente ativa (Nakhla *et al.*, 2009; Deb *et al.*, 2018).

A testosterona livre não ligada, através da interação hidrofóbica com os fosfolipídios da membrana, é internalizada e metabolizada pela enzima 5 $\alpha$ -redutase a di-hidrotestosterona, que se liga com maior afinidade do que a testosterona ao RA. O RA então dissocia-se das proteínas de choque térmico, e o complexo é translocado para o núcleo celular (Srinivas-Shankar; Wu, 2006). No núcleo, o receptor liga-se às regiões promotoras de genes alvo para a codificação de diversas proteínas, inclusive fatores de crescimento que são estimulantes potenciais da proliferação celular prostática (Nadal *et al.*, 2017).

Os andrógenos não produzidos nas células de Leydig (5%), são sintetizados nas glândulas adrenais sob a ação do hormônio adrenocorticotrófico da hipófise, que é regulado pelo GnRH, e liberados principalmente na forma de androstenediona, que é periféricamente convertida em testosterona (Isaacson; Jones; Krueger, 1993). A prolactina e o hormônio de crescimento também estimulam a produção de andrógenos tanto nos testículos como nas adrenais (Costello; Franklin, 1994; Colao *et al.*, 2004).

## 2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA

### 2.2.1 Epidemiologia

O CP é o segundo mais comum em homens brasileiros, atrás apenas do câncer de pele do tipo não melanoma, sendo estimados 71.730 mil novos casos para cada ano do triênio 2023-2025, correspondendo a 10,2% dos tumores incidentes no sexo masculino, e a 15.841 óbitos anuais (Brasil, 2023). De forma semelhante, a estimativa mundial aponta o CP como o segundo mais incidente em homens, com 1,4 milhão de novos casos anuais, representando 14,1% de todos os cânceres considerados, atrás apenas do câncer de pulmão (14,3%) (Ferlay *et al.*, 2021; Sung *et al.*, 2021).

O CP é o câncer mais comumente diagnosticado em mais de 50% dos países do mundo (112 de 185), cuja incidência varia consideravelmente entre países com alto índice de desenvolvimento humano (IDH) e aqueles com baixo IDH, 37,5 vs 11,3/100.000 pessoas, respectivamente, ainda que as taxas de mortalidade sejam menos variáveis, 8,1 vs 5,9/100.000 pessoas (Sung *et al.*, 2021). Nos EUA, por exemplo, foram estimados 299.010 novos casos e

35.250 mortes em decorrência do CP para o ano de 2024, representando 29% de todos os casos de câncer em homens do país (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024).

As regiões com índices mais elevados de CP são o norte da Europa, Europa Ocidental, Caribe, Austrália e Nova Zelândia, América do Norte e África Austral. Os índices mais baixos são encontrados na Ásia e no norte da África, ainda que esteja sendo observado um aumento de casos em países asiáticos, como Japão e Cingapura, onde, historicamente, esse câncer tinha uma baixa taxa de incidência (Baade; Youlden; Krnjacki, 2009). As taxas de mortalidade diferem significativamente das taxas de incidência, com os valores mais altos no Caribe (75,8/100.000 pessoas), África Subsaariana (22,0/100.000 pessoas) e Micronésia/Polinésia (18,8/100.000 pessoas) (Siegel *et al.*, 2021).

A incidência do CP está fortemente associada com as mudanças na prática clínica e nos programas de monitoramento do PSA. No início da década de 1990 foi observado um aumento acentuado de casos devido à introdução do monitoramento de PSA, aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*, agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA) em 1986, o que aumentou drasticamente a detecção de doença assintomática (Potosky *et al.*, 1995). Esses números diminuíram entre 2007 e 2014 e estabilizaram por volta de 2016 (Sung *et al.*, 2021).

### **2.2.2 Sinais e sintomas**

O CP tem evolução lenta e silenciosa, sendo comum a ausência de sintomas, ou quando presentes, são semelhantes aos da hiperplasia benigna de próstata (Emberton *et al.*, 2008). Em ambas as situações o crescimento da massa neoplásica pressiona a uretra causando sinais como a poliúria e noctúria. Entretanto, como a maioria dos CP tem origem na zona periférica, pode levar meses a anos para alterações significativas no padrão urinário. Contudo, quando o CP está em estágio avançado com metástases em locais distantes, é frequente a perda de peso, hematúria, disfunção sexual, dor pélvica, dor óssea e infecção generalizada, podendo evoluir ao óbito (Rees; Bultitude; Challacombe, 2014; Mottet *et al.*, 2017).

### **2.2.3 Desenvolvimento tumoral e alterações moleculares**

Acredita-se que o CP seja resultado do acúmulo de alterações no genoma de células da próstata ao longo da vida do paciente, em oncogenes ou em supressores tumorais, com alterações na transcrição e/ou tradução que levam a homeostase celular desregulada,

especialmente no que diz respeito ao crescimento e morte celular (Figura 2) (Rebello *et al.*, 2021). O CP é considerado um câncer de classe C, que significa que a maioria das respectivas alterações genômicas são de número de cópias ou rearranjos estruturais, já que as mutações correspondem a apenas 3 - 6% das alterações (classe M) (Ciriello *et al.*, 2013; Hieronymus *et al.*, 2014).

Entre as alterações genômicas, no tumor primário, grande parte (50% em homens brancos, 31% em asiáticos, e 28% em negros) correspondem à fusão de *TMPRSS2* com *ERG* (Tomlins *et al.*, 2005; Tomlins *et al.*, 2008; Magi-Galluzzi *et al.*, 2011; Blackburn *et al.*, 2019). Em *TMPRSS2-ERG* negativos, são observadas a fusão de *TMPRSS2-ETV1* (8%), mutação com perda de função de *SPOP* (11%), e mutação com ganho de função de *FOXAI* (3%) (Barbieri *et al.*, 2012; Baca *et al.*, 2013; Schlomm, 2016).

A mutação de *FOXAI*, que no CP atua como oncogene aumentando a transcrição do *RA*, é mais observada em homens chineses do que na população ocidental (41%), assim como *ZNF292* e *CHD1*, ambos 18% (Li *et al.*, 2020). A alteração do gene *ATM* é observada em 7 - 10% dos tumores localizados (Fraser *et al.*, 2017).



Figura 2 - Alterações genéticas no câncer de próstata.

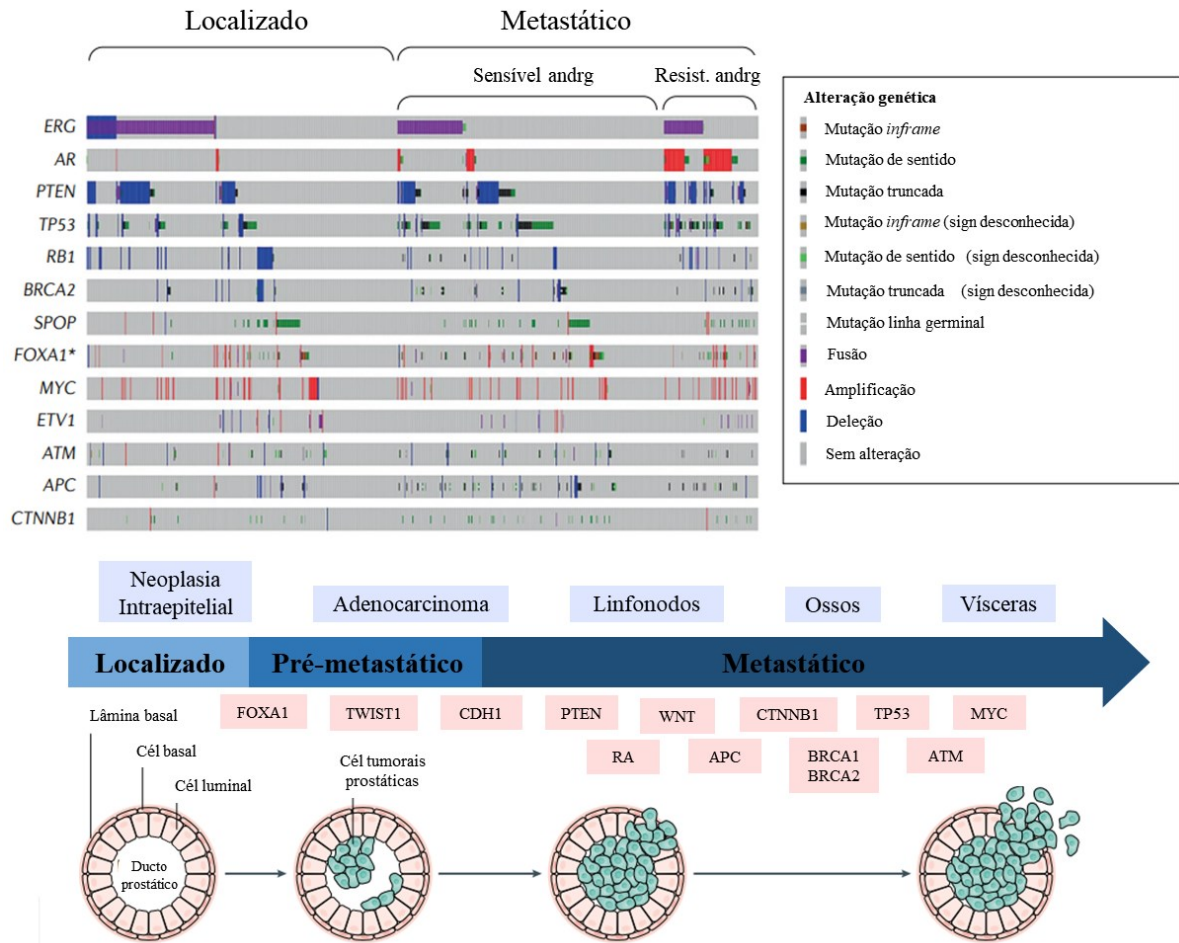


Figura adaptada de Rebello *et al.* (2021).

Quando o tumor está preparando-se para a disseminação, as células precursoras de metástase passam pelo processo conhecido por transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Tam; Weinberg, 2013). Na EMT ocorre a depleção de *MMSET*, que promove a desregulação da transcrição, com favorecimento a EMT através do fator de transcrição *TWIST1* (Ezponda *et al.*, 2013), que por sua vez reprime a expressão de *CDH1*. O *CDH1* consiste em um gene supressor tumoral que codifica a proteína E-caderina, cuja função principal está relacionada à polarização, direcionamento, e adesão celular (Pecina-Slaus, 2003; Wang *et al.*, 2018; Loh *et al.*, 2019), e aumenta a expressão de *CDH2*, favorecendo a migração e invasão celular (Kwok *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2006). Há também um aumento da metilação dos supressores tumorais *CSTP1* e *RASSF1*, que promove um escape celular *in situ* e uma alteração plástica para as células adaptarem-se no novo microambiente após a colonização (Zhang; Shen; Zeng, 2023). Ainda, durante a EMT é evidenciada a perda de

*PTEN* e ativação de *RAS/MAPK*, sendo possível resultar em metástase com 100% de penetração óssea (Mulholland *et al.*, 2012). Nessa fase, também são liberados exossomos para a preparação do futuro nicho metastático (Weidle *et al.*, 2017).

No estágio metastático, geralmente observado em ossos (84%) (Gandaglia *et al.*, 2014), ocorre a amplificação ou mutação com ganho de função do *RA*, ou ganho de função de reguladores da transcrição de *RA*, como *FOXA1*, ou deleção/perda de função de genes que reprimem a sinalização tumoral por *RA*, como os supressores tumorais *ZBTB16* e *NCOR1*. Neste ambiente, as células adquirem um comportamento semelhante às células tronco, através da interação parácrina com fibroblastos associados ao câncer (FAC), através de IL-6. Esses eventos favorecem a EMT em um processo associado à agressividade, colonização e disseminação (Giannoni *et al.*, 2010).

Cerca de 90% dos homens que vão a óbito em decorrência do CP possuem metástase óssea (Bubendorf *et al.*, 2000). A preferência pelo ambiente parece ocorrer devido às integrinas, como a VCAM1, e quimiocinas, como a CXCL12, BMPs, Notch, NES, e OPN, que osteoblastos e células estromais da medula óssea secretam para atrair e regular células-tronco hematopoiéticas (CTH). As células metastáticas da próstata então competem com as CTH pela ocupação da medula óssea, e uma vez estabelecidas, iniciam um processo para expulsá-las para o sangue periférico (Shiozawa *et al.*, 2011). A metástase então pode adquirir características osteolíticas, osteoblásticas ou mista (Keller; Brown, 2004; Weilbaecher; Guise; Mccauley, 2011).

A homeostase óssea, também chamada de remodelação, consiste em um processo complexo que ocorre constantemente durante toda a vida das pessoas. Um sensível equilíbrio é mantido entre zonas de reabsorção pelos osteoclastos, substituídas por novas regiões formadas pela sinalização dos osteoblastos, seguida da mineralização e então deposição dos osteoblastos maduros, agora chamados osteócitos, na matriz óssea (Al-Bari; Al Mamun, 2020). As células tumorais utilizam-se desse processo para colonizarem o tecido, sendo capazes de ativar a maturação de células da medula em osteoblastos através da ativação de BMPs (do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*), que fazem parte da superfamília TGF $\beta$ , e atuam em conjunto com fatores de crescimento como IGF1 e IGF2, FGF, PDGF, WNT12, e indiretamente, através da regulação de MMP e VEGF (Nannuru *et al.*, 2010). Estes então propagam a sinalização, dependente ou não da fosforilação de SMADs, para o fator de transcrição RUNX2 que controla a osteogênese (Logothetis; Lin, 2005). Por outro lado, as células tumorais também são capazes

de estimular a produção de RANKL (do inglês, *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*) pelas células estromais da medula óssea através da expressão de PTH, IL-6, IL-1, TNF e EGF, e inibir a secreção de OPG, antagonista à RANKL. O fator RANKL então liga-se ao respectivo receptor, expresso em precursores de osteoclastos para maturação, ativando a osteoclastogênese, e a reabsorção óssea. A reabsorção óssea acelerada, por sua vez, promove a liberação dos fatores de crescimento TGF $\beta$  e IGF1, sustentando um “ciclo vicioso” (Cook *et al.*, 2014; Nakai *et al.*, 2019). Este ciclo vicioso pode variar de extremamente ativo até um estado de dormência por anos, em que células tumorais ainda possuem capacidade metastática mas sem evidências de proliferação, que é controlado pelo equilíbrio de fatores expressos pelas células tumorais e ósseas (Yumoto *et al.*, 2016; Esposito; Guise; Kang, 2018).

As metástases ósseas geralmente ocorrem no estágio de resistência à andrógenos (Baldessari *et al.*, 2023). A alteração na resistência a andrógenos é observada em mais de 70% dos pacientes com CP metastático (Hodgson *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2015). Normalmente, o RA atua como um fator de transcrição que regula a expressão de genes para a homeostase celular e genes que codificam proteases importantes para a função normal da próstata (como *KLK3*, que codifica o PSA) (Tan *et al.*, 2015). No CP, o RA promove o crescimento celular favorecendo a tumorigenesis, sendo a terapia hormonal utilizada preferencialmente. Todavia, a alteração no RA pela terapia pode causar a resistência à andrógenos por múltiplos mecanismos, em um período de até 30 meses após início do tratamento (Maitland, 2021): i) primeiro, a superexpressão do RA pode ocorrer devido à amplificação do gene ou alteração nos fatores que controlam a expressão de RA (Chan; Dehm, 2014); ii) segundo, podem ocorrer mutações de ganho de função na região de ligação ao ligante, resultando em RA mutantes constitutivamente ativos ou mutações que reduzem a especificidade do RA, permitindo a ativação por outros hormônios esteroides (Robins, 2012); iii) terceiro, modificações pós-traducionais do RA podem sensibilizar o receptor para a ativação, mesmo nos baixos níveis de testosterona que permanecem após terapia (Van Der Steen; Tindall; Huang, 2013); iv) quarto, o *splicing* alternativo em alguns tumores leva ao aumento da produção de isoformas do RA (Dehm *et al.*, 2008); v) quinto e último, a superexpressão do RA *per se* já é suficiente para causar a resistência à terapia (Watson; Arora; Sawyers, 2015).

A transição de um CP sensível a andrógenos para um resistente, também envolve a deleção homozigótica no cromossomo 10q, que codifica *PTEN* (>40%), o ganho de função de *PIK3CA/B* (6%) e *AKT* (2%), ativação da via WNT (18%); perda de função de *APC* (9%) e

ganho de função de *CTNNB1*, gene codificador da  $\beta$ -catenina (4%). A instabilidade no cromossomo 8q, que contém o oncogene *MYC* e 8p, que contém o supressor tumoral *NKX3-1* são frequentes (20 - 30%) (Grasso *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2015).

Gens que controlam o ciclo celular, como *TP53* (8%) e *RBI* (1%) encontram-se pouco alterados na doença localizada, mas alterações na expressão de ambos aumentam com a progressão tumoral, chegando a 27% e 5%, respectivamente no CP metastático sensível a andrógenos e a 50% e 21%, respectivamente no CP metastático resistente a andrógenos (Mateo *et al.*, 2020; Stopsack *et al.*, 2020). Em modelos animais, a perda de *RBI* é suficiente para modificação de um perfil de CP sensível para um perfil de resistência a andrógenos (Sharma *et al.*, 2010), e a perda concomitante de *TP53* altera a plasticidade de linhagens celulares de adenoma para características de tumores neuroendócrinos (Ku *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018).

Alterações nos genes que realizam o reparo ao dano de DNA também são observadas, especialmente *BRCA2*, com mutações em 7% no CP metastático sensível a andrógenos e 12,5% no CP metastático resistente a andrógenos, e do gene *ATM*, com mutações em 5% no CP metastático sensível a andrógenos e 7% no CP metastático resistente a andrógenos, que não são observadas no tumor localizado (Robinson *et al.*, 2015; Mateo *et al.*, 2020).

No câncer de células neuroendócrinas, mais agressivo e resistente a andrógenos, a mutação mais frequente é a amplificação dos genes *AURKA* e *MYC* (40%) (Beltran *et al.*, 2011), e *ONECUT2*, que regula a hipóxia e diferenciação celular de maneira dependente de hormônios, ou seja, essa alteração é raramente observada em CP localizados e dependentes de andrógenos (Rotinen *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019).

#### **2.2.4 Diagnóstico e classificações**

No Brasil, seguindo as diretrizes do Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata (2002), o *screening* do CP é feito pela associação da dosagem sérica de PSA e do exame de toque retal em homens com mais de 50 anos sem histórico familiar ou 45 anos com histórico familiar, seguido da biópsia prostática por via transretal ou transperineal e guiada por ultrassonografia e/ou ressonância magnética.

O uso do PSA como ferramenta diagnóstica é controverso. A dosagem pode apresentar valores elevados em alterações benignas ou em processos infecciosos, uma vez que este é produzido pelas células epiteliais da próstata e não especificamente pelas células tumorais (Montironi *et al.*, 2016). Uma meta análise de 2013 (Ilic *et al.*, 2013) com 341.342 pacientes

identificou que o *screening* por PSA não foi estatisticamente capaz de reduzir a mortalidade por CP, enquanto outro estudo com 182.160 homens de oito países europeus observou uma redução de 20% na mortalidade específica por CP, e que 570 pacientes precisaram ser rastreados pelo teste de PSA para evitar o óbito (Hayes; Barry, 2014). Assim, o *screening* apresenta a vantagem de ser um teste diagnóstico não invasivo, mas vem acompanhado de um risco substancial de sobrediagnóstico e sobretratamento.

Quando há anormalidades na dosagem do PSA ou no toque retal, o diagnóstico conclusivo é feito pelo estudo histopatológico de tecido obtido por biópsia, baseado no sistema TNM (do inglês, *Tumor-Node-Metastasis*) que leva em consideração a localização do tumor, a disseminação em linfonodos, a presença de metástase distante, a dosagem de PSA, e o escore de Gleason ou grau da ISUP (do inglês, *International Society of Urological Pathology*) (Buyyounouski *et al.*, 2017).

O escore de Gleason foi proposto em 1966 pelo anatomo-patologista norte-americano Donald Gleason, e é utilizado até os dias atuais como classificação universal, levando em conta características celulares e histológicas que constituem o tumor (Figura 3) (Delahunt *et al.*, 2012). Células menos diferenciadas, mais próximas às células saudáveis, pequenas e uniformes, formando glândulas regulares, com pouca variação de tamanho e forma, com bordas bem definidas, densamente agrupadas, distribuídas homoganeamente e com pouquíssimo estroma entre si, são classificadas como Grau 1. A sobrevida em 5 anos para tumores neste estágio, localizados no órgão, é de 60 - 99%. Aquelas que apresentam características muito distintas, variando no tamanho e na forma, fusionadas em grandes massas amorfas ou formando glândulas irregulares, são classificadas como Grau 5. A sobrevida em 5 anos para tumores altamente indiferenciados com metástases em locais distantes é próxima a 30% (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024).

Figura 3 - Diagrama esquemático do escore de Gleason

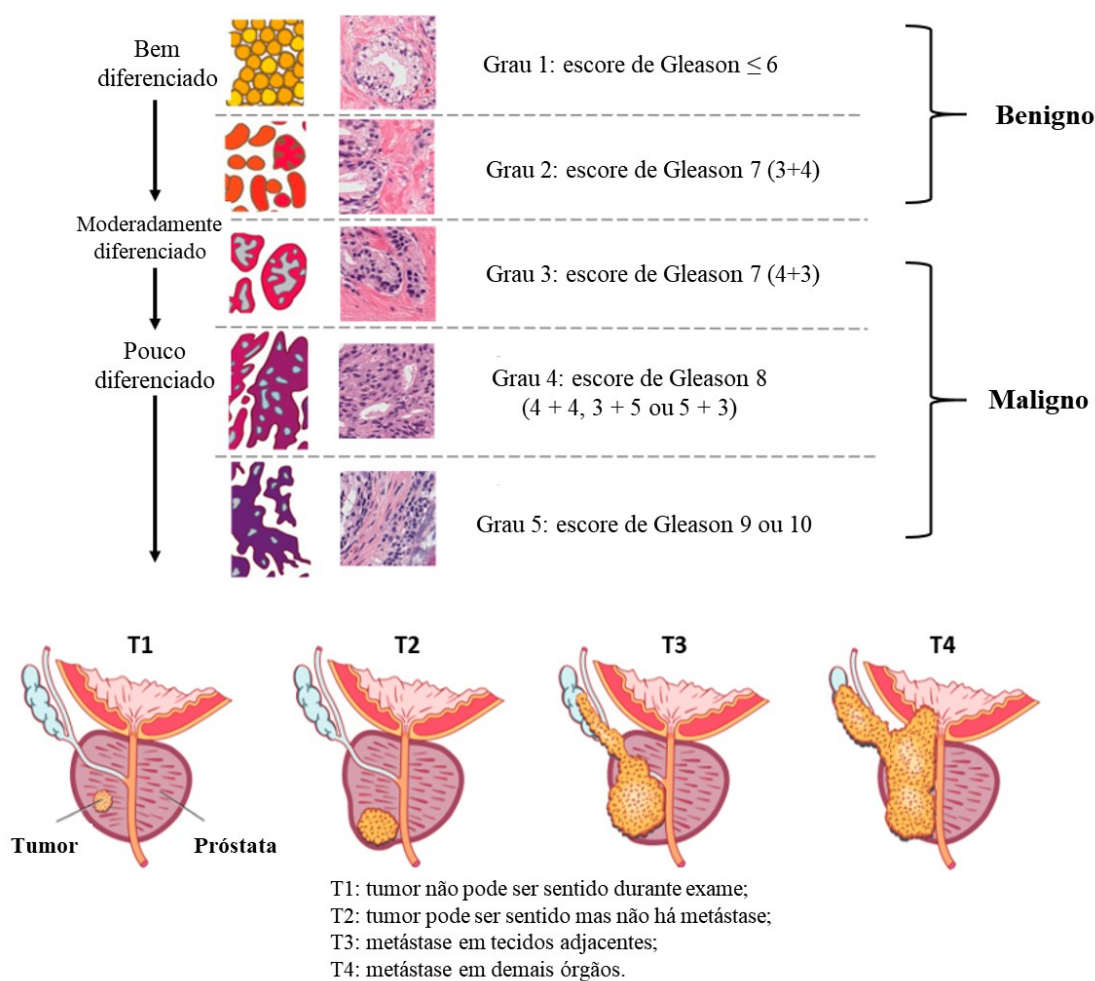


Figura adaptada de Kim *et al.* (2021)

A classificação final é obtida através da soma dos dois graus mais frequentes, sendo que o grau histológico predominante aparece em primeiro lugar, por exemplo: escore de Gleason 7, pode ser resultante da soma de um grau 4 prevalente a um grau 3 (adenocarcinoma da próstata, Gleason 7 (4+3)). Este escore varia de 2 (1+1, mais diferenciado) à 10 (5+5, menos diferenciado, mais agressivo) e correlaciona-se com o grau ISUP (Tabela 1) (Epstein *et al.*, 2016; Montironi *et al.*, 2016).

A nomenclatura tumoral é dada de acordo com as células envolvidas. A grande maioria dos CP consiste em adenocarcinomas na região periférica, que atingem principalmente as células glandulares acinares, mas também as ductais e mucinais.

Tabela 1 - Classificação histológica do câncer de próstata.

<b>Escore de Gleason</b>	<b>Grau ISUP</b>
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4 + 3)	3
8 (4 + 4, 3 + 5 ou 5 + 3)	4
9 – 10	5

Ainda, podem também atingir as células epiteliais como no carcinoma sarcomatoide, de células basais e de transição. Raramente, os tumores consistem de células neuroendócrinas ou miofibroblastos, que são CP relacionados a um pior prognóstico (Kweldam; Van Leenders; Van Der Kwast, 2019). Tumores neuroendócrinos podem apresentar-se como carcinoma de células pequenas, pouco diferenciados ou combinados com o adenocarcinoma acinar convencional, sendo resistente a andrógenos devido à redução ou ausência da atividade de RA (Beltran *et al.*, 2014).

### 2.2.5 Tratamento

O tratamento de pacientes com CP deve levar em consideração a idade, o estadiamento do tumor, o grau histológico, o tamanho da próstata, as comorbidades, a expectativa de vida, os anseios pessoais e os recursos técnicos disponíveis. No Brasil, para a doença localizada, tem-se como opções a observação vigilante em pacientes acima de 75 anos, com expectativa de vida limitada e tumores de baixo grau histológico, a prostatovesiculectomia radical retropúbica e a radioterapia externa ou intersticial (braquiterapia) (Brasil, 2016).

Na doença localmente avançada, a monoterapia geralmente é ineficaz. As melhores opções de tratamento incluem uma combinação de castração hormonal, já que as células prostáticas dependem de andrógenos para proliferação, e cirurgia radical ou radioterapia externa, ou ainda cirurgia radical seguida de radioterapia. A castração hormonal para supressão androgênica pode ser realizada por orquiectomia bilateral, ou com a administração de estrógenos análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), ou antiandrógenos puros ou mistos (flutamida, nilutamida, bicalutamida, ciproterona, e apalutamida) (Brasil, 2016; 2018).

Em casos refratários aos hormônios, e quando a hormonioterapia sozinha não é capaz de conter a doença, é utilizada a quimioterapia como o docetaxel e o cabazitaxel recomendados como primeira e segunda linha, respectivamente. Estes fármacos atuam como inibidores da despolimerização de tubulina, que culmina na diminuição da proliferação das células. A quimioterapia pode ser utilizada também no início do tratamento, em pacientes com CP metastático no momento do diagnóstico. São também utilizados corticosteroides e bisfosfonatos, nos casos de metástases ósseas, uma vez que induzem a apoptose de osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea (Oades; Coxon; Colston, 2002; Brasil, 2019). Em junho de 2022 o denosumabe, anticorpo monoclonal inibidor de RANKL, foi indicado pela Anvisa para casos de osteoporose seguida de metástase óssea, ressaltando a relevância de terapias-alvo no CP (Gomez-Veiga *et al.*, 2013; Brasil, 2022). Como descrito previamente, RANKL consiste em um fator fundamental na diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos.

Para a doença metastática resistente a andrógenos, ou seja, quando há a progressão da doença metastática com aumento do PSA em vigência de nível sérico de testosterona menor que 50 ng/dL ( $< 1,7$  nMol/L), não há cura e existem poucas opções terapêuticas disponíveis, a citar, o acetato de abiraterona (AA), enzalutamida, e olaparibe (Sboc, 2021). O AA foi primeiramente descrito em 1995 e aprovado em 2011 para o tratamento do CP pelo FDA e pela Anvisa. O AA inibe a enzima CYP17A1, que é expressa nos testículos e adrenais, e está aumentada em 17 vezes em células de CP metastático, em comparação com células do tumor localizado (Montgomery *et al.*, 2008). A CYP17A1 tem uma atividade de  $17\alpha$ -hidroxilase, convertendo pregnenolona e progesterona em deidroepiandrosterona e androstenediona, que são precursores da testosterona. Consequentemente, o AA é capaz de diminuir o teor de testosterona comparáveis às condições de castração (Scott, 2017). Ainda, o AA parece inibir o RA em linhagens celulares de CP sensíveis a andrógenos, como a LNCaP, mas não em linhagens resistentes, como a PC-3 (Fragni *et al.*, 2019). Em um estudo de fase III com 1.195 pacientes com CP resistente a andrógenos refratários para docetaxel, foi demonstrado o aumento da sobrevivência de 10,9 para 14,8 meses, diminuição do tempo de progressão e melhora na taxa de resposta de PSA (De Bono *et al.*, 2011).

A enzalutamida é um fármaco da classe dos antiandrogênicos não-esteroidais, descrita pela primeira vez em 2006 e aprovada pelo FDA em 2012 e pela Anvisa em 2014. Ao contrário da bicalutamida, fármaco antiandrogênico de primeira geração, a enzalutamida impede a translocação do RA para o núcleo celular e inibe a ligação do RA ao DNA. Em estudo de fase



III com 1.199 pacientes, o medicamento foi capaz de aumentar a sobrevida de 13,6 para 18,4 meses em pacientes com CP metastático resistente a andrógenos, melhorou a qualidade de vida, e aumentou o tempo até a primeira metástase óssea (Scher *et al.*, 2012).

O medicamento olaparibe é um inibidor de PARP, utilizado no CP metastático resistente a andrógenos. As PARP são enzimas importantes para o reparo da cadeia simples do DNA. Quando olaparibe está ligado à PARP associada ao DNA, esse bloqueia o reparo do DNA, causando a morte das células tumorais. Este é o primeiro medicamento com alvo molecular aprovado para a doença no Brasil, com base no estudo prospectivo e multicêntrico randomizado com 387 pacientes previamente tratados com AA ou enzalutamida e com alterações nos genes *BRCA1/2* e/ou *ATM*, sendo eficaz em reduzir em 36% o risco de morte estimado (De Bono *et al.*, 2020).

Apesar de autorizados pela Anvisa, apenas o AA está disponível no Sistema Único de Saúde para o tratamento do CP metastático resistente a andrógenos, e apresentam efeitos colaterais associados à castração, como anemia, astenia, náusea, diarreia, artralgia, ginecomastia, ondas de calor, disfunção sexual, hipertensão, hipocalcemia, convulsões, além do alto potencial para interações medicamentosas (De Bono *et al.*, 2011; Scher *et al.*, 2012; De Bono *et al.*, 2020), que são somados aos severos efeitos adversos do tratamento com quimioterápicos, devido a inespecificidade das moléculas em destruir não somente as células tumorais como também as saudáveis.

Até janeiro de 2024, existiam 1.674 estudos para a combinação de termos “*treatment*” e “*metastatic prostate cancer*” no [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), site onde são elencados os estudos clínicos em andamento ou já finalizados registrados nos EUA. Entre estes, destaca-se o reposicionamento de fármacos como metformina (Alghandour *et al.*, 2021) e niclosamida (Schweizer *et al.*, 2018), além dos anticorpos monoclonais inibidores de *checkpoint* imunológico como nivolumabe e ipilimumabe (Shenderov *et al.*, 2021), os radio fármacos associados ao ligante de superfície PSMA (Sartor *et al.*, 2021), e a terapia molecular, como os inibidores da reparação do DNA (Smith *et al.*, 2022; Abida *et al.*, 2023), e os RNAs de interferência (Zuckerman *et al.*, 2014; El Dika *et al.*, 2019) como candidatos promissores. Vacinas terapêuticas também tem destaque nas pesquisas, sendo a primeira, sipuleucel-T, aprovada pelo FDA em 2010, que é utilizada em casos de CP metastático resistente a andrógenos (Cheever; Higano, 2011). Entretanto, por ser uma terapia autóloga, ainda é pouco

usada devido aos altos custos de fabricação e logística necessária (Jarosławski; Toumi, 2015; Chang; Gulley; Fong, 2023), e não é aprovada no Brasil (Brasil, 2016).

Assim, apesar de significativos avanços ao longo das últimas décadas na compreensão do desenvolvimento do CP e na aplicação deste conhecimento na terapêutica, ainda é necessária a busca de novas terapias seguras e efetivas que impeçam a progressão tumoral para, conseqüentemente, reduzir os índices de mortalidade relacionados à doença.

### 2.3 RNA DE INTERFERÊNCIA

O termo RNA de interferência (RNAi) foi primeiramente utilizado por Andrew Fire e Craig Mello em 1998 para descrever a capacidade de moléculas de RNA de fita dupla realizarem silenciamento gênico pós-transcricional em *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998), trabalho pelo qual receberam o prêmio Nobel em 2000. Três anos após a publicação, os grupos de Elbashir (2001) e Caplen (2001) demonstraram o silenciamento gênico em células de mamíferos por pequenas moléculas com cerca de 20 - 22 nucleotídeos de RNA de fita dupla, tornando-se amplamente conhecidos na literatura por *small interfering RNAs* (siRNA).

Devido à facilidade teórica em silenciar genes alvo específicos apenas com uma sequência de nucleotídeos, siRNA foram extensamente estudados como agentes terapêuticos, superando toxicidades relacionadas ao sistema imunológico e a baixa eficácia das moléculas candidatas a fármacos observadas nos primeiros ensaios clínicos (Setten; Rossi; Han, 2019). Em 10 de agosto de 2018, o uso do patisiran, uma solução intravenosa para o tratamento de adultos com amiloidose hereditária mediada por transtirretina com polineuropatia em estágio 1 ou 2 foi aprovado pelo FDA (2018). Trata-se do primeiro medicamento utilizando a tecnologia de RNAi a ser aprovado e conta com um pequeno RNA de fita dupla formulado em nanopartículas lipídicas para distribuição aos hepatócitos. O RNA liga-se especificamente a uma sequência geneticamente conservada na região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (RNAm) da transtirretina mutante e tipo selvagem.

Após essa aprovação, o incentivo à pesquisa com RNAi foi impulsionada, buscando-se novas vias alvo e moléculas chave na regulação de doenças, bem como formulações seguras e eficientes para entrega do ácido nucleico. Entre os RNAi de cadeia pequena, destacam-se os siRNA, *small nucleolar RNA* (snoRNA), *PIWI-interacting RNA* (piRNA), e particularmente os miRNA, que serão abordados neste trabalho.

### 2.3.1 miRNA

Os miRNA são pequenas moléculas de RNA não codificantes com cerca de 18 a 26 nucleotídeos, que atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Foram descritos pela primeira vez em 1993 pelo grupo de Ambros (Lee; Feinbaum; Ambros, 1993) em *Caenorhabditis elegans* e identificados em células humanas nos anos 2000 (Pasquinelli *et al.*, 2000). Atualmente, mais de 4.630 miRNA já foram descritos em 37 espécies (Huang *et al.*, 2022), e embora a função de muitos ainda não tenha sido elucidada, sabe-se que regulam cerca de 30% dos RNAm celulares (Lin; Gregory, 2015). A nomenclatura das moléculas dá-se por números em ordem sequencial, com as três primeiras letras relacionadas à espécie do organismo, que podem vir acompanhados dos sufixos -3p ou -5p, quando os dados não são capazes de indicar de qual sequência precursora a molécula madura é proveniente, do braço 5' ou 3' (Ambros *et al.*, 2003).

A biogênese dos miRNA (Figura 4) inicia com a transcrição de genes no núcleo pela RNA polimerase II, formando o miRNA primário (pri-miRNA), que é processado pela endonuclease Droscha (uma RNase III), formando o precursor de miRNA (pré-miRNA) com aproximadamente 70 nucleotídeos em forma de grampo (*hairpin*). O pré-miRNA é exportado pelo complexo exportina-5 e Ran-GTP do núcleo para o citoplasma, onde é encurtado a aproximadamente 22 nucleotídeos pela enzima Dicer (uma RNase III citoplasmática), com a retirada da alça de grampo (região não pareada) e formação de uma dupla fita de miRNA. A dupla fita é desenrolada por uma helicase e uma das fitas, o miRNA maduro, é incorporada ao complexo de indução do silenciamento RISC (do inglês, *RNA-Induced Silencing Complex*), enquanto a outra fita é normalmente degradada (Bartel, 2004). Assim, o miRNA maduro presente no complexo RISC pode atuar na regulação gênica de três formas: (I) inibição da tradução, ao ocorrer o pareamento imperfeito de bases na região 3'UTR do RNAm (Su *et al.*, 2009); (II) clivagem do RNAm, que envolve o pareamento exato na região 3'UTR do RNAm; (III) ativação da tradução, envolvendo a interação com a região 5'UTR do RNAm (Lytle; Yario; Steitz, 2007; Moretti; Thermann; Hentze, 2010; Do Amaral *et al.*, 2018).

Figura 4 - Biogênese dos miRNA.

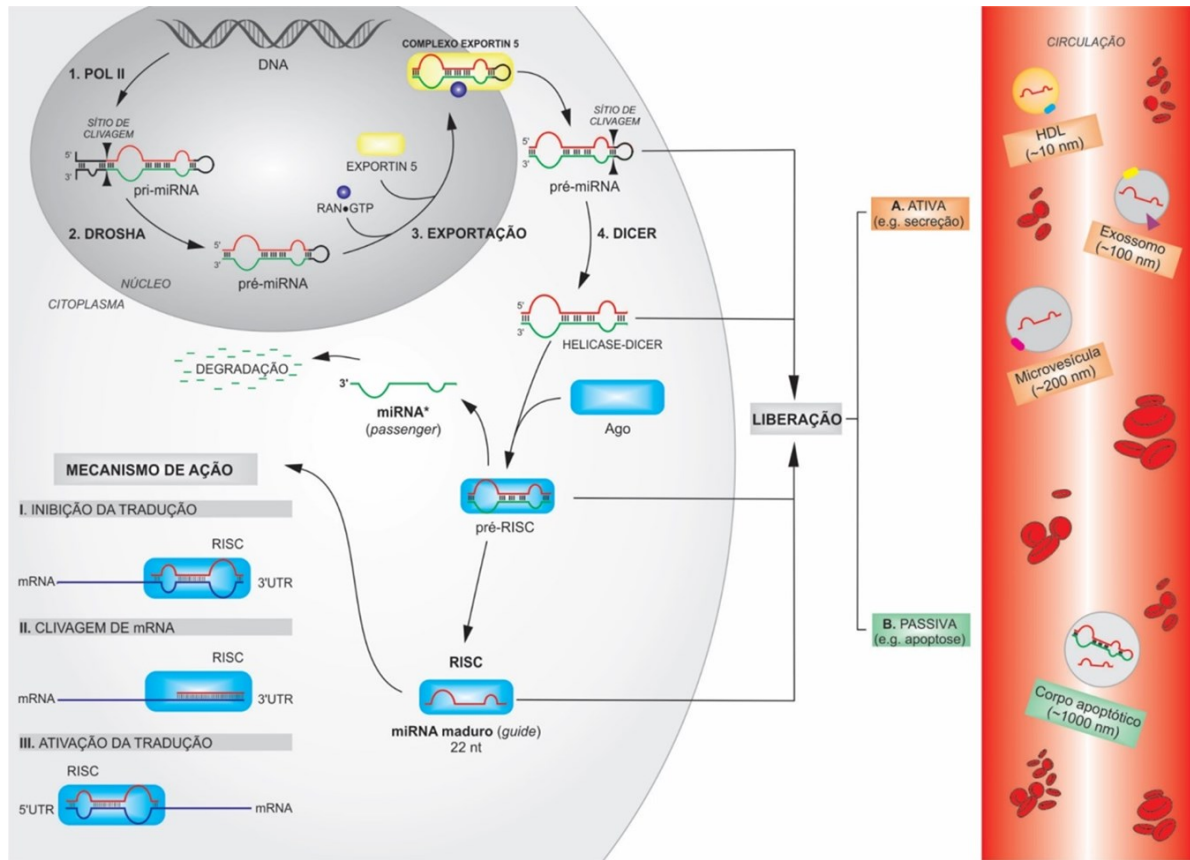


Imagem adaptada de Do Amaral *et al.* (2018).

Apesar de ambos siRNA e miRNA regularem a expressão gênica após a transcrição, atuam de formas diferentes. Os siRNA necessitam do completo pareamento a um único RNAm alvo, o que ativa AGO2 para clivar a porção fosfodiéster da cadeia, entre os nucleotídeos 10 e 11 na extremidade 5' da fita guia. Os fragmentos de RNAm gerados são posteriormente degradados por diferentes exonucleases. Os miRNA, por outro lado, não necessitam do pareamento completo e podem atuar em múltiplos alvos. Tipicamente, o pareamento do miRNA com RNAm dá-se entre os nucleotídeos 2 e 7 da extremidade 5' da fita guia, e como a complementariedade é incompleta, AGO2 não é ativada, e o silenciamento ocorre através da repressão da tradução, ou degradação por desadenilação, decapagem ou ação de exonucleases. Apenas raramente, quando há um pareamento completo com o RNAm, há ativação da AGO2, de maneira similar ao mecanismo dos siRNA (Lam *et al.*, 2015). Uma vez desregulados, os miRNA podem estar envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias doenças, inclusive do câncer, em que podem atuar como oncogenes (suprimindo genes supressores tumorais) ou supressores tumorais (suprimindo oncogenes) (Yanaihara *et al.*, 2006).

O emprego de miRNA como agentes terapêuticos foi primeiramente descrito por Calin *et al.* (2002), ao relacionarem a sub expressão dos miR-15 e miR-16 ao desenvolvimento de leucemia de células B, e desde então estudos neste sentido visam potenciais terapias baseadas na restauração de miRNA sub-expressos, com moléculas de miR-miméticos/*mimics*/agomiR, ou na inibição de miRNA super-expressos, com inibidores/antagomiR.

A primeira formulação terapêutica com miRNA a entrar em testes clínicos foi o Miravirsen, um inibidor do miR-122 do fígado para tratamento da hepatite viral C, que *in vitro* demonstrou uma concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) de 0,67  $\mu$ M contra o vírus, não sendo citotóxico até concentrações superiores a 320  $\mu$ M (Ottosen *et al.*, 2015). Nos ensaios clínicos de fase I, alguns pacientes que receberam monoterapia de Miravirsen apresentaram níveis indetectáveis de RNA do HCV. A formulação na forma de injeção subcutânea entrou em fase II em 2017.

Para o tratamento do câncer, uma formulação lipossomal de miR-34 mimético (MRX34) foi administrada de forma intravenosa, duas vezes na semana por três semanas, em ciclos de quatro semanas para o tratamento de tumores sólidos em um estudo clínico de fase I. O miR-34 é amplamente descrito na literatura como regulador da supressão tumoral por ter como alvo mais de 30 oncogenes. O tratamento MRX34 com pré-medicação com dexametasona foi associado a uma segurança aceitável e mostrou evidência de atividade antitumoral em pacientes com tumores sólidos avançados refratários (Beg *et al.*, 2017). Entretanto, em outro estudo de fase I, uma formulação lipossomal de miR-34 mimético foi administrada de forma intravenosa por cinco dias em ciclos de três semanas e foram observados efeitos adversos graves nos pacientes, relacionados ao sistema imune (4/85) (Hong *et al.*, 2020). Um antagomiR do miR-155 entrou em testes clínicos de fase II em 2018 para o tratamento de linfoma de células T, uma vez que este miRNA está envolvido na diferenciação e proliferação de células sanguíneas e linfoides (Seto *et al.*, 2018). O estudo foi encerrado antecipadamente por motivos comerciais e não devido à segurança ou falta de eficácia da molécula, conforme descrito pelo *National Institute of Health – NIH, EUA* (2020).

Até janeiro de 2024, 167.212 artigos já haviam sido publicados sobre miRNA na plataforma Pubmed, sendo 16.843 relacionados aos termos “*miRNA and cancer therapy*”. Atualmente, 16 formulações com miRNA encontram-se em ensaios clínicos nas fases pré-clínicas, I ou II, ou já foram finalizados, para o tratamento de diversas condições (Tabela 2). Além disso, há 7.055 patentes americanas e 5.280 patentes europeias relacionadas a miRNA

para fins terapêuticos, sendo a maioria direcionadas ao tratamento oncológico (Chakraborty *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Principais terapias baseadas em miRNA que estão em fase de desenvolvimento.

<b>Molécula</b>	<b>Condição</b>	<b>miRNA alvo</b>	<b>Companhia farmacêutica</b>	<b>Fase de desenvolvimento</b>
Miravirsen	Hepatite C viral	miR-122	SantarisPharma	II
RG-101	Hepatite C viral	miR-122	Regulus Therapeutics	IB
MRX34	Tumores sólidos	miR-34	MiRNA Therapeutics	I
RGLS4326	Rins policísticos	miR-17	Regulus Therapeutics	I
RG0-12	Síndrome de Alport	miR-21	Regulus Therapeutics + Genzyme	Pré-clínica
Cobomarsen	Linfoma de cél. T	miR-155	miRagen therapeutics	I
MRG 107	Esclerose lateral amiotrófica	miR-155	miRagen therapeutics	I
Remlarsen	Fibroses variadas	miR-29	miRagen therapeutics	I
MRG-110	Isquemia	miR-92	miRagen therapeutics	I
MGN-1374	Pós-infarto do miocárdio	miR-15 + 195	miRagen therapeutics	Pré-clínica
MGN-2677	Doença vascular	miR-143/145	miRagen therapeutics	Pré-clínica
MGN-4220	Fibrose cardíaca	miR-29	miRagen therapeutics	Pré-clínica
MGN-4893	Produção anormal de hemácias	miR-451	miRagen therapeutics	Pré-clínica
MGN-5804	Doença cardiometabólica	miR-378	miRagen therapeutics	Pré-clínica
MGN-6114	Doença arterial periférica	miR-92	miRagen therapeutics	Pré-clínica
MGN-9103	Falência cardíaca crônica	miR-208	miRagen therapeutics	Pré-clínica

Tabela adaptada de Chakraborty *et al.* (2021).

Contudo, a administração sistêmica de moléculas de miRNA livres enfrenta desafios e barreiras como a degradação por nucleases, a ligação em células sanguíneas e a rápida eliminação renal, a captura pelo sistema retículo endoplasmático, a imunotoxicidade e uma baixa permeabilidade tecidual (Figura 5) (Dasgupta; Chatterjee, 2021), sendo necessária a associação com carreadores eficientes para a entrega da molécula, bem como seguros e biocompatíveis, para serem administrados em organismos vivos.

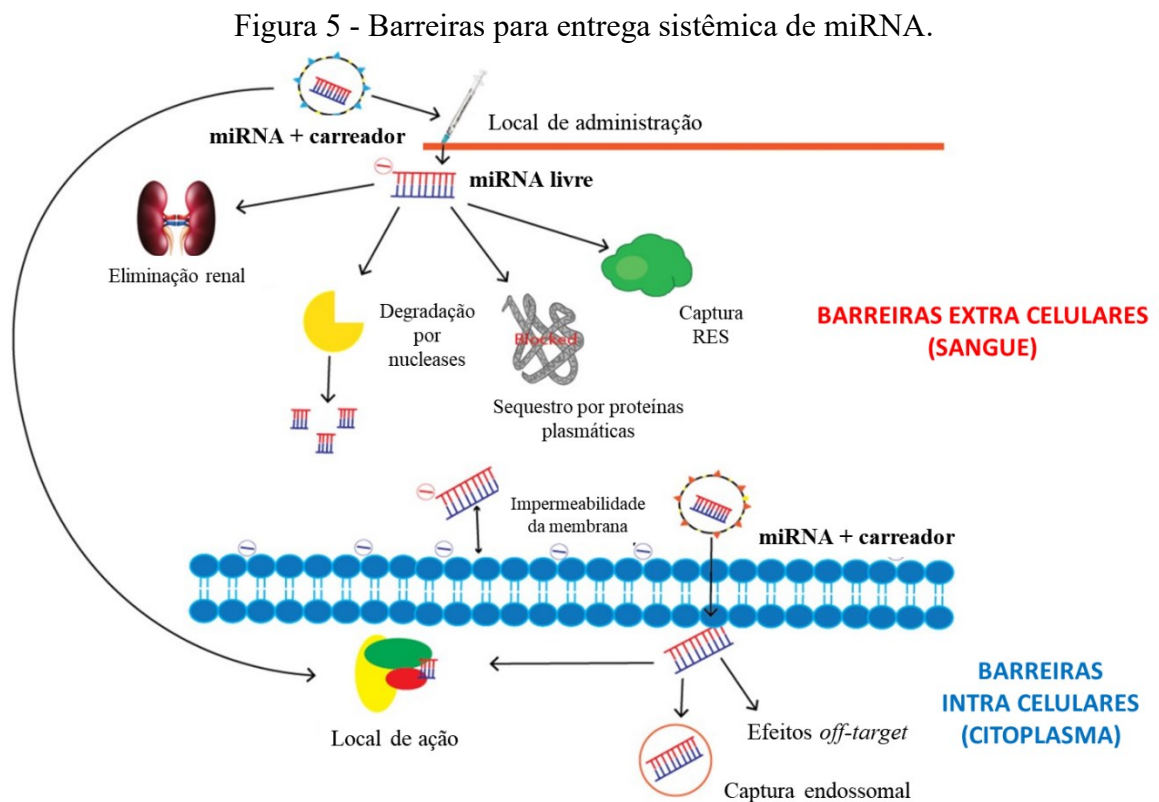


Figura adaptada de Sajid *et al.* (2020).

O uso de sistemas nanoestruturados como carreadores de DNA e RNA aumenta a estabilidade dos ácidos nucleicos. Entre os sistemas, vetores lentivirais mostram-se eficientes na entrega, porém parecem ativar oncossomos e imunogenicidade excessiva (Ganju *et al.*, 2017). Neste sentido, sistemas não virais são amplamente utilizados, incluindo nanovetores com diferentes materiais biocompatíveis, combinando lipossomas, polímeros e materiais inorgânicos que garantem maior eficácia de entrega e menos efeitos adversos (Liao *et al.*, 2016). Assim, o uso de nanopartículas híbridas, compostas de materiais orgânicos e inorgânicos vem tornando-se uma alternativa interessante.

## 2.4 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

Partículas estruturadas podem ser consideradas nanopartículas (NP) quando 50% ou mais das unidades que compõem a formulação tem tamanho menor que 100 nanômetros (nm) (Boverhof *et al.*, 2015). O desenvolvimento de NP híbridas consiste na combinação de diferentes materiais orgânicos e inorgânicos, visando sistemas capazes de atingir os tecidos-alvo com alta eficiência de entrega do conteúdo, e não causar toxicidade aos organismos e ao meio ambiente.

Compostos orgânicos como lipídeos, polissacarídeos e proteínas, de origem natural ou sintética, podem ser combinados com compostos inorgânicos, como polímeros, metais, grafeno, nanotubos de carbono e sílica, resultando em nanossistemas híbridos capazes de combinar as vantagens das biomacromoléculas às de polímeros sintéticos. Na síntese de NP híbridas, destaca-se o uso de polímeros, além da conjugação entre os materiais, o que pode aumentar o tempo de circulação da corrente sanguínea, bem como manter as ações biológicas (Soares *et al.*, 2022).

As NP podem ser administradas por inalação, ingestão oral, penetração dérmica e ocular, e injeção (intravenosa, intramuscular ou subcutânea), que será determinante para o destino das estruturas no corpo (Sousa De Almeida *et al.*, 2021). As NP podem interagir com os fluídos corporais como muco, fluido linfático ou sangue, e com diferentes biomoléculas, incluindo opsoninas que promovem o reconhecimento e a possível eliminação das NP pelo sistema fagocitário mononuclear (Nel *et al.*, 2009).

A principal forma de internalização das NP é a endocitose, que envolve a invaginação da membrana celular seguida da formação de vesículas intracelulares/endocíticas, e pode ser classificada como endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina, endocitose dependente de clatrina e caveolina, fagocitose ou macropinocitose, de acordo com o tamanho e composição da NP e da célula em questão (Donahue; Acar; Wilhelm, 2019). Além disso, com menos frequência, as NP podem ser internalizadas de maneira passiva por interações de van der Waals, interações estéricas e formação de poros na membrana (Oh; Park, 2014).

As NP híbridas têm sido amplamente estudadas para aplicação no tratamento e diagnóstico do câncer. Exossomos combinados com revestimento de silicone e carregados com doxorubicina são preferencialmente internalizados por células tumorais e aumentam a atividade antitumoral do fármaco *in vivo* (Yong *et al.*, 2019). NP híbridas de quitosana-vanilina com revestimento de ferrita de cálcio são capazes de entregar curcumina e evidenciar a atividade



antitumoral do composto em células de câncer de mama (Kamaraj *et al.*, 2018). A atividade antitumoral também é observada em NP híbridas de lipídeos combinados com polímeros para a entrega de metotrexato, inclusive sendo observada uma redução da dose do fármaco necessária para exercer efeitos citotóxicos nas células, devido ao aumento da área de contato proporcionada pelo diminuto tamanho das NP (Tahir *et al.*, 2017). Já as NP híbridas de ácido hialurônico - tungstato de ferro e NP de ouro recobertas com L-metionina têm grande potencial como agentes nanoteranósticos, ideais para imagens multimodais, e até mesmo teranósticas de câncer guiadas por imagem em sistemas biológicos (Laban *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2023).

#### 2.4.1 Nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio

Nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio (NP de CaP) foram primeiramente descritas em 1973 como uma nova técnica de transfecção celular (Graham; Van Der Eb, 1973). O fosfato de cálcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (CaP) é um mineral formado por cátions de cálcio e ânion fosfato, e existe em uma variedade de formas cristalinas, de acordo com a razão molar Ca/P, sendo a hidroxiapatita (razão 1,67) a forma mais estável na faixa de pH fisiológico, e devido a respectiva presença em ossos e dentes, é muito utilizada pela elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (Dorozhkin, 2010; Bellucci *et al.*, 2013; Sokolova; Epple, 2021).

Uma das formas mais utilizadas de sintetizar hidroxiapatita em escala nanométrica é pelo método de precipitação/*self assembly*, no qual uma solução com cálcio e outra com fosfato são misturadas, havendo uma nucleação homogênea, seguida da agregação de partículas esféricas primárias de CaP, com cerca de 4 nm. Em seguida, ocorre uma precipitação secundária com o crescimento dessas estruturas, que podem continuar a crescer e agregar sem o uso de aditivos, como polímeros (Blumenthal; Betts; Posner, 1981).

O revestimento com uma camada de polímero orgânico, como o polietilenoglicol (PEG), aumenta a estabilidade coloidal, reduz a imunogenicidade, e controla o tamanho da estrutura, devido à formação de uma camada densa e hidratada de cadeias longas e flexíveis na superfície das NP (Joralemon; Mcrae; Emrick, 2010). Junto ao PEG, também são utilizados outros revestimentos poliméricos adicionais como PEG-ácido glutâmico (PEG-GLU), que em trabalhos já realizados por nosso grupo de pesquisa utilizando NP de CaP/siRNA/PEG-b-poli(GLU)-poliânion mostraram-se eficazes como agentes carreadores de siRNA para silenciamento de genes antiapoptóticos em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama, sendo

considerado um sistema com potencial terapêutico promissor (De Mello *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021).

O controle de tamanho das NP pelo uso de aditivos é importante, pois nanocarreadores inferiores a 100 nm oferecem a vantagem de acumular-se no tumor pelo efeito EPR (do inglês, *Enhanced Permeability and Retention*) (Pittella *et al.*, 2011; Zhang; Li; Huang, 2014). O efeito EPR foi primeiramente proposto em 1986 por Matsumura e Maeda (1986), ao observarem que em camundongos, partículas nanométricas acumulavam-se com maior intensidade em tecidos tumorais do que em tecidos saudáveis, uma vez que as células tumorais têm crescimento rápido e desordenado e secretam fatores de crescimento para angiogênese, com formação de novos capilares. A rápida hipervascularização do tumor determina uma arquitetura vascular incompleta e desorganizada. Somados a fatores como a baixa pressão intersticial e drenagem linfática insuficiente, esta dinâmica resulta em maior permeabilidade e retenção de compostos nanoestruturados em tumores sólidos (Kalyane *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a presença de CaP promove a formação de interações eletrostáticas entre os íons cálcio e os grupos fosfato da estrutura do RNA (Bose; Tarafder, 2012), além de ser um material inorgânico sensível ao pH. Após serem endocitadas, as NP de CaP acumulam-se nos endossomos, onde devido ao pH ácido, o CaP é dissolvido e dissociado (Sokolova; Epple, 2008), e a alta concentração de cálcio nos endossomos aumenta o influxo de prótons, com a entrada passiva de íons cloreto e água, causando intumescimento por osmose, ruptura da membrana endossomal e escape do conteúdo. Esse efluxo de cálcio também promove a desestabilização e descomplexação das estruturas cálcio-RNA, deixando o RNA agir livremente no citoplasma após a ruptura endossomal. O excesso de íons de cálcio dentro da célula é então removido por bombas de cálcio na membrana celular (Ruvinov *et al.*, 2015). Ainda, as NP de CaP são menos citotóxicas que agentes de transfecção como Lipofectamina<sup>®</sup>, sugerindo assim uma melhor aplicabilidade *in vivo* (Chernousova; Epple, 2017).

Devido à capacidade de ligação e carga de oligonucleotídeos e elevada biocompatibilidade, as NP de CaP têm sido estudadas como forma de entrega de fármacos para tratamentos de diversas doenças, inclusive do câncer (Pittella *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2015; De Mello *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2021; Sethuraman *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2021). As células tumorais internalizam, preferencialmente, NP de CaP PEGuiladas, em relação às células saudáveis. Em um estudo *in vivo* com administração sistêmica de NP de CaP/PEG com siRNA e o quimioterápico doxorrubicina, as NP acumularam-se majoritariamente no tumor com

diminuição no volume tumoral e minimamente em outros órgãos. Nesse estudo também foi identificada a internalização das NP de CaP/PEG por endocitose mediada por caveolina, portanto o pré-tratamento com doxorubicina é capaz de aumentar o nível celular de caovelina, aumentando a internalização de NP de CaP/PEG com siRNA (Tobin *et al.*, 2013).

No câncer de próstata, NP de CaP foram capazes de entregar sh-Stat3 (do inglês, *Short Hairpin RNA - Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) em células RM1, causando diminuição na viabilidade através da parada do ciclo celular e apoptose, além de diminuir a expressão de ciclina D1, BCL-2 e VEGF, e aumentar a expressão dos reguladores de apoptose Bax e caspase-3 clivada (Liang *et al.*, 2017). As NP de CaP/PEG/ácido fosfatídico carregadas com GRP78 siRNA e docetaxel são internalizadas e diminuem a viabilidade de células de câncer de próstata PC-3, linhagem de tumor neuroendócrino estabelecida em sítio ósseo (Kaighn *et al.*, 1979; Tai *et al.*, 2011), além de apresentarem compatibilidade sanguínea para administração *in vivo* (Zhang *et al.*, 2019).

As NP de CaP são amplamente descritas para vetorização em alvos ósseos devido à afinidade com o tecido, podendo ser utilizadas para promoção da remineralização dental em formulações de cremes dentais (Iafisco *et al.*, 2018; Ionescu *et al.*, 2022), e até para o tratamento da osteoporose (Imangali *et al.*, 2023). No CP com metástase óssea, a co-entrega do bifosfanado ácido zoledrônico com docetaxel através de NP de CaP foi capaz de diminuir *in vitro* a proliferação celular em modelo tridimensional, além de *in vivo*, apresentar potencial antimetastático superior aos medicamentos combinados livres (Yang *et al.*, 2021).

Em relação à miRNA, Jung *et al.* (2015) já demonstraram a eficiência de entrega do miR-34a em células PC-3 por NP de CaP/polietilenoimina, exibindo efeitos antitumorais. NP de CaP também foram eficientes para a co-entrega de miR-21 com doxorubicina, com diminuição da expressão de genes alvos e aumento da citotoxicidade em células tumorais (Sriram; Lee, 2021) e para a entrega do miR-140 em cartilagens de modelos animais de osteoartrite (Zhao *et al.*, 2023), mostrando-se um modelo de entrega adequado para estudo de miRNA.

## 2.5 MODELOS TRIDIMENSIONAIS PARA PESQUISA DO CÂNCER DE PRÓSTATA

O desenvolvimento de um novo agente terapêutico consiste em um processo longo e custoso, podendo levar até 15 anos para o medicamento na forma final chegar ao mercado, além de envolver mais de 2 bilhões de dólares no total (Wouters; Mckee; Luyten, 2020). As etapas de desenvolvimento consistem em quatro principais: i) pesquisa e desenvolvimento da molécula; ii) ensaios pré-clínicos; iii) ensaios clínicos; iv) aprovação regulatória (Eua, 2018).

Apesar do investimento para a descoberta de novas moléculas com capacidade antitumoral e sistemas de entrega adequados, um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos fármacos é a falta de modelos pré-clínicos representativos da complexa estrutura tumoral, que apresentem eficácia e segurança. Estima-se que apenas 5% das substâncias aprovadas em ensaios pré-clínicos tenham sucesso nos ensaios clínicos e que isso deve-se à modelos de pesquisa *in vitro* não representativos (Ibarrola-Villava; Cervantes; Bardelli, 2018).

Ensaios pré-clínicos podem ser compostos de experimentos em modelos de pesquisa *in vivo*, *ex vivo*, e *in vitro*, que são aqueles realizados fora de um organismo vivo e que normalmente envolvem linhagens celulares, tecidos ou órgãos isolados (Gamboa; Leong, 2013). O uso de linhagens celulares na pesquisa iniciou-se em 1906 com isolamento de fibras nervosas (Harrison, 1906) e é amplamente utilizado até hoje para condução de experimentos de forma simples e com custo reduzido quando comparado a experimentação animal, podendo ser através de linhagens primárias, isoladas diretamente de organismos vivos doadores, ou através de linhagens imortalizadas comercializadas, que apresentam a vantagem de serem isoladas e poderem ser utilizadas por longos períodos, geralmente cultivadas em garrafas plásticas de forma aderente em monocamadas bidimensionais (2D) ou em suspensão (Honegger, 2001).

O emprego de linhagens celulares na pesquisa pré-clínica permitiu o avanço no entendimento da biologia celular, morfologia tecidual, produção de proteínas, bem como estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos, favorecendo o uso racional e ético de animais (Kapałczyńska *et al.*, 2018), além de evitar diferenças de espécies e relacionadas ao sistema imune, uma vez que grande parte desses animais tem o sistema comprometido (Diehl *et al.*, 2017). Entretanto, muitos estudos utilizando a metodologia 2D falham ao demonstrar eficácia e segurança nas etapas seguintes pois não mimetizam as condições fisiológicas e interações com o microambiente da doença observadas nos pacientes (Kievit *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Habanjar *et al.*, 2021). Portanto, avanços no desenvolvimento e padronização de sistemas de avaliação pré-clínica eficazes têm sido realizados, especialmente os que englobam culturas celulares tridimensionais (3D).

A pesquisa oncológica em modelos 3D teve início em 1971, com o desenvolvimento de esferoides de carcinoma basocelular nodular (Sutherland; McCreddie; Inch, 1971). A partir de então, verificou-se que as células cultivadas dessa forma possuem estrutura física, bioquímica, e resposta a fármacos mais semelhantes aos tumores de origem do que células cultivadas em 2D, em parte como resultado da diferença de hipóxia e fatores envolvidos na internalização de

compostos pelas células (Hoffmann *et al.*, 2015; Melissaridou *et al.*, 2019; Roper *et al.*, 2021). Ainda, a cultura em monocamada falha na representação da complexidade de estudos *in vivo* por apresentar pouca interação célula-matriz extracelular (ECM, do inglês, *extracellular matrix*) e ausência polaridade picobasal (Nicolas *et al.*, 2020; Mizuguchi *et al.*, 2021; Saraswathibhatla; Indana; Chaudhuri, 2023).

A alteração na expressão de genes também é observada entre os modelos de cultura celular. Em 2D, as células tendem a manter um formato alongado para realizar a comunicação intercelular, e possuem mais filamentos de actina F e integrinas de adesão, promovendo um citoesqueleto mais enrijecido. Em 3D, as células tendem a ser mais compactas e terem o citoesqueleto mais relaxado devido a maior interação de E-caderina entre as células (Zhou *et al.*, 2017). A alteração na arquitetura celular é capaz de induzir modificações na expressão gênica de forma que culturas 3D possuem perfis de expressão mais correspondentes a modelos *in vivo* e pacientes, do que as culturas 2D (Ghosh *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2008; Zschenker *et al.*, 2012; Imamura *et al.*, 2015).

Os modelos 3D podem ser estabelecidos de uma única linhagem celular, comumente chamados de microtumores ou esferoides, ou em co-cultura com diversos tipos celulares, nos chamados organoides, podendo ser células advindas de bancos comerciais, animais, derivadas diretamente de pacientes ou de xenoenxertos (Atat *et al.*, 2022).

Os microtumores consistem em um modelo mais elementar de organização 3D, estabelecidos na forma de agregados esféricos a partir da ligação às integrinas de membrana com fibras de ECM, contato que aumenta a expressão de E-caderina, que se acumula na superfície da membrana. O contato E-caderina/E-caderina permite que o agregado fique firme e desenvolva-se (Lee *et al.*, 2015). As diferenças inerentes à adesão célula-célula de diferentes linhagens resulta em diferentes níveis de formação e agregação de microtumores (Han; Kwon; Kim, 2021). Células que possuem elevada expressão de E-caderina formarão estruturas mais homogêneas, compactas e menos migratórias do que células com baixa expressão da proteína, diferença observada inclusive em linhagens celulares do mesmo tipo de câncer, mas advindas de diferentes estágios da doença (Ivanov; Grabowska, 2017).

Microtumores contém três regiões distintas com diferentes estímulos advindos do ambiente local (Figura 6) e que proporcionam a manutenção da morfologia e polaridade dos tumores observados *in vivo*. As regiões consistem em: i) zona exterior ou periférica, em contato com nutrientes, sendo a porção mais proliferativa e ativa; ii) zona quiescente, apresenta

metabolismo basal mínimo que pode aumentar com a exposição à nutrientes; iii) zona necrótica, que contem células com núcleos danificados e perda de função, devido a privação de oxigênio e nutrientes, podendo levar as células à apoptose e formação de lúmens. Devido às diferenças de topologias, a difusão de moléculas entre as camadas pode variar, resultando em alterações na eficácia de um composto em análise (Foglietta *et al.*, 2020).

Figura 6 - Estrutura de microtumores.

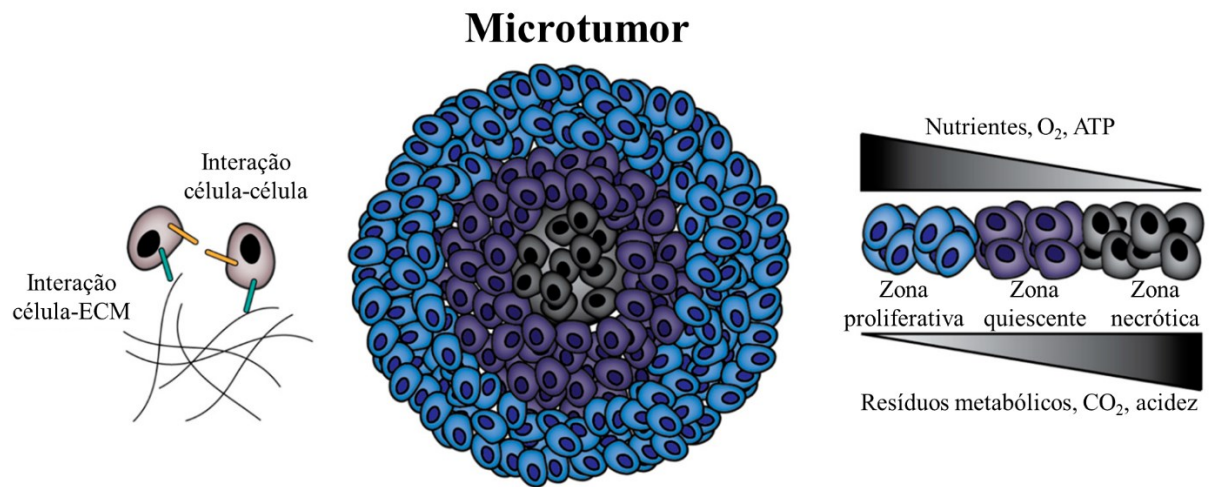


Figura adaptada de Han; Kwon e Kim (2021).

Importantes diferenças anatômicas e histológicas são encontradas entre a próstata humana e a próstata de modelos animais (Jesik; Holland; Lee, 1982; Nascimento-Gonçalves *et al.*, 2018; Nascimento-Goncalves *et al.*, 2023), portanto, a necessidade de modelos miméticos é evidente, resultando em uma variedade de modelos 3D de CP que vem sendo desenvolvidos, variando de microtumores em monocultura (Li, Z. *et al.*, 2023; Oner; Gray; Finn, 2023; Serpeloni *et al.*, 2023) à complexos organoides multicelulares, encapsulados ou não por hidrogéis (Brasil Da Costa *et al.*, 2020; Sablatura *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2023), que devem ser projetados de acordo com a finalidade e alvo das pesquisas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo utilizar nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio para a entrega de miRNA em modelos bidimensional e tridimensional de câncer de próstata metastático ósseo, como prospecção de agente de terapia molecular.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### 3.2.1 No Brasil

- Identificar o miRNA alvo a ser utilizado como possível agente terapêutico em células de câncer de próstata metastático ósseo;
- Sintetizar e caracterizar nanopartículas híbridas CaP/miR/PEG-GLU quanto ao tamanho, morfologia, carga superficial, eficiência de encapsulação, e estabilidade em diferentes soluções de uso;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas híbridas CaP/miR/PEG-GLU e a capacidade de entrega do miRNA selecionado, bem como a regulação da expressão de genes alvo em células de câncer de próstata metastático ósseo.

##### 3.2.2 Nos EUA

- Analisar a internalização das nanopartículas híbridas CaP/PEG-GLU por células de câncer de próstata metastático ósseo cultivadas em modelo bidimensional;
- Estabelecer modelo tridimensional de câncer de próstata metastático ósseo, com formação de microtumores;
- Analisar a internalização das nanopartículas híbridas CaP/PEG-GLU pelos microtumores;
- Selecionar miRNA alvo relevante no modelo de microtumores para preparação das nanopartículas híbridas CaP/miR/PEG-GLU;
- Avaliar o efeito das nanopartículas híbridas CaP/miR/PEG-GLU quanto a viabilidade celular e tamanho dos microtumores;
- Nos microtumores, analisar a regulação da expressão de proteínas alvo do miRNA selecionado após exposição às nanopartículas híbridas CaP/miR/PEG-GLU.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 METODOLOGIA REALIZADA NO BRASIL

#### 4.1.1 Identificação do miRNA alvo

Após ensaio de microarranjo para análise da expressão de 2.549 miRNA, seguida da confirmação dos resultados pela reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR), realizado previamente por nosso grupo de pesquisa (Rode *et al.*, 2021), foram identificados os miRNA diferencialmente expressos entre as linhagem tumorais de câncer de próstata metastático LNCaP e PC-3 em relação à linhagem do epitélio saudável da próstata, RWPE-1. No presente estudo, foram avaliados exclusivamente os miRNA diferencialmente expressos entre PC-3 e RWPE-1. Para tanto, os dados foram extraídos utilizando o *software* Feature Extration 12.2 (Agilent Technologies) e os arquivos gerados foram analisados no *software* Genspring GX (G5886AA - Agilent Technologies). Para a análise, foram considerados apenas os miRNA detectados nas duas linhagens celulares.

Dos miRNA diferencialmente expressos entre as linhagens, foi realizada análise de bioinformática utilizando os bancos de dados miRDB (Liu; Wang, 2019; Chen; Wang, 2020) e TargetScan versão 7.2 (Agarwal *et al.*, 2015), bem como o banco de dados com alvos já validados experimentalmente MiRTarBase versão 7.0 (Huang *et al.*, 2022). Em seguida, os genes identificados foram analisados em relação a processos biológicos na plataforma Gene Ontology PANTHER versão 11.0 (Ashburner *et al.*, 2000; Aleksander *et al.*, 2023) de forma a selecionar um miRNA cuja atuação estivesse relacionada a progressão do CP e metástase óssea. Os genes alvos para avaliação da expressão foram selecionados através da análise da rede de interações na plataforma GeneMANIA (Warde-Farley *et al.*, 2010).

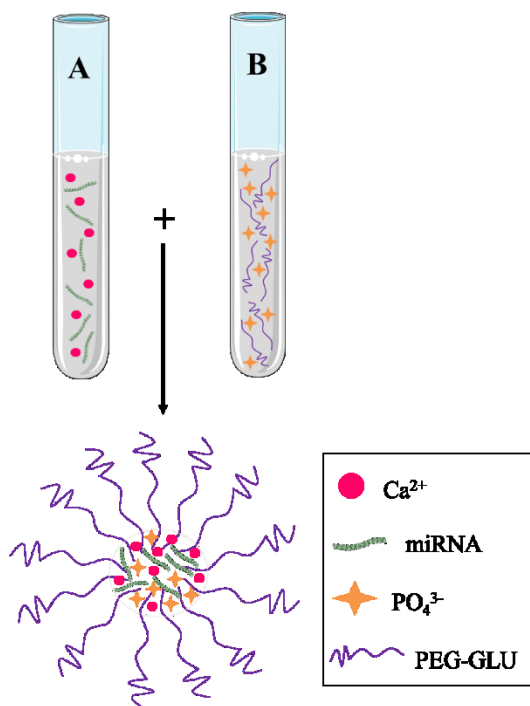
#### 4.1.2 Preparação das nanopartículas

As NP de CaP foram preparadas em cabine de fluxo laminar por automontagem dos constituintes, conforme descrito por Pittella *et al.* (2011). Inicialmente, uma solução de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) foi adicionada a uma solução do miR-205-5p mimético (Merck KGaA) 15 mM em tampão TRIS (pH 10) (solução A). Outra solução contendo PEG-b-poli(GLU) (1 mg/mL) foi misturada com uma solução tampão de HEPES 50 mM (pH 7,4) contendo Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 mM) e NaCl (140 mM) (solução B). A solução A foi então misturada com a solução B para a obtenção de uma concentração final de 2,25 µM de miRNA. Devido às interações eletrostáticas, os



componentes são automontados para a complexação do miRNA, dando origem às NP de CaP carregadas com o miRNA de interesse (NP miR-205) (Figura 7).

Figura 7 - Metodologia de preparação das NP de CaP.



Desenho ilustrativo da preparação das nanopartículas, formadas por automontagem dos componentes.

Nanopartículas *scramble* (NP Scramble), carregadas com sequência de miRNA sem homologia com sequências de genes humanos *mirVana™ miRNA Mimic Negative Control #1* (Thermo Fisher Scientific Inc.) e nanopartículas *mock* (NP Mock), sem a presença de sequências de miRNA, foram utilizadas como controles nos experimentos.

#### 4.1.3 Caracterização das nanopartículas

Após a preparação das NP de CaP, foi realizada a determinação do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI, do inglês, *Polydispersity Index*), a partir de medidas de DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering*) no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical), a 25 °C, ângulo de detecção de 173° com laser He-Ne (633 nm). Os resultados foram analisados a partir da velocidade de decaimento da função de correlação de fótons no *software* Zetasizer versão 7.12.

A carga superficial das NP de CaP foi verificada pelo potencial zeta, através da medida de mobilidade eletroforética das nanopartículas em direção ao eletrodo de carga oposta

utilizando a equação de Smoluchowski, no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical), com potencial estabelecido de  $\pm 150$  mV.

Para avaliar a estabilidade das NP de CaP, as formulações puras ou diluídas em meio de cultura 1:1 (v/v) foram armazenadas em diferentes condições de temperatura (25 °C, 4 °C e -20 °C) protegidas da luz. As formulações foram avaliadas macroscopicamente e quanto ao diâmetro hidrodinâmico e PDI nos dias 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 após a preparação.

#### **4.1.4 Avaliação morfológica das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para análise morfológica, imagens das NP de CaP foram obtidas por MET, utilizando o equipamento JEM-1011 (JEOL Ltd.) operando com voltagem de aceleração de 80 kV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME, UFSC). As amostras foram diluídas 1:10 (v/v) em tampão TRIS 10 mM (pH 10), mantidas em banho de ultrassom por 5 minutos para a dispersão de agregados e cerca de 2  $\mu$ L foram depositados em grades de níquel com malha de 200 *mesh* revestidas com carbono amorfo, seguida da completa secagem das grades por 4 h para análise.

#### **4.1.5 Eficiência de encapsulação de miRNA**

Para determinação indireta da quantidade de miRNA encapsulado pelas NP de CaP, o kit *Quant-iT™ miRNA assay* (Thermo Fisher Scientific Inc.) foi utilizado. De acordo com o protocolo, a intensidade de fluorescência aumenta linearmente à medida que o reagente fluorescente presente intercala com as bases de miRNA. Assim, a formulação foi centrifugada a  $25.000 \times g$  por 4 h a 4 °C, para precipitação das NP de CaP complexadas com o miRNA na centrífuga Sorvall St 16r (Thermo Fisher Scientific Inc.) O sobrenadante foi coletado e adicionado ao reagente, e a fluorescência foi medida na multileitora Infinite M200 (TECAN Group Ltd.) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC (LAMEB/UFSC), comparando os valores com uma curva padrão de miRNA. O experimento foi realizado em triplicata, n=2. O valor da eficiência de encapsulação (E.E) foi obtido através da fórmula:

$$E.E\% = 100 - \frac{\text{Concentração obtida no sobrenadante}}{\text{Concentração teórica inicial}} \times 100$$

#### 4.1.6 Cultura celular

A linhagem humana de câncer de próstata PC-3, estabelecida a partir de sítio metastático no tecido ósseo, foi cordialmente cedida pela professora Dra. Flávia K. Delella do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute Medium* ou DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Merck KGaA), acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de HEPES, e mantidas em estufa umidificada, a 37 °C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

#### 4.1.7 Citotoxicidade

As células PC-3 foram semeadas ( $2 \times 10^5$ ) em meio RPMI 1640 ou DMEM com 10% SFB em placas de 96 poços. Após 24 h, as células foram expostas às NP Mock, NP Scramble, e NP miR-205 em concentrações seriadas [5 – 500 nMol/L] por 24 h, 48 h, e 72 h. Em seguida, o meio das células foi substituído pelo kit *CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega Corporation) diluído 1:5 (v/v) em meio durante 2 h, seguida da leitura de absorbância na leitora de microplacas ELx800 (BioTek Instruments) a 490 nm. O sal de tetrazólio MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] presente no kit é reduzido à formazam, majoritariamente pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis. Como controle, meio sem NP de CaP também foi utilizado. As análises estatísticas foram calculadas com o teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os experimentos foram realizados em triplicata, n=3.

#### 4.1.8 RT-qPCR

A restauração da expressão do miR-205-5p foi avaliada após as células PC-3 terem sido expostas às NP Mock, NP Scramble, e NP miR-205 [100 nMol/L] por 24 h e 48 h. O RNA total foi extraído com kit *MirVana PARIS* (Thermo Fisher Scientific Inc.), e a quantificação e análise

de pureza foram realizadas no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Systems). O DNA complementar (cDNA) foi preparado com o kit *MiRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* (Agilent Technologies), seguida da reação de qPCR com o kit *MiRNA qPCR Master Mix* (Agilent Technologies) no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). A expressão do miR-205-5p (Sigma-Aldrich Corporation) foi normalizada com a expressão do *RNU6-1 MystiCq® microRNA qPCR Control Primer* (Sigma-Aldrich Corporation). Os níveis de expressão foram determinados com o método de quantificação relativa ( $2^{-\Delta C_t}$ ) (Livak; Schmittgen, 2001).

Para a avaliação da expressão dos genes alvos, adicionou-se o tempo de tratamento de 48 h em doses repetidas (48 h<sub>DR</sub>), e manteve-se as mesmas condições de extração de RNA e preparação de cDNA, utilizando o kit de detecção *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems), normalizando a expressão dos genes alvos humanos *RA*, *BAMBI*, *SMAD1/5/9* (Synbio Technologies), *VEGFA* (Sigma-Aldrich Corporation), e *ZEB1* (Merck KGaA) com a expressão de  $\beta$ -actina (*ACTB*) (Merck KGaA). Os níveis de expressão foram determinados com o método de quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Livak; Schmittgen, 2001). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os experimentos foram realizados em triplicata, n=3. As sequências dos iniciadores estão listadas abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na técnica de RT-qPCR.

<b>Alvo</b>	<b>Sequência dos iniciadores (5'-3')</b>
<i>hsa-miR-205-5p</i>	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG
<i>RNU6-1</i>	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUACUAAAAUUGGAAC GAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGA UGACACGCAAUUCGUGAAGCGUCCAUUUUU
<i>RA</i>	<i>F</i> GTGTAAGGCAGTGTCGGTGT <i>R</i> TCGGCTGTGAAGAGAGTGTG
<i>BAMBI</i>	<i>F</i> TGCTCTCCCGTTTGCCTAC <i>R</i> TCAGACAGCAGTTCTCGTGC
<i>SMAD1/5/9</i>	<i>F</i> CATTACTGCCGTGTGTGGC <i>R</i> GAGAGTGAGGAAACGGGTGG
<i>VEGFA</i>	<i>F</i> AGTGGTCCCAGGCTGCAC

R TCCATGAACTTCACCACTTCGT  
*ZEB1* F GTGATCCAGCCAAATGGAAATC  
 R TTTGGGCGGTGTAGAATCAG

---

## 4.2. METODOLOGIA REALIZADA NOS EUA

### 4.2.1 Cultura celular 2D

Nesta parte do estudo foram utilizadas as linhagens de câncer de próstata C4-2B e LNCaP, gentilmente cedidas pelo Dr. Leland W. K. Chung (*in memoriam*, Cedars-Sinai Medical Center, EUA). As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio DMEM (Corning Incorporated), acrescido de SFB 10% (v/v), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, e 10 mM de HEPES. As culturas foram mantidas em estufa umidificada, a 37 °C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

### 4.2.2 Incorporação estática das nanopartículas em modelo 2D

A capacidade das células tumorais C4-2B incorporarem as NP de CaP foi avaliada através da utilização de uma molécula controle de siRNA (*Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA*, Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc.) marcada com o *Silencer™ siRNA Labeling Kit with Cy3 dye* (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc.), cordialmente cedida pela professora Dra. Danielle Wu (University of Texas Health Science Center, EUA) devido à disponibilidade da molécula, considerando que siRNA e miRNA possuem características de internalização similares (Lam *et al.*, 2015; Traber; Yu, 2023). A molécula de siRNA marcada foi utilizada na concentração final de 2,25 µM para a preparação das NP de CaP conforme descrito no item 4.1.2, e chamada ao longo do texto como: NP ácido nucleico\_Cy3.

As seguintes soluções foram preparadas em meio sem vermelho de fenol FluoroBrite™ DMEM (Gibco™ Thermo Fisher Scientific Inc.): ácido nucleico\_Cy3 livre [1000 nMol/L], NP ácido nucleico\_Cy3 [1000 nMol/L], NP ácido nucleico\_Cy3 [100 nMol/L], e NP Mock [1000 nMol/L]. Como controle, também foram utilizadas células em contato apenas com o meio de cultura citado. A intensidade de fluorescência das soluções logo após a preparação foi obtida no equipamento Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader (Agilent Technologies), excitação 550 nm/emissão 570 nm, tempo 0 h, e consideradas como 100% para fins estatísticos.

As soluções então foram adicionadas, substituindo o meio de cultura, às células C4-2B semeadas 24 h antes na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço em placas SENSOPATE™ (Greiner Bio-One) de 96 poços, com fundo chato de vidro e paredes escuras. As soluções permaneceram em contato com as células durante 1 h e 4 h. Posteriormente, as soluções foram removidas da placa de cultura celular e suas intensidades de fluorescência foram novamente obtidas e transformadas em porcentagens relativas ao tempo 0 h de incubação. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Imagens representativas foram capturadas no microscópio invertido de fluorescência BZ-X800E (Keyence Corporation), n=1.

#### 4.2.3 Incorporação dinâmica das nanopartículas em modelo 2D

Células C4-2B foram semeadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas SENSOPATE™ de 96 poços recobertos com 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de colágeno tipo I (R&D Systems). Após confluência, o meio de cultura das células foi substituído por NP ácido nucleico\_Cy3 [100 nMol/L] em meio FluoroBrite™ DMEM suplementado com 10% SFB. Como controle, foram utilizadas células em contato apenas com o meio de cultura. Imagens representativas foram capturadas no microscópio invertido de fluorescência BZ-X800E a cada 60 min durante 60 h, com intervalos de *Z-stack* de 5  $\mu\text{M}$ . A intensidade de fluorescência foi avaliada através do *software* ImageJ (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012) e a fluorescência celular total corrigida (CTFC) foi calculada pela fórmula abaixo (McCloy *et al.*, 2014). O ensaio foi realizado em duplicata, n=1, e a análise estatística foi realizada com o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Dunnett, considerando 1 h como coluna controle.

CTFC = Densidade integrada – (Área total de fluorescência – Média da leitura do *background*)

#### 4.2.4 Estabelecimento de modelo 3D

O modelo 3D de CP de metástase óssea foi estabelecido conforme descrito por Tellman *et al.* (2021). Células C4-2B foram semeadas na densidade de  $5 \times 10^4$  em meio DMEM 1% SFB em placas 5D *Sphericalplate*® (Kugelmeiers Ltd.), de 24 poços contendo, em cada poço, 750 micropoços de fundo afunilado permitindo a aglomeração das células em formato de microtumores. Para ensaios de microscopia, as células foram preparadas em meio

FluoroBrite™ DMEM. Os microtumores foram mantidos em estufa umidificada a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h e posteriormente usados para os ensaios funcionais.

#### 4.2.5 Incorporação dinâmica das nanopartículas em modelo 3D

Para este ensaio foram utilizados os mesmos parâmetros do item 4.2.3, incorporação dinâmica realizada no modelo 2D, com o estabelecimento dos microtumores realizado em meio FluoroBrite™ DMEM 10% SFB. Após a formação dos microtumores, as estruturas foram cuidadosamente diluídas na proporção 1:3 em meio, visando otimizar as condições para a microscopia, e transferidas para placas SENSOPATE™ de 96 poços recobertos com 25 µg/mL de colágeno tipo I. Na sequência, foram adicionadas as NP ácido nucleico\_Cy3 [100 nMol/L] em volume final de 200 µL. Como controle, foram utilizados microtumores em contato apenas com o meio, sem as NP de CaP. Imagens representativas foram capturadas no microscópio invertido de fluorescência BZ-X800E a cada 60 min durante 60 h, com intervalos de *Z-stack* de 5 µM. A intensidade de fluorescência foi avaliada através do *software* ImageJ e a CTFC foi calculada. O ensaio foi realizado em triplicata, n=2, e a análise estatística foi realizada com o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Dunnett, considerando 1 h como coluna controle.

#### 4.2.6 Identificação do miRNA alvo

A técnica de Sequenciamento Massivo em Paralelo (SMP) foi realizada pelo grupo da Profa. Dra. Pamela Green (University of Delaware, EUA) em 2009. O resultado inédito foi cordialmente cedido para análise neste estudo com o objetivo de identificar miRNA diferencialmente expressos entre as linhagens humanas de câncer de próstata, sendo estas LNCaP, estabelecida a partir de paciente com metástase em linfonodos e responsiva à andrógenos, e C4-2B, linhagem derivada da LNCaP, porém isolada de metástase óssea, e com perfil de resistência à andrógenos. Brevemente, a técnica, hoje mais atualizada, consiste na preparação de bibliotecas de pequenos RNAs, extração do RNA, purificação das amostras por gel de eletroforese, amplificação das bandas por PCR, e detecção dos nucleotídeos marcados de maneira fluorescente no sistema Illumina GAIIx (Jeong *et al.*, 2013).

As sequências de miRNA com ocorrência superior a 20 vezes foram identificadas no presente estudo e nomeadas através da plataforma MiRBase versão 22.1 (Griffiths-Jones, 2004;

Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Griffiths-Jones *et al.*, 2008; Kozomara; Griffiths-Jones, 2011; 2014; Kozomara; Birgaoanu; Griffiths-Jones, 2019). Os genes alvos de cada miRNA foram identificados através da base de dados de genes experimentalmente validados MiRTarBase versão 9.0 (Huang *et al.*, 2022), para seleção de miRNA relacionados a metástase óssea, sendo ao final os seguintes: miR-29b-2-5p, miR-101-3p, miR-224-5p.

Os miRNA selecionados, cujas respectivas expressões foram validadas nas células LNCaP e C4-2B através da técnica de RT-qPCR, foram então testados. Brevemente, para a extração de RNA foi utilizado o kit *Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep* (Zymo Research). Para reação de poliadenilação e formação do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit *MiRNA 1st Strand cDNA Synthesis* (Agilent Technologies). As sequências dos iniciadores de RT-qPCR (Sigma-Aldrich Corporation) estão listadas na Tabela 4. Como controle endógeno, foi utilizado o *RNU6-1 MystiCq<sup>®</sup> microRNA qPCR Control Primer* (Sigma-Aldrich Corporation). Para a reação de qPCR foi utilizado o kit *qScript One-Step SYBR<sup>®</sup> Green RT-qPCR* (Quanta Biosciences) no equipamento C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) acoplado ao CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). Este ensaio foi realizado em triplicata, n=2. A análise estatística foi realizada pelo teste-t não pareado com intervalo de confiança de 95% nos dados de expressão relativa calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (Livak; Schmittgen, 2001).

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na técnica de RT-qPCR

miRNA	Sequência dos iniciadores (5'-3')
<i>hsa-miR-29b-2-5p</i>	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG
<i>hsa-miR-101-3p</i>	UACAGUACUGUGAU AACUGAA
<i>hsa-miR-224-5p</i>	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
<i>RNU6-1</i>	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAAC GAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGA UGACACGCAAUUCGUGAAGCGUCCAUAUUUU

#### 4.2.7 Tamanho e viabilidade celular do modelo 3D

Os microtumores preparados conforme descrito no item 4.2.4 em meio FluoroBrite<sup>TM</sup> DMEM 1% SFB foram cuidadosamente diluídos 1:3 e transferidos para placas



SENSOPLATE™ de 96 poços recobertos com 25 µg/mL de colágeno tipo I, seguida da adição das NP Mock, NP Scramble, e NP AntagomiR [100 nMol/L]. Em seguida, a aquisição de imagens representativas foram realizadas pelo microscópio invertido de fluorescência BZ-X800E a cada 60 min durante 48 h, com intervalos de *Z-stack* de 5 µM. As medidas foram realizadas nos *softwares* BZ-X800 Analyser e ImageJ, respectivamente, considerando as células ainda ligadas às estruturas, desconsiderando células migratórias soltas. O volume dos microtumores foi calculado pela fórmula elipsoidal modificada de Caliper (Jensen *et al.*, 2008) descrita a seguir:

$$\text{Volume do microtumor} = 1/2(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)$$

Após a captura de imagens por 48 h, foi utilizado o *LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells* (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc.) para identificação da atividade das enzimas entearases, relativas às células viáveis nos microtumores, com o corante verde fluorescente calceína AM, e identificação da perda da integridade da membrana plasmática com o corante vermelho fluorescente homodímero de etídio 1, relativa às células não viáveis. Os meios de tratamento foram substituídos pelos corantes em meio de cultura e mantidos por 45 min, seguidos de captura das imagens no microscópio confocal e multifóton A1R MP+ (Nikon Corporation). Estes ensaios foram realizados em quadruplicata e triplicata, respectivamente, n=1. Como controle, foram utilizados microtumores expostos ao meio de cultura sem adição de NP de CaP. O número de células viáveis foi calculado através do *software* Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) e análise estatística foi realizada com o teste ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. A análise estatística do ensaio de tamanho dos microtumores foi realizada pelo teste ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

#### 4.2.8 Imunofluorescência indireta

Os microtumores formados em placas 5D *Sphericalplate*® em meio FluoroBrite™ DMEM 1% SFB, foram diluídos 1:3, semeados em placas SENSOPLATE™ de 96 poços recobertos com 25 µg/mL de colágeno tipo I, e expostos às NP Mock, NP Scramble, e NP miR-205 [100 nMol/L] em meio FluoroBrite™ DMEM 1% SFB por 48 h. Como controle, foram utilizados microtumores em meio de cultura sem contato com NP de CaP. Na sequência, os microtumores foram fixados com paraformaldeído 4%, permeados com Triton 0,3% (Thermo

Fisher Scientific Inc.) e bloqueados com soro de cabra 10% (Thermo Fisher Scientific Inc.). Foram utilizados os anticorpos primários anti-E-caderina anti-*rabbit* 1:300 #3195S (Cell Signaling Technology), e anti  $\beta$ -catenina 1:300 anti-*mouse* #610153 (BD Biosciences) com incubação em agitação à 4°C *overnight*. No dia seguinte, os microtumores foram lavados com PBS 1× e marcados com os anticorpos secundários Alexa Fluor™ 568 *Goat-anti rabbit* IgG 1:2000 #A11036, Alexa Fluor™ 674 *Goat-anti mouse* IgG 1:2000 #A21236, Alexa Fluor™ 488 Phalloidin 1:100 #A12379 (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc.), e DAPI (1 mg/mL). Imagens representativas da região central dos microtumores de tamanho semelhante foram realizadas no microscópio confocal e multifóton A1R MP+ (Nikon Corporation), com objetiva de 60 × em óleo. Como controle do ensaio, foram utilizados microtumores corados com os anticorpos secundários. A fluorescência total foi medida através do *software* ImageJ e a análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni comparando a intensidade de fluorescência dos microtumores entre todos os grupos. Este ensaio foi realizado em quadruplicata, n=1.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para análise estatística dos dados resultantes de linhagens celulares comerciais, os valores que apresentaram distribuição normal foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e as análises estatísticas foram realizadas utilizando testes paramétricos no *software* GraphPad Prism versão 5.0, considerando  $P \leq 0.05$  como significante.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

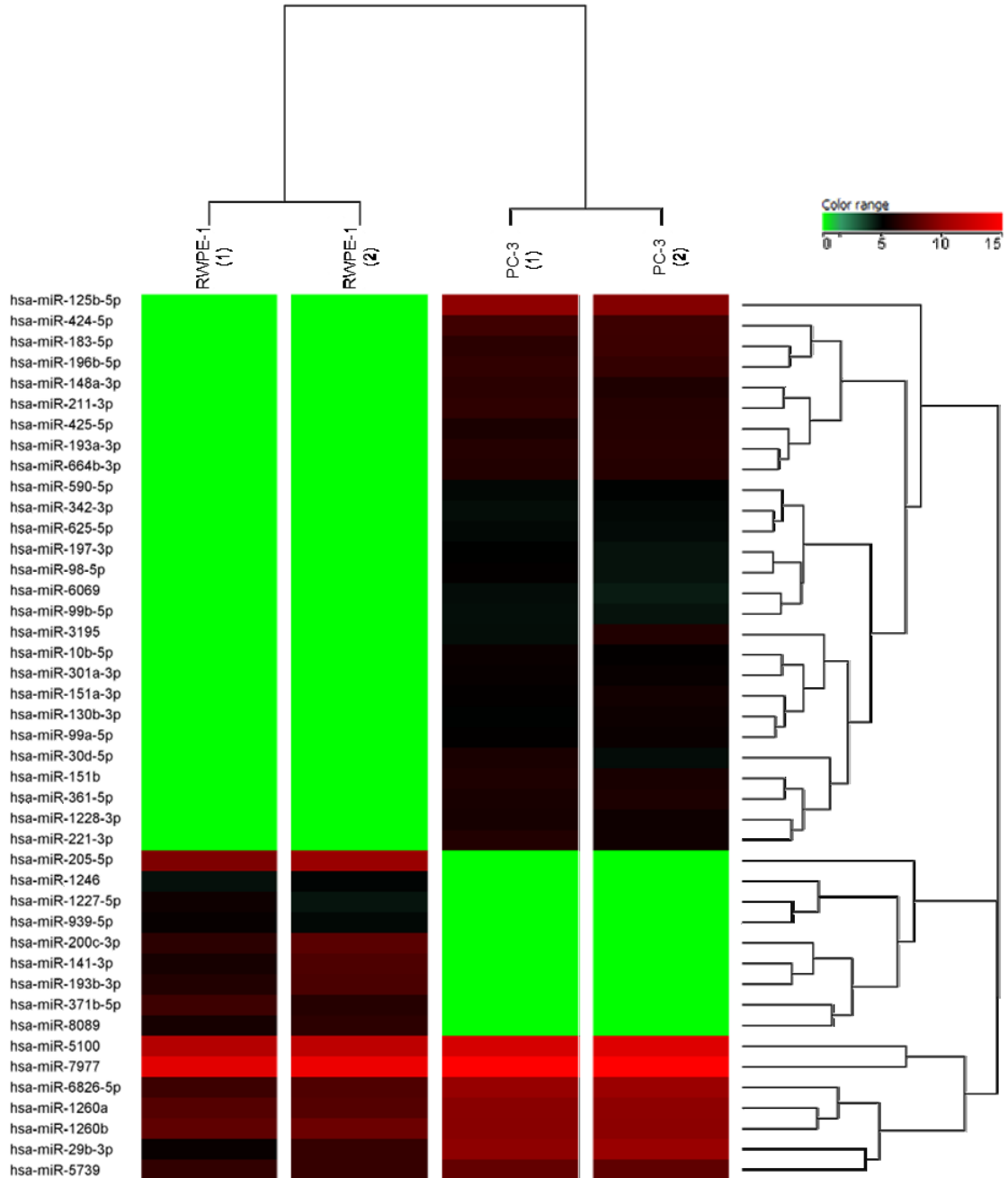
### 5.1 MODULAÇÃO DO MIR-205-5P – RESULTADOS OBTIDOS NO BRASIL

#### 5.1.1 Escolha do miR-205-5p

A análise de dados do ensaio de microarranjo, realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Rode *et al.*, 2021), entre a linhagem de próstata saudável RWPE-1 e a linhagem de câncer de próstata PC-3, resultou em uma lista de 159 miRNA detectados, sendo 43 diferencialmente expressos entre as linhagens, com 34 miRNA com expressão elevada na linhagem tumoral e 9

com expressão diminuída, considerando valor de  $P < 0,05$  e *Fold Change* (FC)  $> 2$  (Figura 8 e Tabela 5).

Figura 8 - Perfil de expressão dos miRNA alterados entre as linhagens RWPE-1 e PC-3.



Intensidade de expressão dos miRNA diferencialmente expressos entre as linhagens após análise de resultados de microarranjo. Clusterização por semelhança das sequências. A cor vermelha indica alta expressão e a cor verde indica ausência de expressão.

Tabela 5 - Os miRNA alterados entre as linhagens PC-3 e RWPE-1.

PC-3 x RWPE-1			
miRNA	Regulação	FC	P
<i>hsa-miR-125b-5p</i>	<i>Up</i>	736,657	3,90E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-424-5p</i>	<i>Up</i>	133,103	6,89E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-183-5p</i>	<i>Up</i>	101,995	0,0013
<i>hsa-miR-196b-5p</i>	<i>Up</i>	100,551	6,89E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-211-3p</i>	<i>Up</i>	82,828	7,17E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-193a-3p</i>	<i>Up</i>	77,276	7,51E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-148a-3p</i>	<i>Up</i>	73,683	9,31E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-664b-3p</i>	<i>Up</i>	70,770	6,89E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-425-5p</i>	<i>Up</i>	67,399	7,17E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-151b</i>	<i>Up</i>	59,819	2,30E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-361-5p</i>	<i>Up</i>	59,433	1,24E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-221-3p</i>	<i>Up</i>	56,632	0,0019
<i>hsa-miR-1228-3p</i>	<i>Up</i>	49,343	6,14E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-3195</i>	<i>Up</i>	41,986	0,0152
<i>hsa-miR-151a-3p</i>	<i>Up</i>	41,424	0,0015
<i>hsa-miR-301a-3p</i>	<i>Up</i>	39,124	6,80E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-30d-5p</i>	<i>Up</i>	38,963	0,0103
<i>hsa-miR-10b-5p</i>	<i>Up</i>	37,884	5,03E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-99a-5p</i>	<i>Up</i>	37,749	6,14E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-130b-3p</i>	<i>Up</i>	37,172	0,0017
<i>hsa-miR-590-5p</i>	<i>Up</i>	30,016	7,52E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-98-5p</i>	<i>Up</i>	29,078	0,0020
<i>hsa-miR-625-5p</i>	<i>Up</i>	27,795	6,89E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-197-3p</i>	<i>Up</i>	27,757	0,0013
<i>hsa-miR-342-3p</i>	<i>Up</i>	27,095	7,52E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-99b-5p</i>	<i>Up</i>	24,843	7,51E <sup>-05</sup>
<i>hsa-miR-6069</i>	<i>Up</i>	23,694	0,0012
<i>hsa-miR-29b-3p</i>	<i>Up</i>	14,292	0,0453
<i>hsa-miR-7977</i>	<i>Up</i>	6,806	0,0103

PC-3 x RWPE-1			
miRNA	Regulação	FC	P
<i>hsa-miR-6826-5p</i>	<i>Up</i>	6,662	0,0141
<i>hsa-miR-1260<sup>a</sup></i>	<i>Up</i>	3,507	0,0019
<i>hsa-miR-5100</i>	<i>Up</i>	3,091	0,0381
<i>hsa-miR-5739</i>	<i>Up</i>	2,848	0,0044
<i>hsa-miR-1260b</i>	<i>Up</i>	2,307	0,0474
<i>hsa-miR-1246</i>	<i>Down</i>	27,207	6,87E <sup>-04</sup>
<i>hsa-miR-1227-5p</i>	<i>Down</i>	32,386	0,0085
<i>hsa-miR-939-5p</i>	<i>Down</i>	33,120	0,0015
<i>hsa-miR-8089</i>	<i>Down</i>	69,650	0,0027
<i>hsa-miR-371b-5p</i>	<i>Down</i>	98,501	0,0027
<i>hsa-miR-141-3p</i>	<i>Down</i>	100,385	0,0176
<i>hsa-miR-193b-3p</i>	<i>Down</i>	110,152	0,0093
<i>hsa-miR-200c-3p</i>	<i>Down</i>	146,025	0,0103
<i>hsa-miR-205-5p</i>	<i>Down</i>	771,070	0,0017

As análises de bioinformática nas bases de dados miRDB, TargetScan e MirTarBase resultaram em genes alvos regulados por cada miRNA diferencialmente expresso entre as linhagens. Os genes alvos encontrados foram analisados quanto aos processos biológicos que regulam na base de dados Gene Ontology. Após esta análise, 4 miRNA, miR-125b-5p, miR-148a-3p, miR-205-5p e miR-939-5p, foram pré-selecionados para pesquisa na literatura do CP por apresentarem processos biológicos relacionados à tumorigenesis tais como: regulação negativa da apoptose, regulação positiva do crescimento celular, regulação positiva da migração celular, regulação da adesão celular e matriz extracelular, angiogênese e sinalização no receptor de andrógenos.

O miR-125b-5p, com expressão elevada em 736 vezes na linhagem tumoral, já foi descrito como elevado em linhagens celulares e tecidos de biópsia de CP, tem sido relacionado ao crescimento de linhagens independentes de andrógenos, bem como o crescimento tumoral em camundongos (Shi *et al.*, 2011). Além disso, o miR-125b pode modular a via de sinalização de *p14ARF/Mdm2*, inibindo a apoptose celular (Amir *et al.*, 2013).

Contudo, em outros estudos, o miR-125b é descrito como diminuído em linhagens celulares, xenoenxertos e amostras de tecido de CP (Porkka *et al.*, 2007; Karadag *et al.*, 2021). A diminuição do miR-125b está relacionada ao aumento da expressão do *ErbB2/3*, resultando em níveis aumentados de PI3K e BAD e em uma via de transdução de sinal aumentada na tumorigênese da próstata (Priolo *et al.*, 2014). Portanto a superexpressão de miR-125b reduz *ErbB2/3* em nível transcricional, reduzindo assim a sinalização AKT (Scott *et al.*, 2007). A restauração do miR-125b na linhagem metastática de CP, M12, leva a uma diminuição da migração e invasão celular, sendo destacado como um supressor tumoral (Budd *et al.*, 2015).

Devido à ação dual do miR-125b no CP, este miRNA não foi selecionado como agente terapêutico, tal como o miR-148a-3p, elevado em 73 vezes em nossa pesquisa, que também encontra-se elevado em amostras de pacientes com CP comparado a pacientes saudáveis (Jalava *et al.*, 2012; Dybos *et al.*, 2018; Gurbuz *et al.*, 2021), e também em casos de recorrência pós-cirúrgica (He *et al.*, 2022). Todavia, *in vitro*, foi observado um aumento da expressão do miR-148a-3p em células não tumorais e sensíveis a andrógenos e uma diminuição da expressão em linhagens resistentes a andrógenos (Murata *et al.*, 2010; Jalava *et al.*, 2012). Na linhagem resistente a andrógenos, a PC-3, a expressão do miR-148a promove a inibição da proliferação, migração e invasão celular, e aumento da sensibilidade ao tratamento por paclitaxel ao diminuir a expressão de MSK1 (Fujita *et al.*, 2010). De tal forma, os dois miRNA com expressão elevada no CP, para os quais poderiam ser utilizadas moléculas inibidoras (antagomiRs) não foram selecionadas como alvo desta pesquisa.

O terceiro miRNA, miR-939-5p, está diminuído em 33 vezes em células PC-3 em relação à células RWPE-1. Sobre esse miRNA, há apenas um trabalho publicado, que relata a expressão diminuída em amostras de tecido de CP, dado relacionado a um menor tempo de sobrevivência dos pacientes. Em células, a expressão exógena do miRNA com uma molécula mimética, foi capaz de suprimir a proliferação, migração, invasão, formação de colônia e aumentar a apoptose em células de CP, bem como diminuir o crescimento tumoral *in vivo* ao diminuir HDGF e inibir a ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina (Situ *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar da robustez dos dados publicados no artigo citado, entendemos que a escolha por uma molécula para fins terapêuticos deve ser amplamente suportada pela literatura, tal como o miR-205-5p, diminuído em nosso estudo em 771 vezes na linhagem tumoral, que vêm sendo extensamente descrito na literatura como um supressor tumoral no CP, bem como no câncer de bexiga (Wiklund *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2019), de colón (Gulei *et al.*, 2018; Fan;

Wang, 2020), de vesícula biliar (Zhang *et al.*, 2020), e de mama (Iorio *et al.*, 2009; Wu; Zhu; Mo, 2009; Elgamal *et al.*, 2013; De Cola *et al.*, 2018; Kalinkova *et al.*, 2021). Este miRNA é expresso em tecidos epiteliais de diversas espécies, e no genoma humano a sequência do pré-miR-205 está localizada na última junção íntron/exon do gene *miR-205 Host gene* (MIR205HG), no cromossomo 1q32.2 (Ferrari; Gandellini, 2020).

Como supressor tumoral no CP, o miR-205 já demonstrou reprimir a expressão de fatores envolvidos na EMT, motilidade e invasão celular como N-quimerina, E2F1/F5, ZEB1/2, e proteína quinase C $\epsilon$  (Gandellini *et al.*, 2009; Li; Li, 2018). A reintrodução do miR-205 em células de CP inibe a EMT induzida por FAC diminuindo assim a invasão celular, a aquisição de traços de células-tronco, a tumorigenicidade e a disseminação metastática, além de bloquear a ativação dos fibroblastos circundantes, ao reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias no estroma (Gandellini *et al.*, 2014). A restauração do miR-205 também induz a ativação das interleucinas que atuam como supressoras tumorais IL24 e IL32, tanto em nível de RNAm como de proteína, levando a apoptose e parada do ciclo celular (Majid *et al.*, 2010).

O miR-205-5p atenua a iniciação e progressão tumoral por preservar membranas basais, PTEN (Farina *et al.*, 2016) e reprimir a atividade do RA e MAPK (Gandellini *et al.*, 2012). A expressão de miR-205-5p é também inversamente proporcional à expressão do gene antiapoptótico *BCL2L2*, resultando em sensibilização à apoptose celular quando o miR-205 é administrado junto à quimioterápicos (Bhatnagar *et al.*, 2010). Outro caminho pelo qual o miR induz a parada no ciclo celular e apoptose, é a inibição de HER3, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Li, J. *et al.*, 2023).

Em amostras de tumor primário comparadas com um tecido saudável da próstata, a hipermetilação do MIR205HG *locus* é consistente com a diminuição da expressão de miR-205, resultando em aumento da recorrência bioquímica de pacientes (Hulf *et al.*, 2013). Além disso, o miR-205 parece atuar também em metástases, por ter como alvo a TP63. A diminuição TP63/miR-205 foi observada em amostras de metástases de mais de 200 pacientes com CP, sendo relacionada à perda de TP63/miR-205 com escore de Gleason mais alto, aumento da probabilidade de eventos metastáticos e de infiltração, e pior prognóstico (Tucci *et al.*, 2012). A expressão do miR-205-5p foi encontrada significativamente menor em 1.461 pacientes com CP comparados a 510 pacientes controle, sem tumor. Ainda, no CP com metástase óssea, o conteúdo de miR-205-5p é ainda mais reduzido do que no metastático não ósseo, sendo a expressão capaz de diferenciar entre os grupos (Sun *et al.*, 2020).

Assim, devido à importante diminuição da expressão do miRNA na linhagem tumoral observada pelo ensaio de microarranjo, às importantes vias alvo preditas pela análise de bioinformática e à consistência de dados na literatura demonstrando a atuação da molécula como supressora tumoral, o miR-205-5p foi escolhido para ser restaurado na linhagem PC-3, carregado por nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio, como forma de terapia molecular.

### 5.1.2 Caracterização das nanopartículas

A preparação das NP de CaP foi realizada pela mistura simples da sequência do miR-205-5p mimético, cálcio, fosfato e PEG-GLU, devido às forças eletrostáticas presentes organizarem a automontagem dos constituintes. As NP de CaP resultantes foram denominadas como NP miR-205, NP Mock (NP de CaP sem miRNA), e NP Scramble (NP de CaP contendo sequência de miRNA sem homologia com sequências de genes humanos).

A preparação de NP Mock resultou em partículas com tamanho médio de  $56,03 \pm 0,35$  nm e PDI de  $0,113 \pm 0,004$  (média  $\pm$  desvio padrão), a preparação de NP Scramble resultou em partículas com tamanho médio de  $52,71 \pm 0,76$  nm e PDI de  $0,149 \pm 0,032$ , e NP miR-205 com tamanho médio de  $49,62 \pm 0,15$  nm e PDI de  $0,116 \pm 0,004$ , conforme mostrado na Tabela 6 e Figura 9. Posteriormente, as NP de CaP foram analisadas por MET, em que foi confirmada uma formulação de partículas monodispersas e de aspecto esférico (Figura 10). Entretanto, o tamanho das NP de CaP mostrou-se menor que o observado por DLS, observação que vem de encontro com a literatura, pois a técnica de DLS fornece o raio hidrodinâmico das estruturas, enquanto MET fornece uma imagem precisa do núcleo das partículas (Sikkema *et al.*, 2007).

Tabela 6 - Tamanho médio das NP CaP por DLS.

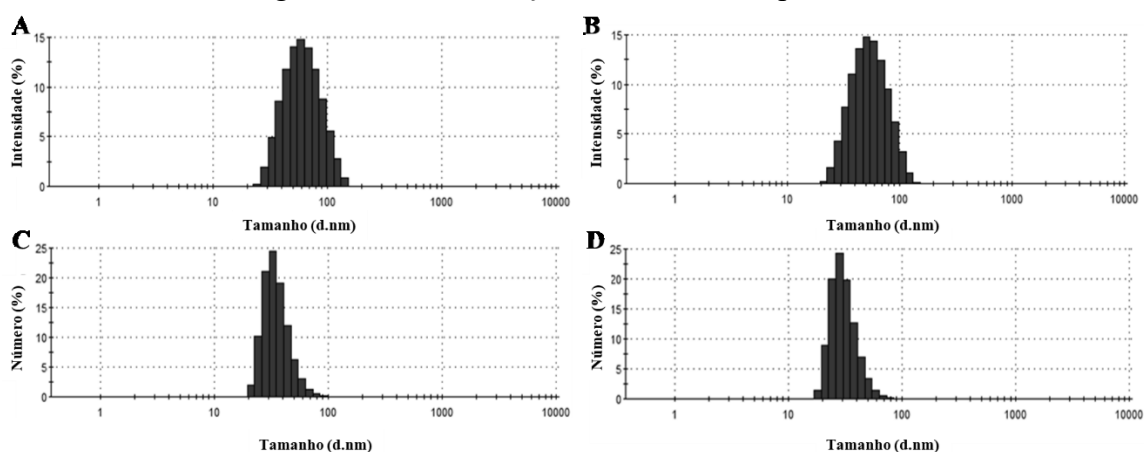
NP de CaP	Tamanho médio (nm)	PDI	Carga superficial (mV)
NP Mock	56	0,113	$0,127 \pm 0,089$
NP Scramble	53	0,149	$0,191 \pm 0,028$
NP miR-205	50	0,116	$0,232 \pm 0,160$

O emprego de nanocarreadores para a entrega de fármacos em tecidos alvos requer a formulação de partículas com características definidas e previsíveis, que forneçam biodisponibilidade máxima e efeitos colaterais mínimos (Danaei *et al.*, 2018), portanto faz-se necessária a confirmação de uma formulação com tamanho e formato adequados para entrega



no tumor, pois a ligação a receptores específicos da membrana celular, o tráfego dentro das células, o fluxo intracelular e a farmacocinética, os mecanismos de extravasamento e depuração é dependente destas características (Jiang *et al.*, 2008; Mitragotri; Lahann, 2009; Chen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Khalifehzadeh; Arami, 2020).

Figura 9 - Caracterização das NP de CaP por DLS.



Histograma de distribuição de tamanho por intensidade (A) e número (C) das NP Mock e NP miR-205 (B, D).

As NP podem apresentar tamanhos entre 1 a 100 nm e aquelas de tamanho próximo a 100 nm estão associadas a um curto tempo de circulação sanguínea devido ao acúmulo no retículo endoplasmático, além do fígado e baço, devido ao reconhecimento pelo sistema fagócito mononuclear nestes órgãos (Gustafson *et al.*, 2015). Já as NP de tamanho inferior a 10 nm apresentam alta taxa de depuração renal (Choi *et al.*, 2007). Para um maior tempo de circulação e acúmulo em tumores sólidos, o tamanho ideal esperado de NP varia entre 10 e 80 nm (Arami *et al.*, 2015), sendo aquelas com tamanho entre 40 e 50 nm as mais eficientes em promover modificações funcionais em células receptoras, quando comparadas a um espectro de NP de ouro com variações de tamanho de 2 a 100 nm (Bao *et al.*, 2016).

As NP de CaP com tamanho médio de 50 nm já haviam sido estudadas por nosso grupo de pesquisa para entrega de siRNA (De Mello *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021). Aqui, identificamos que as NP de CaP sintetizadas mantêm as propriedades para serem carreadoras também de miRNA e estão de acordo com dados da literatura. Neste sentido, foi relatado que NP para entrega de miR-205-5 mimético com núcleo de óxido de ferro e revestimento de MPEI-PEG, apresenta tamanho médio de 117,2 nm e PDI de 0,246 (Nagesh *et al.*, 2018). Outros sistemas de entrega do miR-205-5p mimético descritos pela literatura incluem NP de ouro com tamanho aproximado de 13 nm (Hao *et al.*, 2011), micelas de 60 nm (Mittal *et al.*, 2014),

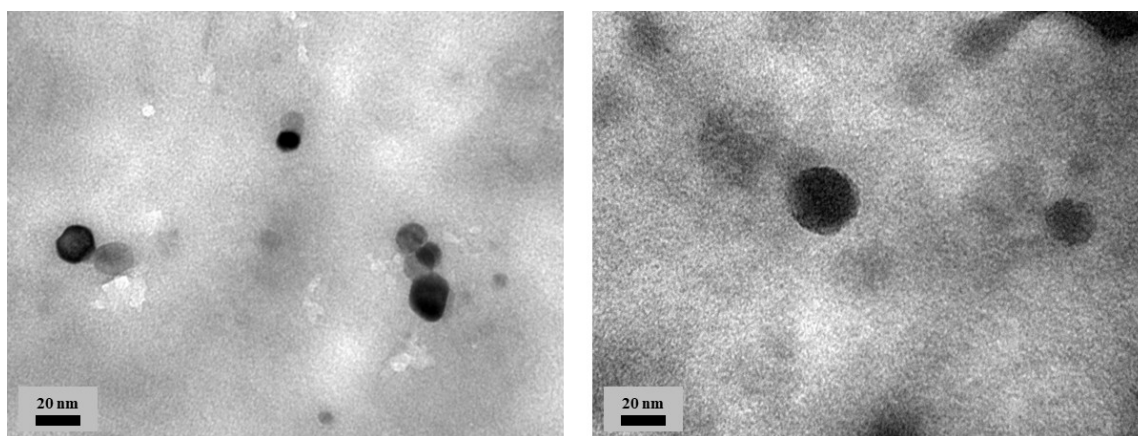
lipossomas de 120 nm (Yang *et al.*, 2013; Qin; Li; Xie, 2018), e dendrímeros de 238,4 nm (Qian *et al.*, 2022), destacando a faixa de tamanho ideal para acumulação em tumores sólidos encontrada nas NP de CaP sintetizadas neste estudo, frente aos dados da literatura.

As NP de CaP apresentaram PDI próximo a 0,1 indicando populações de tamanho homogêneo, uma vez que a medida varia de 0,0 (totalmente homogênea) a 1,0 (não homogênea), o que pode ser observado na Figura 9 com a presença de apenas um pico nos gráficos. Em trabalhos com NP PEGuiladas, espera-se valores de PDI de até 0,2 para considerar a formulação monodispersa (Danaei *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante a ser considerado é o formato das NP, que dita as interações que ocorrem com as membranas celulares e proteínas séricas circulantes (Guo *et al.*, 2020). As NP em formato oblato são mais propensas a migrar em direção às paredes dos vasos sanguíneos e estabelecer interações com células endoteliais dos vasos sanguíneos em comparação com nanopartículas esféricas (Müller; Fedosov; Gompper, 2014).

Formatos quadrangulares apresentam maior acúmulo em órgãos *in vivo* do que formatos triangulares e pentagonais (Jasinski *et al.*, 2018). As NP em formato de bastão tem maior resistência gastrointestinal, maior tempo de circulação e menor excreção renal que as de formatos esféricos, que são degradadas mais lentamente devido a menor área de contato (Zhao *et al.*, 2017). Neste trabalho, as NP de CaP que produzimos são esféricas (Figura 10), formato que estimula menos o sistema imune que as laminares (Ramesh *et al.*, 2007), e induzem menor produção de IL-1 $\beta$  que as NP em formato de bastão (Hayashi *et al.*, 2016).

Figura 10 - Morfologia das NP miR-205 por MET.



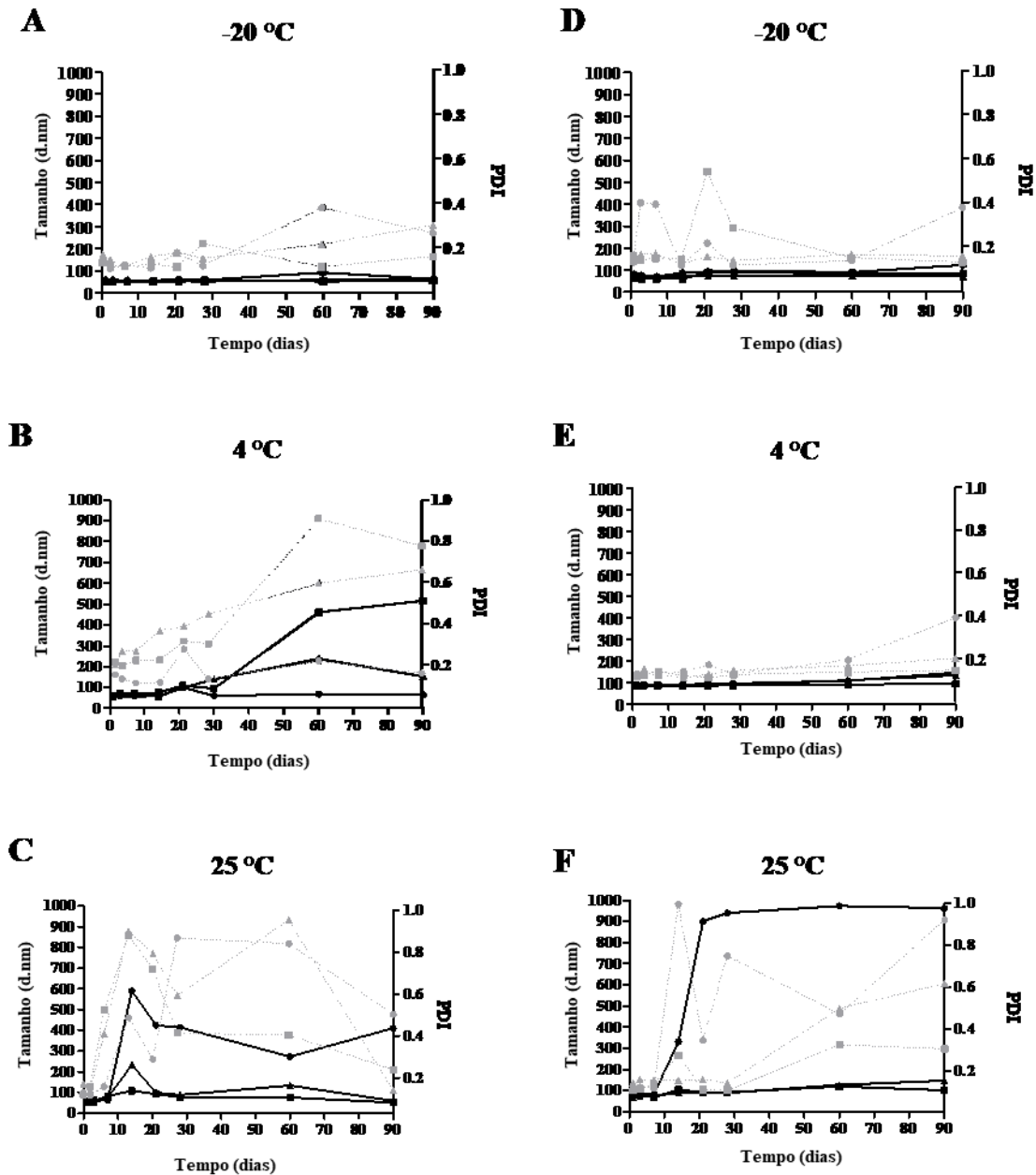
Imagens representativas das NP miR-205. Micrografias indicam nanopartículas com aspecto esférico, analisadas por MET. Escala: 20 nm.

O potencial zeta, termo utilizado para o potencial eletrocinético em sistemas coloidais, ou seja, a diferença de potencial elétrico entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido ligada à partícula dispersa, indica o grau de repulsão entre as partículas carregadas na dispersão. Valores positivos elevados, acima de 30 mV, implicam em partículas altamente carregadas, o que impede a agregação das mesmas devido à repulsão elétrica, porém apresentam elevada citotoxicidade (Fröhlich, 2012). Valores inferiores a -30 mV são considerados ótimos para a estabilidade de uma nanodispersão, enquanto valores próximos a zero podem indicar que a atração superará a repulsão, e é provável que agregados sejam formados (Freitas; Muller, 1998). A carga superficial das NP de CaP, determinada pelo potencial zeta, foi de  $0,127 \pm 0,089$  mV para NP Mock,  $0,191 \pm 0,028$  mV para NP Scramble e  $0,232 \pm 0,160$  mV para NP miR-205 (Tabela 6), mantendo-se próximas à neutralidade e sem diferença estatística significativa entre elas.

Uma vez que, na ausência de aditivos, cristais de CaP crescem indistintamente, optou-se pelo uso de PEG-GLU para favorecer a estabilização das partículas, tendo como consequência a carga superficial próxima da neutralidade. Mudanças de carga em NP de CaP após PEGuilação são frequentemente observadas, devido ao caráter não iônico do PEG, mas sem observar perda na eficiência de entrega e com aumento da estabilidade, uma vez que as cadeias longas do polímero aumentam a repulsão estérica, evitando agregação (Jiang; Lodge; Reineke, 2018). No estudo de Machado Cruz *et al.* (2020), a PEGuilação das NP desenvolvidas para entrega de itraconazol, alterou a carga de -30,1 para -18,6 mV. No estudo de Ramachandran; Paul e Sharma (2009) a adição de PEG em NP de CaP para entrega oral de insulina, alterou a carga de -46,2 mV para -5,1 mV, aumentando a liberação gastrointestinal de 2% para 6,5% em 8 h, melhorando a qualidade da formulação. Ainda, no estudo de Stiuftuc *et al.* (2013), foi observado que é possível aumentar gradualmente o comprimento da cadeia do polímero, (PEG200 – PEG20000), controlando a carga superficial das NP de -28mV para -2 mV, sem qualquer modificação da estabilidade coloidal.

Então, para avaliar a estabilidade das NP de CaP PEGuiladas, puras e diluídas em meio de cultura 1:1 (v/v), tamanho e PDI foram acompanhados por 90 dias nas temperaturas 25 °C, 4 °C e -20 °C, sendo consideradas estáveis até 100 nm, tamanho limítrofe para acumulação em tumores sólidos pelo efeito EPR (Lee *et al.*, 2014) e PDI de até 0,4 (Figura 11).

Figura 11 - Estabilidade das formulações por DLS e PDI.



Avaliação de estabilidade. Tamanho das NP de CaP em linha contínua preta e PDI em linha tracejada cinza, avaliadas após 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias da preparação, puras e diluídas 1:1 em meio de cultura, armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (A e D, respectivamente), armazenadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (B e E, respectivamente) e à temperatura ambiente (C e F, respectivamente). O símbolo redondo (●) refere-se às NP Mock, quadrado (■) às NP Scramble e triângulo (▲) às NP miR-205.

Diante destes parâmetros, concluímos que as NP de CaP permanecem estáveis por até 90 dias quando armazenadas em *freezer* à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em geladeira ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) diluídas em meio de cultura, e até 28 dias sem diluição. As formulações mantidas em temperatura ambiente mantiveram a estabilidade por um período reduzido de tempo, 7 dias (Tabela 7). Ainda, não

foram observadas alterações macroscópicas das formulações, apenas nas NP Mock diluídas em meio de cultura armazenadas em temperatura ambiente (Figura 11F), pois é provável ter ocorrido contaminação por microrganismos durante os dias de armazenamento.

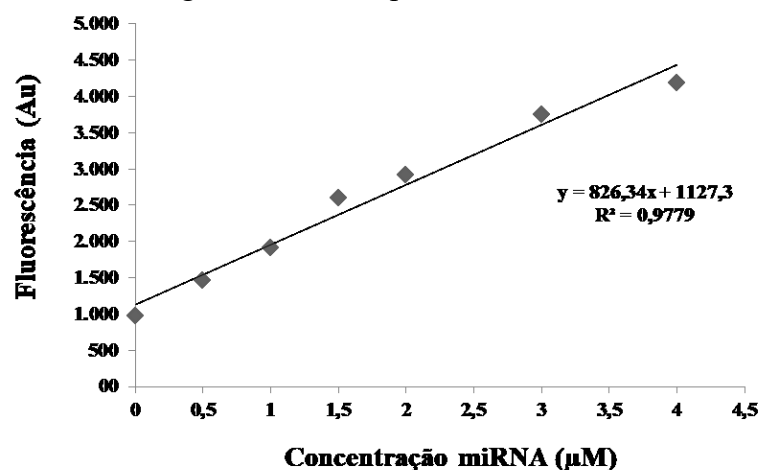
Tabela 7 - Estabilidade das NP de CaP.

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo (dias)</b>
25 °C	7
4 °C	28
-20 °C	90

Uma vez que os experimentos previstos com linhagens celulares envolveriam exposição das NP de CaP aos meios de cultura para manutenção das células tratadas, a estabilidade coloidal foi avaliada nestas condições. As propriedades físico-químicas de NP podem ser afetadas pela presença de proteínas e íons no meio e variam de acordo com a matriz na qual se encontram (Dobrovolskaia *et al.*, 2009). Por exemplo, o meio RPMI-1640 contém cinco vezes mais íons fosfato (5,63 mMol/L) que o meio DMEM (0,92 mMol/L) e o plasma humano (1,0 mMol/L), e vinte vezes menos proteínas que o plasma, sendo necessário o delineamento dos experimentos de acordo com o meio a ser utilizado (Moore *et al.*, 2015). No presente estudo, não foi verificada alteração da estabilidade coloidal em meio devido à presença de PEG, que por sua composição química, conformação e densidade, diminui a adsorção de proteínas na superfície da partícula, resultado que vai de acordo com o que é encontrado na literatura, em que NP de CaP PEGuiladas podem inclusive aumentar a estabilidade do quimioterápico gemcitabina no plasma, protegendo a molécula da degradação por citosina desaminase (Chu *et al.*, 2018). De fato, observamos que as NP de CaP mantiveram-se estáveis mesmo com a carga superficial neutra.

A quantidade de miRNA livre não encapsulado pelas NP de CaP foi calculada através da concentração de miRNA no sobrenadante após 4 h de centrifugação, tempo necessário para observar a precipitação das NP de CaP (dados confirmados por DLS). O valor encontrado foi comparado a uma curva padrão do miRNA (Figura 12), sendo possível estimar que a quantidade de miRNA encapsulado, através da fórmula descrita no item 4.1.5, foi de 53,4%, valor semelhante ao já encontrado para NP de CaP sintetizadas por nosso grupo, com eficiência de encapsulação de 45% e capacidade significativa de redução tumoral *in vivo* (Souza *et al.*, 2021).

Figura 12 - Curva padrão de miRNA



Curva analítica padrão da molécula fluorescente intercalada a miRNA, realizada por espectrofluorimetria ( $\lambda$  excitação 500 nm/emissão 525 nm).

Sequências de miRNA encapsuladas em NP dependem da composição das mesmas (Moraes *et al.*, 2021). As NP de dextrano e espermina são capazes de encapsular aproximadamente 90% do anti-miR-21, devido as cargas altamente positivas presentes na estrutura (Zheng *et al.*, 2022). As NP magnéticas de ouro-óxido de ferro complexadas com quitosana foram capazes de encapsular 80% de anti-miR-21 e miR-100 mimético, porém causam toxicidade às células devido ao excesso de grupos amina livres carregados positivamente da quitosana (Sukumar *et al.*, 2019). As NP lipídicas sólidas utilizadas para encapsular anti-miR-21 e o quimioterápico pemetrexede para o tratamento de glioblastoma, foram capazes de incorporar mais de 90% da sequência de miRNA (Küçükürkmen; Bozkır, 2018). A co-encapsulação de miR-34a mimético e paclitaxel também foi superior a 90% nestas partículas (Shi *et al.*, 2014). As NP poliméricas de ácido polilático-co-glicólico são capazes de encapsular até 78% de miR-150 mimético para o tratamento do câncer pancreático (Arora *et al.*, 2014). As NP lipídicas com CaP do grupo de Huang e colaboradores (2010), apresentaram eficiência de encapsulação de siRNA próxima a 40%, que foi aumentada para 91% com adição de PEG e anisamida na superfície lipídica, porém associada com alta carga superficial (25 mV) (Yang, Y. *et al.*, 2012).

Quanto maior a concentração de PEG na composição das NP, menor é a eficiência de encapsulação de oligonucleotídeos devido a competição pela ligação ao CaP (Kakizawa; Furukawa; Kataoka, 2004). Para aumentar a eficiência de encapsulação, modificações na cadeia do miRNA podem ser realizadas, como a adição de grupos tiol nas extremidades 3' e 5', aumentando o peso molecular e a densidade de carga da cadeia (Jung *et al.*, 2015). Neste

trabalho, optou-se pelo prosseguimento dos experimentos *in vitro* utilizando a NP de CaP, mesmo com a eficiência de encapsulação inferior à outros trabalhos encontrados na literatura, já que pela nossa experiência a formulação não apresenta toxicidade *in vivo* (Souza *et al.*, 2021) e o desenvolvimento de NP não compreenderia o objetivo principal do trabalho.

### 5.1.3 Estudos funcionais

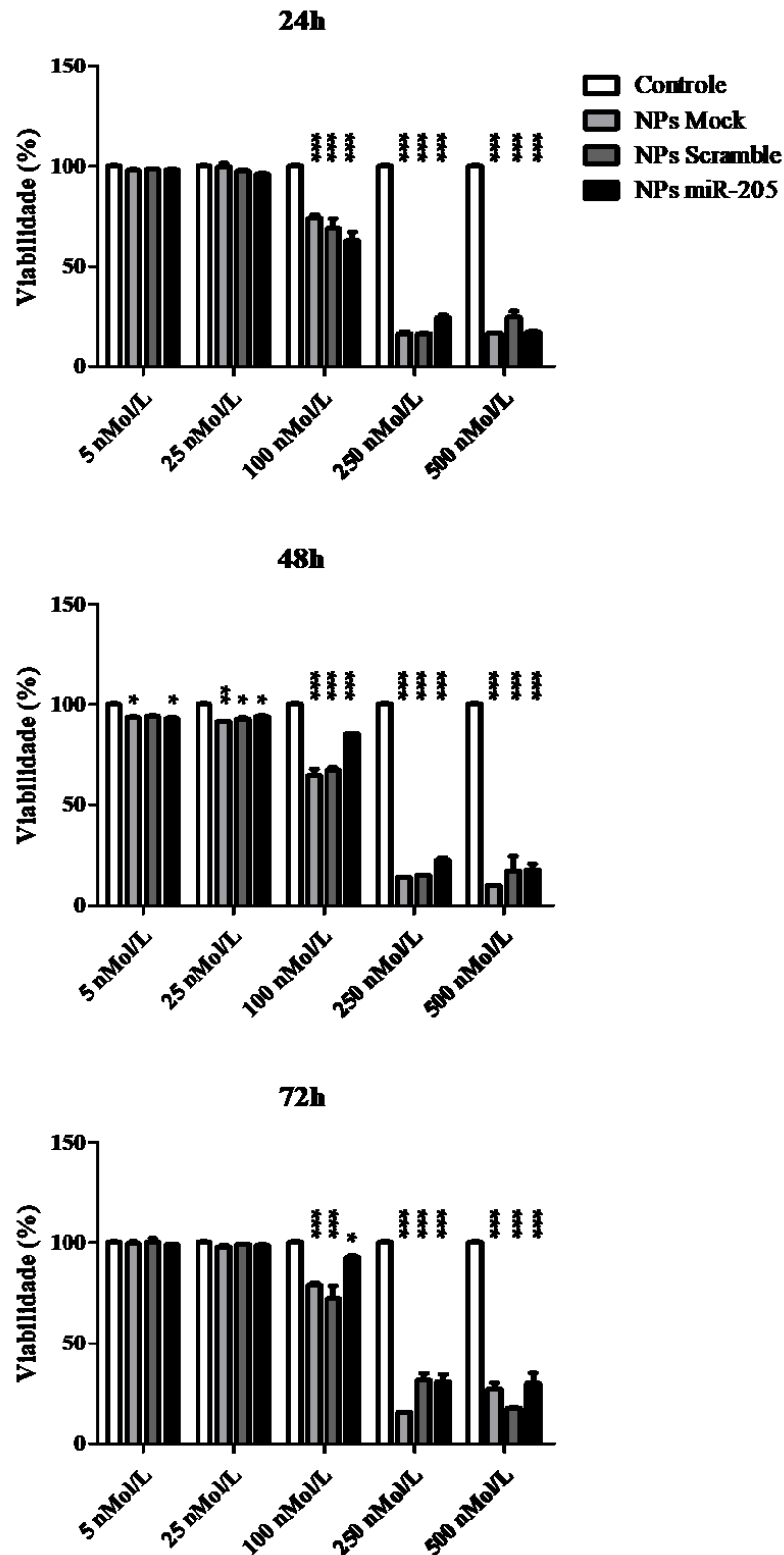
Após a caracterização das NP de CaP, iniciaram-se os ensaios com a linhagem de câncer de próstata PC-3, estabelecida a partir de sítio metastático no tecido ósseo, não sendo responsiva a andrógenos, apesar de expressar fracamente RA, e não produtora de PSA. A toxicidade das NP de CaP às células foi avaliada pelo método de MTS utilizando NP Mock, NP Scramble, e NP miR-205 em concentrações seriadas [5 – 500 nMol/L] por 24 h, 48 h, e 72 h. Estas condições foram determinadas de acordo com trabalhos já publicados indicando a concentração necessária de miRNA para ocasionar alterações na expressão gênica (Lu *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2020; Ouyang *et al.*, 2020; Ouni *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2023).

Neste primeiro ensaio, o plaqueamento e a manutenção das células foram realizados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, condição normalmente utilizada em nosso laboratório para as células PC-3. Entretanto, dessa forma, foi observada uma toxicidade não prevista das NP de CaP controle (Figura 13), uma vez que os componentes presentes nas partículas são biocompatíveis e não demonstraram toxicidade em trabalhos anteriores do grupo com outras linhagens celulares. A morte celular observada por MTS foi também confirmada pelo método Azul de Tripán.

Após a avaliação das variáveis e da realização de diversos testes, concluiu-se que a citotoxicidade era referente a um artefato experimental. Acreditamos que a influência na toxicidade observada em meio RPMI-1640 deve-se à composição de íons do mesmo (Moore *et al.*, 2015), especialmente íons fosfato, que podem ter gerado uma sobrecarga às células, concomitante à presença das NP de CaP, formadas por fosfato de cálcio. O excesso de fosfato em culturas celulares pode causar estresse do retículo endoplasmático e apoptose (He *et al.*, 2021), além de poder influenciar nas propriedades físico-químicas das NP de CaP.

Optou-se então por cultivar as células em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Desta forma, observamos uma redução da viabilidade apenas nas células tratadas com NP miR-205 por 48 h, de [100 nMol/L] a [500 nMol/L] (Figura 14).

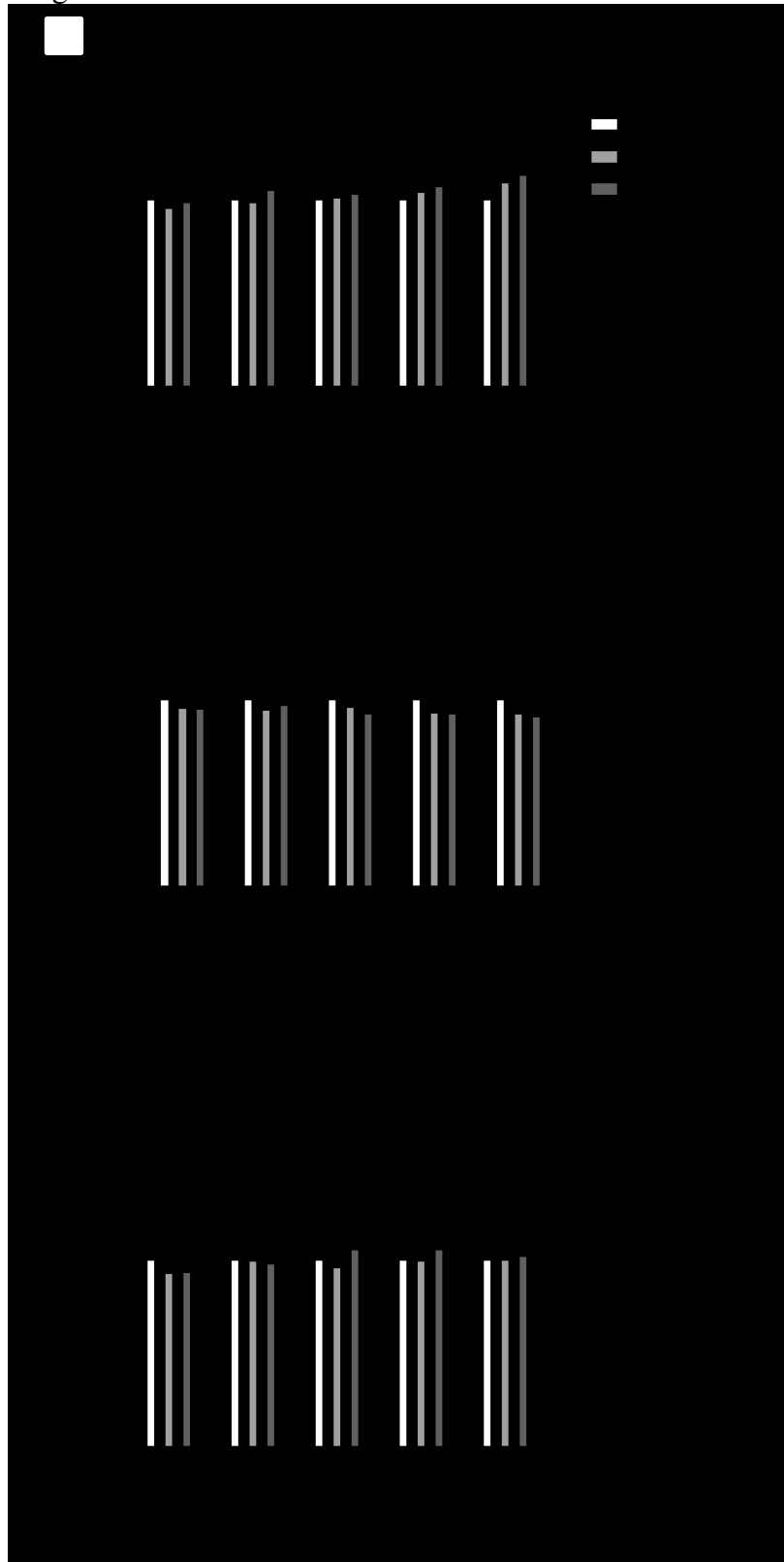
Figura 13 - Citotoxicidade das NP de CaP em meio RPMI-1640.



Avaliação da citotoxicidade das NP de CaP pelo ensaio de MTS na linhagem de câncer de próstata PC-3 mantidas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB por 24 h, 48 h, e 72 h. Ensaio realizado em triplicata, n=3, \*\*\*P < 0,001, \*\*P < 0,01, \*P < 0,05.



Figura 14 - Citotoxicidade das NP de CaP em meio DMEM.



Avaliação da citotoxicidade das NP de CaP pelo ensaio de MTS na linhagem de câncer de próstata PC-3. Células mantidas em meio DMEM com 10% de SFB por 24 h, 48 h, e 72 h, ensaio realizado em triplicata, n=3, \*\*\*P < 0,001, \*\*P < 0,01, \*P < 0,05.

Assim, descartamos também a hipótese de citotoxicidade decorrente de um excesso de cálcio intracelular, cuja concentração é tipicamente em torno de 100 nMol/L (Neumann *et al.*, 2009; Bagur; Hajnóczky, 2017) e poderia estar associada à morte celular após um aumento abrupto da concentração do íon, ainda que incrementos transitórios possam favorecer o ciclo celular (Steinhardt; Alderton, 1988; Taylor *et al.*, 2008). Ao utilizar NP de CaP, entretanto, parece não haver um aumento significativo do cálcio intracelular, como ocorreria com a adição de cálcio livre, na ausência de NP, pois o íon seria rapidamente drenado para fora das células, sem causar citotoxicidade (Neumann *et al.*, 2009).

Na literatura, a restauração do miR-205-5p mimético carregado por nanopartículas magnéticas de óxido de ferro/PEG também foi capaz de diminuir a viabilidade celular e aumentar a sensibilidade de células PC-3 ao quimioterápico docetaxel. Neste estudo, foi observado o aumento da apoptose pela inibição da proteína Bcl-xL (Nagesh *et al.*, 2018). O miR-205-5p já foi descrito como indutor da apoptose em células de CP por regular negativamente Bcl-w (Bhatnagar *et al.*, 2010), HER3 (Li, J. *et al.*, 2023), e Bcl-2 (Verdoodt *et al.*, 2013). A expressão de Bcl-2 em biópsias de CP é correlacionada com a extensão extracapsular do tumor (Arrighetti; Beretta, 2021).

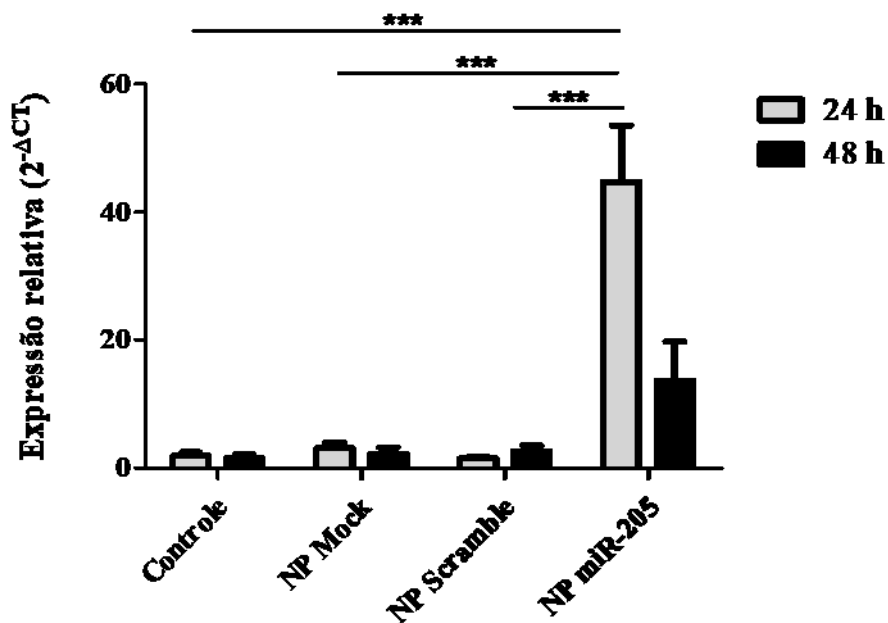
A entrega de miR-205-5p mimético em células PC-3 por NP de ouro e lipossomas diminui a proliferação e invasão celular (Hao *et al.*, 2011), e induz a apoptose mediada por cisplatina, além de aumentar a expressão da proteína apoptótica caspase-9 e E-caderina e diminuir a expressão de MMP-9 e p-ERK (Qin; Li; Xie, 2018). A sensibilização de células de CP por miR-205-5p à cisplatina também está relacionada à diminuição do fluxo autofágico via *RAB27A* e *LAMP3* (Pennati *et al.*, 2014).

A transfecção do miR-205-5p mimético em células PC-3 com Lipofectamina<sup>®</sup> 2000 e em xenoinxertos de camundongos, foi capaz de aumentar significativamente a resposta à radiofármacos através do comprometimento do reparo aos danos de DNA induzido pela radiação, como consequência da inibição de PKC $\epsilon$  e *ZEB1* (El Bezawy *et al.*, 2019). Ainda, o miR-205-5p pode inibir a expressão de E2F1, proteína associada à resistência a quimioterápicos em diversos tipos de câncer, através da regulação da família de transportadores ABC e Bcl-2, indicando que a supressão da expressão de E2F1 por miR-205-5p pode ser usada para sensibilizar células tumorais à quimioterapia (Lai *et al.*, 2018). No presente estudo, observamos uma redução na viabilidade de células expostas à concentrações crescentes do miR-205-5p

mimético, que acreditamos que pode estar associada com os quimioterápicos docetaxel e cabazitaxel para melhores respostas aos tratamentos do estágio metastático ósseo do CP.

Partindo-se do tempo necessário para diminuição da viabilidade celular observada pelo ensaio de MTS, a avaliação da entrega e restauração da expressão do miR-205-5p em células PC-3 foi avaliada por RT-qPCR após exposição durante 24 h e 48 h às NP de CaP (Figura 15). Neste ensaio, observamos que as NP miR-205 são eficientes na promoção de uma restauração significativa do miR-205-5p nas células alvo, especialmente dentro de 24 h de tratamento. Além disso, as demais NP utilizadas não promovem efeito inespecífico de aumento do miRNA celular, sendo portanto, o método de tratamento considerado adequado para a recuperação da expressão.

Figura 15 - Restauração da expressão do miR-205-5p.

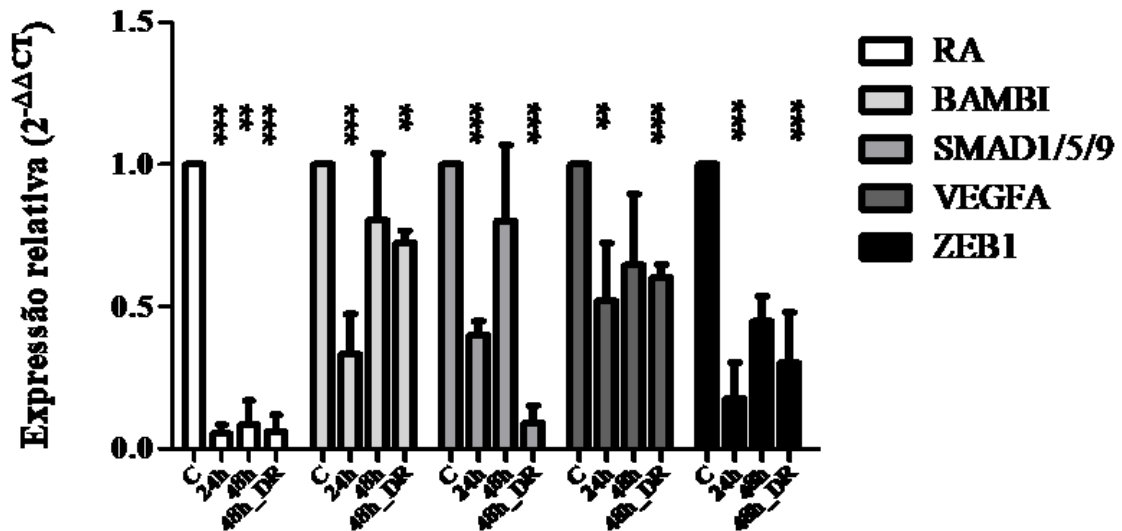


Ensaio de RT-qPCR. Expressão relativa do miR-205-5p em células PC-3 após tratamento com NP de CaP [100 nMol/L] por 24 h e 48 h, ensaio realizado em triplicata, n=3. \*\*\*P < 0,001.

Em seguida, avaliamos a expressão dos genes alvo do miR-205-5p sendo estes o *RA*, *BAMBI*, *SMAD1/5/9*, *VEGFA* e *ZEB1* após exposição a [100 nMol/L] de NP de CaP por 24 h, 48 h, e 48 h<sub>DR</sub> (Figura 16), afim de que pudéssemos identificar se o efeito observado nos genes seria decorrente, de fato, do tempo de tratamento ou relacionado ao *doubling time* e diluição das células PC-3. Neste ensaio, observamos que a exposição às NP miR-205 promoveu a inibição significativa no conteúdo de todos os genes alvo em 24 h, condizente com o tempo

em que a restauração da expressão do miR-205-5p manteve-se nas células. Em 48 h, observamos que apenas a inibição da expressão do *RA* foi mantida, mas todos voltam a decair com a adição de NP miR-205 no tratamento em dose repetida (48 h\_DR).

Figura 16 - Avaliação da expressão de genes alvos do miR-205-5p.



Ensaio de RT-qPCR para avaliação de genes alvo. Expressão de genes alvos do miR-205-5p em células PC-3 após tratamento com NP miR-205 [100 nMol/L] por 24 h, 48 h, e 48 h\_DR, ensaio realizado em triplicata, n=3. \*\*\*P < 0,001, \*\*P < 0,01.

De acordo com as interações miRNA-gens previstas pelos bancos de dados consultados, confirmamos nossa hipótese de que com a restauração do miR-205-5p nas células, os genes alvo que estão positivamente regulados durante a deficiência do miRNA, têm a expressão consideravelmente inibida, o que possivelmente diminuiria a progressão e agressividade tumoral e aumentaria a susceptibilidade às terapias. Além disso, os resultados observados estão de acordo com o modelo matemático predito por Hausser *et al.* (2013) a respeito do tempo necessário para ação de miRNA em genes alvo. Segundo o estudo, os miRNA exógenos adicionados às células competem com os miRNA endógenos pela ligação com a proteína AGO2 e observa-se um pico de ligação em 10 h – 12 h, com efeito na expressão de genes em 24 h. A forma de modulação também influencia o destino do ácido nucleico, uma vez que miRNA injetados diretamente no citoplasma celular possuem uma ação tempo linear, enquanto miRNA transfetados possuem uma ação máxima em RNAm em aproximadamente 20 h, com retorno da expressão celular normal após esse período. Neste sentido, identificamos que para uma ação consistente na modulação gênica utilizando NP de CaP, a repetição do tratamento após 24 h

parece ser a forma mais adequada. Além disso, atualmente estudos demonstram que a modificação das sequências de miRNA e a modulação por vetor lentiviral podem promover efeitos mais específicos do que o uso de miRNA miméticos às sequências endógenas transfectadas, porém é necessária precaução no uso de ferramentas de edição gênica devido aos efeitos imunológicos advindos da mesma (Follenzi; Santambrogio; Annoni, 2007; Jin *et al.*, 2015; Shirley *et al.*, 2020).

A respeito dos genes alvos avaliados, conforme apresentado no item 2.2.3, o tecido sadio da próstata, bem como as células de CP, necessitam da expressão do RA para proliferar, sendo consequentemente a inibição do receptor considerada o padrão ouro de tratamento no manejo clínico (Nigro *et al.*, 2022). Entretanto, um grande número de pacientes desenvolve o CP resistente à castração e metástases ósseas (Scher; Sawyers, 2005; Ross *et al.*, 2008). Uma das hipóteses que corroboram com o descrito previamente a respeito da resistência hormonal envolve o aumento dos efeitos da ativação da sinalização de  $\beta$ -catenina devido à inibição do RA (Kretzschmar *et al.*, 2015). As sinalizações do RA e Wnt/ $\beta$ -catenina teoricamente não deveriam estar relacionadas, contudo, no CP resistente à castração, isto é observado, e a  $\beta$ -catenina é então translocada do citoplasma para o núcleo, aumentando a transcrição de RA (Yang *et al.*, 2002). Cerca de 60% dos casos de CP metastático têm forte expressão citoplasmática de  $\beta$ -catenina, em comparação com menos de 20% dos casos de CP localizado (Jung *et al.*, 2013).

Na contínua remodelação óssea, a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina atua conjuntamente com BMPs para a manutenção da homeostase do tecido. Ao mesmo tempo que Wnt/ $\beta$ -catenina é inibida por BMPs (He *et al.*, 2004; Ille *et al.*, 2007; Meharwade *et al.*, 2023), a sinalização é descrita como altamente ativa em osteoblastos e células precursoras (Zhang, R. *et al.*, 2013). Curiosamente, no contexto tumoral, o pseudoreceptor de membrana BAMBI (do inglês, *BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*), é descrito como responsável pela superexpressão de  $\beta$ -catenina em osteossarcomas (Zhou *et al.*, 2013), e no câncer gástrico (Liu, K. *et al.*, 2014), além de promover a proliferação de células de mesotelioma (Hoang *et al.*, 2022), e diferenciação de macrófagos em gliomas (Wang; Chen; Zhang, 2018). Uma vez que neste trabalho a restauração do miR-205-5p promoveu a inibição de *BAMBI* e *RA*, concomitante à redução da viabilidade de células PC-3, hipotetizamos que no CP metastático ósseo, *BAMBI* pode estar relacionado com a expressão do *RA* através da complexa sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e, portanto, sugerimos o papel de oncogenes neste estágio da doença.

A relação entre a superexpressão de *SMAD1/5/9*, *VEGFA* e *ZEB1* no CP metastático, por outro lado, já tem sido amplamente descrita, especialmente a respeito da indução da EMT e angiogênese e a agressividade resultante do processo (Shola *et al.*, 2012; Bender; Mac Gabhann, 2015; Dai *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2021; Maxwell *et al.*, 2022). No presente trabalho, confirmamos a inibição de *ZEB1* pela restauração do miR-205-5p, de acordo com dados da literatura (Gregory *et al.*, 2008; Nagesh *et al.*, 2018; El Bezawy *et al.*, 2019) e descrevemos a inibição de *VEGFA* e *SMAD1/5/9* pela molécula no CP, conforme já observado em outros tipos de câncer (Zhang *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022; Toro; Shukla; Bansal, 2023), corroborando com o estabelecimento do miR-205-5p como um supressor tumoral no CP.

## 5.2 MODULAÇÃO DO MIR-224-5P – RESULTADOS OBTIDOS NOS EUA

### 5.2.1 Incorporação 2D e 3D das nanopartículas

Iniciamos esta parte do estudo identificando se as NP de CaP preparadas conforme o item 4.1.2 seriam internalizadas por células de câncer de próstata C4-2B, uma vez que a expressão de MMP pelas células PC-3 poderia impedir a formação posterior do modelo 3D (Reel *et al.*, 2015). Para preparação das NP de CaP, foi utilizada uma formulação comum de ácido nucleico pequeno marcado com o corante cianina 3 (Cy3).

Após os períodos de 1 h e 4 h de exposição das soluções teste às células, foi possível observar em azul os núcleos celulares marcados pelo corante DAPI e em vermelho as moléculas do ácido nucleico marcadas com Cy3 (Figura 17A), indicando a internalização das NP de CaP com entrega celular do conteúdo de oligonucleotídeos, dependentes de forma, tempo e concentração. A presença de pequenos pontos avermelhados no citoplasma das células expostas às NP de CaP contendo o ácido nucleico (Figura 17B) indica o acúmulo das nanopartículas em endossomos, que após sofrerem endocitose mediada por caltrina e caveolinas (Tobin *et al.*, 2013), realizam o escape endossomal, com liberação do conteúdo no citoplasma celular (Lee *et al.*, 2011; Pittella *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2016). Um aumento de fluorescência do meio contendo as soluções controle pode ser notado devido a artefatos da técnica (Figura 17C), que não são observados nas imagens das células (Figura 17B). Ainda, é possível inferir que a diminuição da fluorescência observada na solução de ácido nucleico\_Cy3 livre, que seria sugestiva de uma maior internalização da molécula (Figura 17C), é na verdade decorrente da degradação do ácido

nucleico livre (Layzer *et al.*, 2004; Bardoliwala *et al.*, 2019), uma vez que observamos apenas uma breve fluorescência no interior das células expostas a esta solução (Figura 17B).

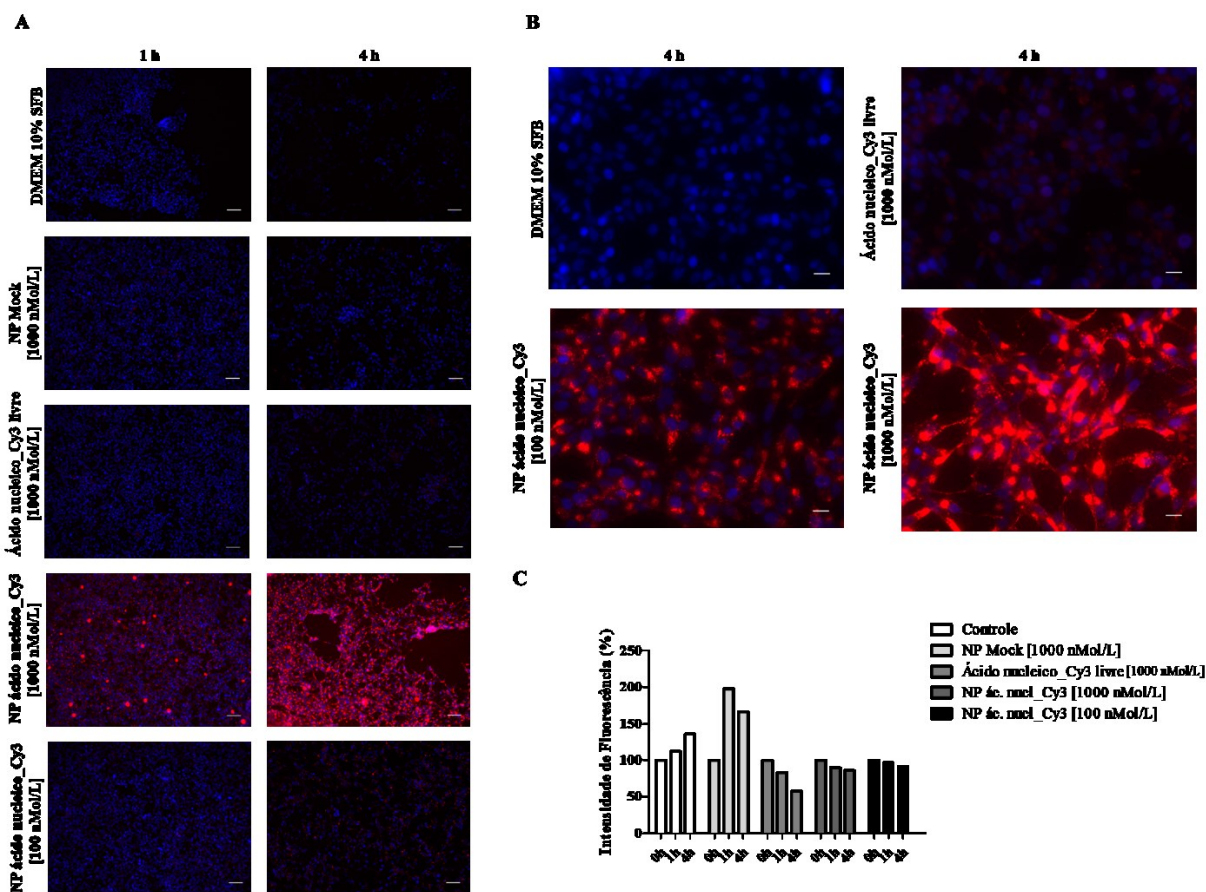
No organismo humano, moléculas de ácido nucleico livre são facilmente degradadas por nucleases do soro e removidas por filtração glomerular, alcançam uma meia vida inferior a 10 min (Van De Water *et al.*, 2006). Além disso, as moléculas livres não são capazes de atravessar de forma passiva as membranas celulares devido aos fatores intrínsecos como alto peso molecular e carga negativa (Wang *et al.*, 2010). Assim, destacamos a importância das NP de CaP para a manutenção da integridade de oligonucleotídeos bem como para a eficiência de entrega às células alvo.

Em seguida, a incorporação dinâmica, também descrita como *live-cell imaging*, das NP de CaP foi realizada para avaliar o efeito nas células por um período prolongado de tempo. Como as células podem sofrer fototoxicidade nesse tipo de experimento devido à constante exposição à luz do microscópio, os poços da placa foram revestidos com colágeno tipo I para favorecer a aderência celular, e não foram utilizados outros corantes, além do Cy3, o que permitiu a viabilidade celular até o final do experimento.

Nas imagens dos tempos iniciais, as células são dificilmente diferenciadas do *background*, que apresenta um tom avermelhado de difícil foco no microscópio devido às NP de CaP ainda flutuantes no meio possuírem tamanho menor que o limite inferior de pixels do microscópio utilizado, mas com o passar das horas e à medida que as nanopartículas vão sendo internalizadas, as células passam a entrar em foco (Figura 18A). Assim como descrito no item anterior para as células fixadas, também foi observada a presença de ácido nucleico\_Cy3 em compartimentos intracelulares sugestivos de corpos endocíticos que possuem um aumento gradual que se torna significativo após 48 h de exposição (Figura 18B).

A internalização de nanocarreadores varia de acordo com a temperatura do ambiente, concentração e composição das estruturas, bem como as células utilizadas. NP de dióxido de silício de 80 nm são intensamente internalizadas durante 3 h de tratamento e então chegam a uma saturação, que é retardada quando são administradas partículas de igual composição com tamanho médio de 30 nm (Halamoda-Kenzaoui *et al.*, 2017).

Figura 17 - Internalização das NP de CaP.

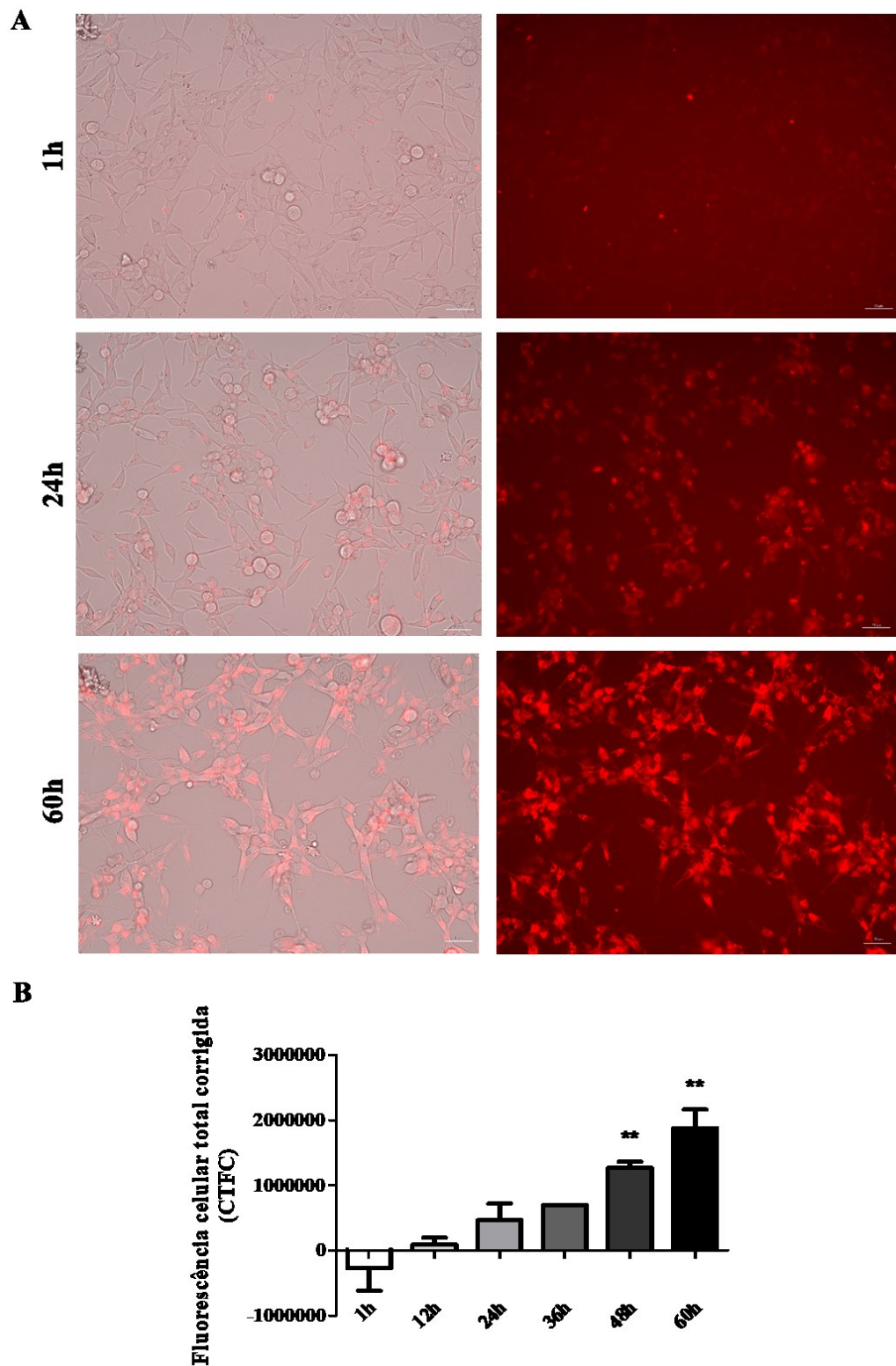


Células C4-2B após exposição às NP de CaP. (A) Células após tratamento com as soluções por 1 h e 4 h. A coloração vermelha é relativa ao corante Cy3 na molécula de ácido nucleico pequeno, e azul ao corante nuclear DAPI. Objetiva 10 ×, barra de escala 100 μm. (B) C4-2B após 4 h de exposição, objetiva de 40 ×, barra de escala 20 μm. (C) Intensidade de fluorescência das soluções antes (0 h), e após exposição às células (1 h e 4 h). Medidas padronizadas para porcentagem relativa ao tempo 0 h.

NP polimerizadas contendo sílica são quase completamente internalizadas após 24 h quando utilizadas na concentração de 24 μg/mL (Bittner *et al.*, 2021), já para NP de CaP contendo FITC-BSA, um aumento de fluorescência relativo à incorporação é crescente até 4 h, e mantém-se constante por 24 h (Gausterer; Schüßler; Gabor, 2021). NP de CaP na concentração de 100 nMol/L podem ser observadas por MET no citoplasma de células granulosa mesmo após 72 h de tratamento (Liu *et al.*, 2010), enquanto NP de CaP com tamanho médio de 50 nm permanecem presentes em células precursoras de osteoblastos após 24 h de tratamento (O'doherty *et al.*, 2020).



Figura 18 - Avaliação da internalização dinâmica das NP de CaP em modelo 2D.



Internalização dinâmica (*live-cell imaging*). (A) Imagens representativas das células C4-2B na presença das NP ácido nucleico\_Cy3 [100 nMol/L]. A coloração vermelha é relativa ao corante Cy3 ligado ao ácido nucleico. Objetiva 20 ×, barra de escala 50 μm. (B) Fluorescência celular total corrigida com os valores de *background* das imagens. O ensaio foi realizado em duplicata, n=1, \*\*P = 0,0039.

Na comparação por *live-cell imaging* da internalização de NP de CaP de 60 nm e Lipofectamina® por células HeLa, é possível identificar a presença de ambas nos citoplasmas celulares após 72 h de incubação. Ainda que a incorporação seja semelhante e as NP de CaP apresentem uma menor eficiência de silenciamento do gene alvo que o vetor comercial, são acompanhadas de uma menor citotoxicidade, sendo descritas pelos autores como o vetor ideal para aplicação *in vivo* (Chernousova; Epple, 2017).

No contexto do CP, nosso estudo corrobora com os dois trabalhos encontrados na literatura utilizando a técnica. NP de CaP utilizadas para incorporação do ácido zoledrônico são observadas de maneira gradual e significativa ao final de 72 h no citoplasma de células de CP, sendo indicadas como menos citotóxicas do que lipossomos e capazes de produzir maior efeito antiproliferativo que o medicamento administrado de forma livre (Schiraldi *et al.*, 2014). A edição gênica por CRISPR também parece ser favorecida por um sistema de NP de CaP, com a liberação do conteúdo de maneira similar a Lipofectamina® 3000 e mais eficiente do que o composto isoladamente ao longo de 12 h, sem causar toxicidade às células PC-3 (Wei *et al.*, 2022).

Para então avaliar o desempenho das NP de CaP na entrega de oligonucleotídeos em modelo 3D de CP, microtumores foram desenvolvidos. Modelos 3D podem ser produzidos por diferentes técnicas, sendo as mais comuns: *hanging drop*, uso de placas com superfície pouco aderentes ou afuniladas, levitação magnética, sistemas microfluídicos, e baseados em *scaffolds* (Foglietta *et al.*, 2020), entretanto todos possuem como principais desafios i) rendimento; ii) uniformidade e reprodutibilidade, e iii) método de avaliação (Han; Kwon; Kim, 2021).

Entre os microtumores de CP já descritos na literatura, os modelos originários da linhagem celular LNCaP apresentam núcleo necrótico após 7 dias de cultivo, indicando que o cultivo prolongado leva à privação de nutrientes nas células, entretanto a região periférica mantém-se proliferativa e com elevada expressão de Ki-67, além de possuírem perfil de expressão de genes semelhante a tumores implantados em camundongos, e diferentes das mesmas células cultivadas em 2D (Takagi *et al.*, 2007). Microtumores monocelulares formados por DU-145 e TRAMP-C1 também apresentam núcleos necróticos e um exterior proliferativo. Além disso, neste estudo os autores foram capazes de identificar que os microtumores apresentam conexões célula-célula, o que os difere de simples agregados celulares (Habra; Pearson; Mcardle, 2023).

A preparação de microtumores com tamanho e morfologia semelhantes para a correta aquisição de resultados foi descrita por Grayson *et al.* (2021) que obtiveram sucesso na padronização ao cultivar as células DU145 e PC-3 em placas de micropoços. No mesmo estudo também avaliaram a sensibilidade dos microtumores isolados e em co-cultura com fibroblastos e FAC em relação a quimioterápicos, demonstrando que o resultado das culturas é semelhante e equiparável. Microtumores em monocultura derivados das linhagens DU145 e PC-3 também foram eficazes como modelos para avaliação da atividade antitumoral da cúrcuma (Boccellino *et al.*, 2022). Microtumores em monocultura com as linhagens LNCaP, C4-2 e C4-2B mostraram-se modelos adequados para avaliação de migração e invasão celular mediados por MMP-7 para presumir a progressão metastática em ossos (Grindel *et al.*, 2018; Tellman *et al.*, 2021). Diante destes achados, o modelo de microtumores foi escolhido para a realização deste estudo através da sementeira das células C4-2B em placas comerciais com micropoços afunilados. Os resultados estão mostrados na Figura 19. Obteve-se um rendimento de cerca de 750 microtumores por processo de sementeira. O objetivo foi estabelecer modelos uniformes e de fácil reprodução com alto rendimento, e uma estrutura que se mantivesse após transferência para demais compartimentos de ensaios funcionais, e que podem ser aprimorados para demais técnicas, como encapsulamento por géis ou estabelecimento de co-culturas.

Após o estabelecimento de microtumores uniformes com tamanho médio de 100  $\mu\text{m}$  formados por cerca de 60 células C4-2B, foi realizado o ensaio de incorporação dinâmica das NP de CaP neste modelo utilizando os mesmos parâmetros do ensaio realizado no modelo 2D (Figura 20). Analisando a parte central dos microtumores e não apenas as células migratórias da extremidade, foi observado que a incorporação de NP ácido nucleico\_Cy3 [100 nMol/L], identificada pela presença de moléculas em tom avermelhado nos compartimentos intracelulares, é gradual, porém ocorre de forma mais lenta que em 2D. Quando comparada ao tempo inicial 0 h, a intensidade de fluorescência é significativa após 60 h de exposição, o que se deve à complexa e intrincada estrutura dos modelos 3D.

A entrega de material genético às células para manipulação gênica encontra desafios especialmente em modelos 3D, ainda que este seja mais condizente com o observado em pacientes, e portanto grande parte dos estudos de internalização são realizados em 2D seguidos de estudos *in vivo* (Sokolova *et al.*, 2019). Os agentes de transfecção comumente utilizados, como Lipofectamina<sup>®</sup>, permitem a entrega do material apenas às células da superfície, da massa tumoral evadindo-se à entrega às células do núcleo do modelo (Sokolova *et al.*, 2019).

Figura 19 - Estabelecimento dos microtumores.

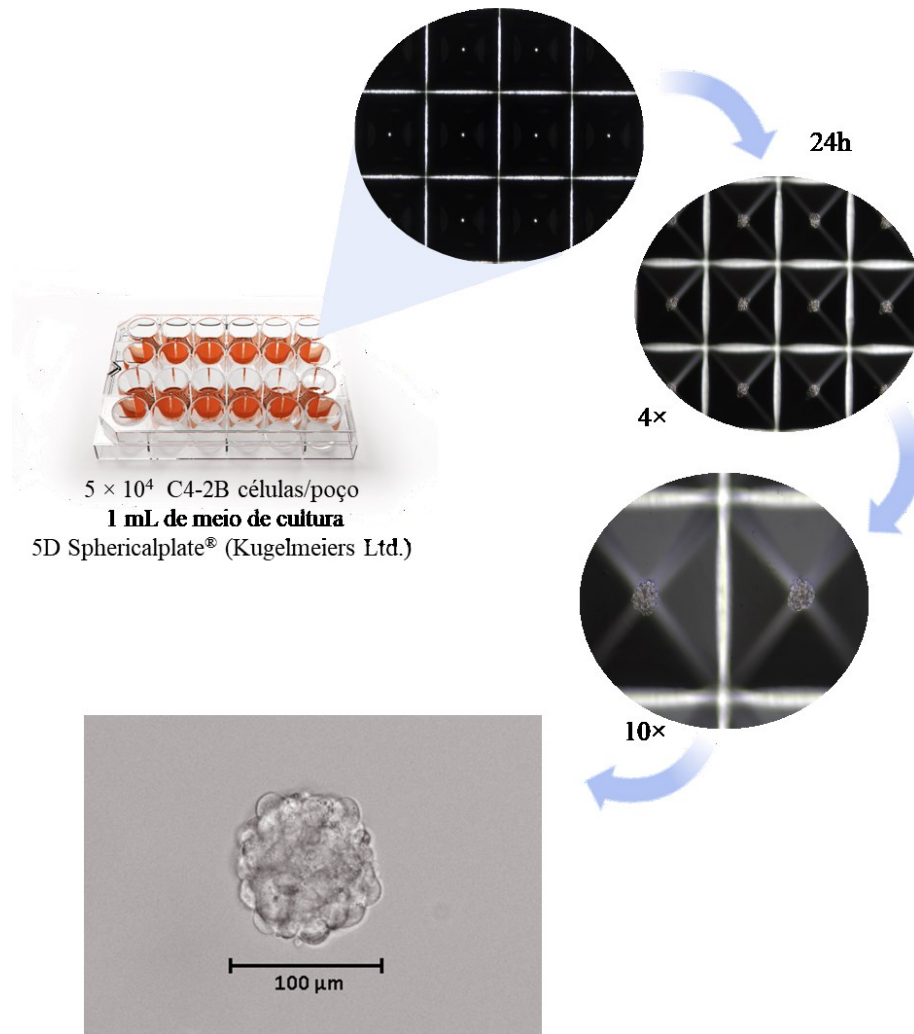
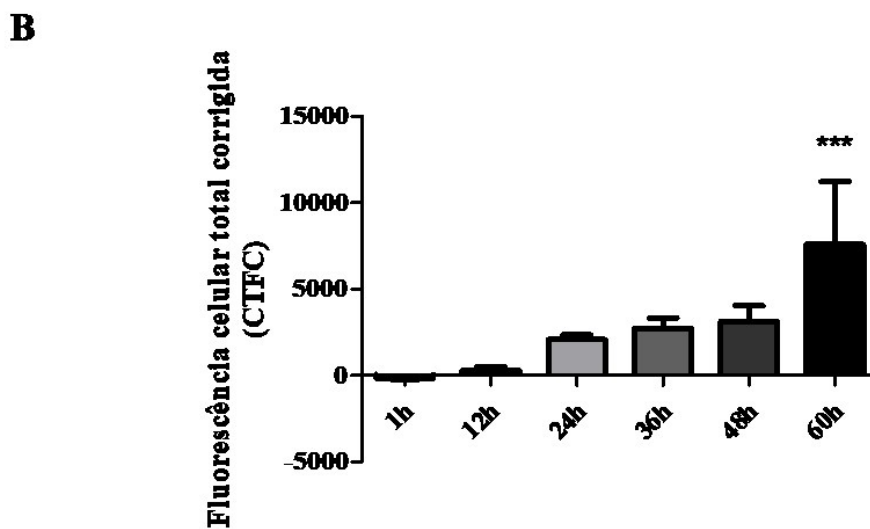
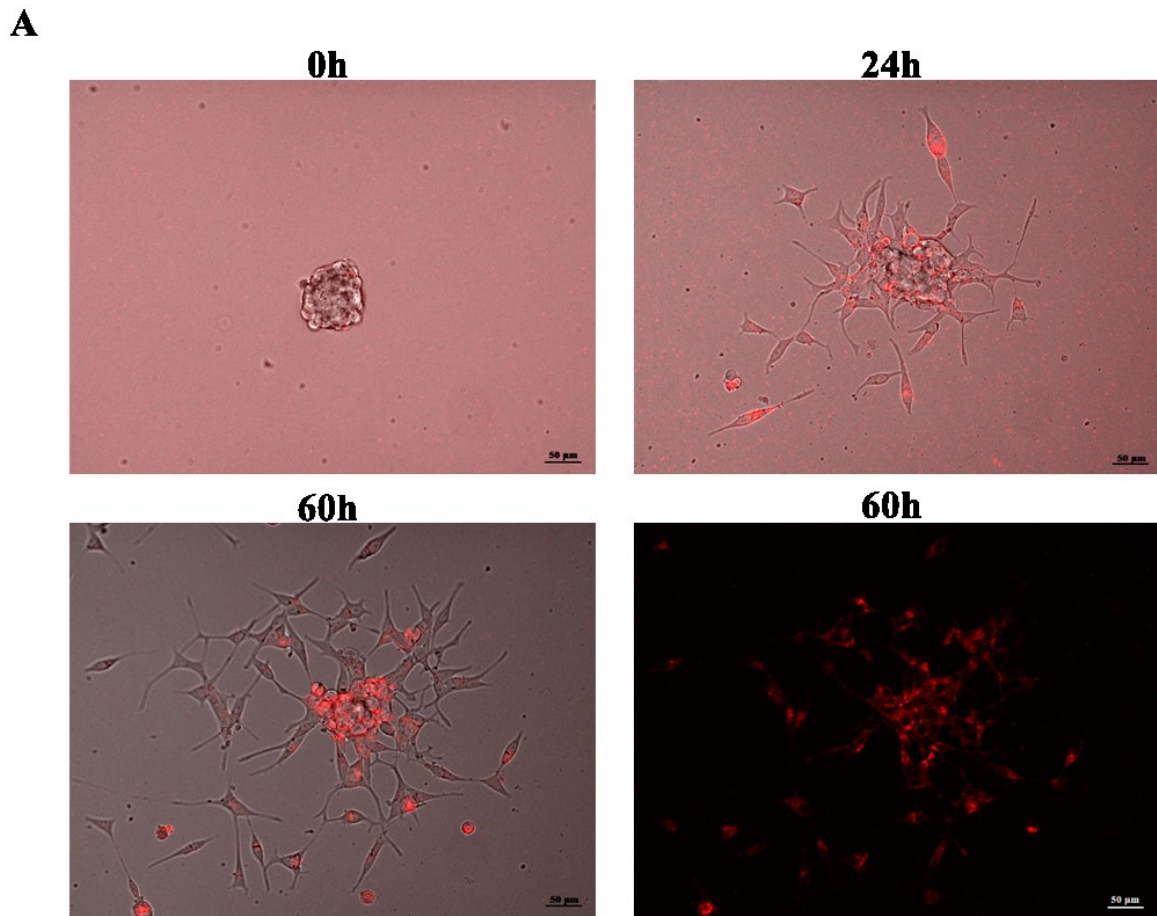


Figura representativa contendo os passos necessários para a formação dos microtumores pela técnica utilizada. Semeadura da linhagem C4-2B em placa com micropoços afunilados com a formação de microtumores uniformes após 24 h de incubação. Imagens de campo claro nas objetivas de 4 × e 10 × em microscópio BZ-X800E.

Sistemas de eletroporação também vêm sendo utilizados para a modulação da expressão gênica em modelos 3D, entretanto, devido às pulsações intrínsecas à técnica apresentam entrega irregular das moléculas (Wasungu *et al.*, 2009; Pelofy *et al.*, 2021; De Caro *et al.*, 2023), destacando a importância do uso de nanocarreadores no modelo.

As NP de CaP podem penetrar nas estruturas 3D devido ao diminuto tamanho, característico materiais nanoestruturados (Sokolova *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2021; Daneshmandi *et al.*, 2022), além de serem favorecidas por um gradiente de transferência de massa realista (Kim, 2005).

Figura 20 - Avaliação da internalização dinâmica das NP de CaP em modelo 3D.



Internalização dinâmica (*live-cell imaging*). (A) Imagens representativas dos microtumores de C4-2B em campo claro e canal Texas Red. Objetiva 20 × no microscópio BZ-X800E, barra de escala 50 μm. (B) Fluorescência celular total corrigida com os valores de *background* das imagens. NP de CaP ácido nucleico\_Cy3 [100 nMol/L]. O ensaio foi realizado em triplicata, n=2, \*\*\*P < 0,001

No presente estudo, observamos a presença de moléculas de ácido nucleico marcadas com Cy3 nas células do interior dos microtumores, indicando a eficiência de entrega do conteúdo pelas NP de CaP em modelos 3D, que pode ser futuramente desafiada com o aumento da complexidade do modelo, com adição de outras linhagens celulares e hidrogéis para a encapsulação do mesmo, retendo as células, tornando-o ainda mais realista.

### 5.2.2 Escolha do miR-224-5p

Uma vez identificada a internalização das NP de CaP por células C4-2B, seguimos para a identificação de um miRNA alvo a ser utilizado nesta linhagem. Para isso, analisamos sequências de miRNA diferencialmente expressas entre as células C4-2B e LNCaP, previamente identificadas pela técnica de Sequenciamento Massivo em Paralelo (SMP).

A linhagem LNCaP (do inglês, *Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) foi estabelecida em 1977 derivada de uma biópsia por aspiração de metástase em linfonodo subclavicular esquerdo de paciente caucasiano de 50 anos de idade com confirmação de CP (Horoszewicz *et al.*, 1980). As células são responsivas a andrógenos, expressam RA e possuem *doubling time* de 60 h (Horoszewicz *et al.*, 1983).

A linhagem C4-2B é derivada de LNCaP. Células LNCaP originais (passagem 29) foram inoculadas nos flancos de camundongos juntamente com MS, uma linhagem humana de fibroblasto ósseo (passagens 25-33). Após 8 semanas, os animais foram castrados por orquiectomia. Os tumores estabelecidos após 4 semanas da castração, deram origem a linhagem C4. Tumores quiméricos de C4 com MS em animais castrados deram origem a linhagem C4-2, linhagem com perfil resistente a castração (Wu *et al.*, 1994). As metástases ósseas, originadas pela administração de células da linhagem C4-2 por injeção subcutânea em camundongos castrados, resultaram em células da linhagem C4-2B (Thalmann *et al.*, 2000).

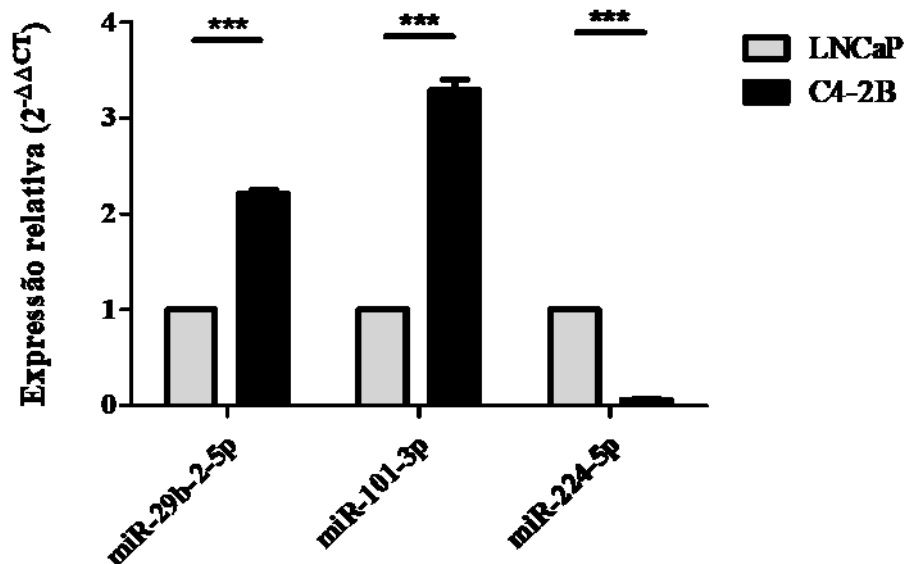
Análises citogenéticas demonstraram que a C4-2B é de fato derivada de LNCaP e possui origem humana. A linhagem possui uma curva de crescimento mais acelerada (*doubling time* 24 – 36 h), maior potencial de formação de colônias e de invasão que LNCaP, bem como tumorigenicidade *in vivo*, e expressa PSA (Thalmann *et al.*, 2000). A análise de transcriptoma das células demonstrou que C4-2B possui 457 genes superexpressos e 246 sub expressos em comparação com LNCaP, sendo estes especialmente relacionados a adesão focal e interação com ECM (Spans *et al.*, 2014). Além disso, quando cultivada em meio de pré-mineralização, a linhagem C4-2B retém até 8 vezes mais cálcio do meio que LNCaP, e adquire um fenótipo de

osteoblasto, com produção de proteínas osso-específicas como ALPL, BMP7, CBFA1, OPG e RANKL. Estas propriedades das células tumorais contribuem para o componente osteoblástico que caracteriza as respectivas lesões metastáticas esqueléticas (Lin *et al.*, 2001). Ainda, C4-2B expressa VEGF de forma mais significativa que LNCaP (Yang, L. *et al.*, 2012) bem como RA, RUNX2, e genes relacionados à sinalização Wnt, e não expressa PTEN (Lim *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Kothari *et al.*, 2019).

O estabelecimento de C4-2B a partir de LNCaP é um processo tido como um modelo ideal para avaliação de progressão tumoral, uma vez que permite o acompanhamento das células responsivas a andrógenos e pouco oncogênicas a um perfil de resistência à castração e com desenvolvimento de metástases ósseas, tal como ocorre em muitos pacientes com doença avançada (Spans *et al.*, 2014).

A análise da composição de miRNA nas células C4-2B e LNCaP resultou em 19 diferencialmente expressos entre as linhagens (Tabela 8). Destes 19 miRNA, os miR-29b-2-5p, miR-101-3p, e miR-224-5p foram selecionados, de acordo com avaliação dos genes alvo experimentalmente validados e relacionados à regulação da metástase óssea, para a validação da respectiva expressão por RT-qPCR (Figura 21).

Figura 21 - Expressão de miRNA entre as linhagens C4-2B e LNCaP.



Expressão relativa calculada pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de miRNA diferencialmente expressos entre as linhagens LNCaP e C4-2B, identificados por SMP. Ensaio realizado em triplicada, n= 2, \*\*\*P < 0,001.

Tabela 8 - miRNA diferencialmente expressos entre as linhagens C4-2B e LNCaP.

C4-2B × LNCaP					
miRNA	Regulação	FC	miRNA	Regulação	FC
hsa-miR-222-3p	<i>Down</i>	0,142	hsa-miR-593-5p	<i>Up</i>	8,833
	<i>Down</i>	0,166		<i>Up</i>	6,282
	<i>Down</i>	0,181	hsa-miR-138-5p	<i>Up</i>	4,579
	<i>Down</i>	0,246		<i>Up</i>	4,341
	<i>Down</i>	0,324	hsa-miR-7-5p	<i>Up</i>	4,081
	<i>Down</i>	0,154		<i>Up</i>	3,393
	<i>Down</i>	0,440	hsa-miR-345-5p	<i>Up</i>	4,128
hsa-miR-221-3p	<i>Down</i>	0,166		<i>Up</i>	4,714
	<i>Down</i>	0,151	<i>Up</i>	3,103	
	<i>Down</i>	0,278	hsa-miR-30a-5p	<i>Up</i>	3,172
	<i>Down</i>	0,160	hsa-miR-101-3p	<i>Up</i>	3,091
	<i>Down</i>	0,232	hsa-miR-361-5p	<i>Up</i>	3,000
	<i>Down</i>	0,236	hsa-miR-103a-2-5p	<i>Up</i>	2,818
	<i>Down</i>	0,419	hsa-miR-200c-3p	<i>Up</i>	2,679
	<i>Down</i>	0,417	hsa-miR-200b-3p	<i>Up</i>	2,176
	<i>Down</i>	0,201	hsa-miR-425-5p	<i>Up</i>	2,655
	hsa-miR-224-5p	<i>Down</i>	0,288	hsa-miR-200b-3p	<i>Up</i>
hsa-miR-4521				<i>Up</i>	2,306
hsa-miR-17-5p	<i>Down</i>	0,452	hsa-miR-29b-2-5p	<i>Up</i>	2,097
			hsa-miR-99-5p	<i>Up</i>	2,107
			hsa-let-7b-5p	<i>Up</i>	2,134

O miR-29b-2-5p, elevado em aproximadamente 2 vezes na C4-2B em relação à LNCaP, é relacionado a um bom prognóstico de pacientes com adenocarcinoma pancreático ductal, e *in vitro* inibe a proliferação celular, com aumento da parada do ciclo celular e apoptose devido a expressão de p53 (Li *et al.*, 2018). A superexpressão do miR-29 inibe a EMT e angiogênese em células de câncer coloretal (Leng *et al.*, 2021). A depleção do miR-29b em FAC está associada a ativação de p38-*STAT1* em células de câncer de mama e aumento da proliferação, invasão, e resistência a fármacos (Chou *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017), e já foi descrito como sub expresso



em tecidos tumorais de próstata quando comparados aos respectivos epitélios saudáveis (Walter *et al.*, 2013). O miR-29b parece diminuir a capacidade de invasão de células DU145 e PC-3 por aumentar a expressão de *COL1A1* e *COL3A1* (Ivanovic *et al.*, 2018). A restauração *in vivo* do miR-29b com uma molécula mimética foi capaz de reduzir o crescimento tumoral nos animais devido ao aumento de *BCL2L1* (Sur *et al.*, 2019).

O miR-101-3p, elevado na C4-2B em torno de 3 vezes, é descrito como um supressor tumoral no câncer renal por inibir a invasão celular e metástase através de *EZH2* (Dong *et al.*, 2021), e controlar a expressão de p53 (Park *et al.*, 2022); no adenocarcinoma de pulmão, é capaz de induzir a sensibilidade das células à radiação através de *BIRC5* (Meng *et al.*, 2021); em células de câncer coloretal, é descrito como sub expresso e como capaz de inibir IL6ST, STAT3A/B, e *MYC* (Sastre *et al.*, 2019). Por outro lado, em exossomos circulantes de pacientes, a expressão do miR-101-3p é descrita como elevada em relação à indivíduos controle. A inibição do miRNA em linhagens celulares de câncer coloretal foi capaz de diminuir o crescimento e migração, e sensibilizar tumores em modelos de xenoenxerto para o tratamento (Tao *et al.*, 2021). Em linhagens de câncer de próstata LNCaP e PC-3, o miR-101-3p diminuiu a invasão e proliferação levando as células a apoptose através da sinalização PI3K/AKT/mTOR (Gu *et al.*, 2021). Entretanto o papel ainda incerto do ácido nucleico é descrito por Duca *et al.* (2021), ao identificar o miR-101-3p como superexpresso no plasma e no tecido tumoral dos pacientes, sendo proposto como um biomarcador elevado para diferenciar CP metastático de CP não metastático.

O miR-224-5p é amplamente relacionado à progressão tumoral pela literatura e possui 124 genes validados experimentalmente (Quadro 1), segundo o MiRTarBase versão 9.0 (Huang *et al.*, 2022). Em células de câncer pancreático, promove a proliferação, migração e invasão por inibir PTEN (Peng *et al.*, 2021). Em células de carcinoma hepatocelular, a superexpressão do miR-224-5p é mediada por E2F1 e induz a invasão celular e EMT (Li; Wu; Sun, 2022). A inibição do miRNA em células de câncer renal inibe a proliferação, migração e invasão por regular OCLN (Liu *et al.*, 2022). A expressão do miR-224-5p é relacionada com a resistência à cisplatina em células de câncer de ovário (Zhao *et al.*, 2014), e encontra-se elevada em células e tecidos de câncer de mama (Wang *et al.*, 2021). Ainda, exossomos de câncer de pulmão possuem alta expressão do miR-224-5p, sendo capazes de promover a geração de tumor por ter *RA* como alvo de regulação (Zhou *et al.*, 2021).

Quadro 1 - Genes alvo do miR-224-5p validados experimentalmente

<b>Gene</b>	<b>Referências</b>	<b>Gene</b>	<b>Referências</b>
<i>ABCC1</i>	(Xue <i>et al.</i> , 2013)	<i>LONRF2</i>	(Karginov; Hannon, 2013)
<i>ADAP1</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Lipchina <i>et al.</i> , 2011; Memczak <i>et al.</i> , 2013)	<i>MAP2K2</i>	(Karginov; Hannon, 2013)
<i>AKIRIN1</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011; Whisnant <i>et al.</i> , 2013; Farazi <i>et al.</i> , 2014)	<i>MBD2</i>	(Yuan <i>et al.</i> , 2013)
<i>AP2M1</i>	(Mouillet <i>et al.</i> , 2010)	<i>MED13</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011)
<i>API5</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2008)	<i>MITF</i>	(Xue <i>et al.</i> , 2013)
<i>APLN</i>	(Wan <i>et al.</i> , 2015)	<i>MOCS2</i>	(Chi <i>et al.</i> , 2009)
<i>ARL4D</i>	(Chi <i>et al.</i> , 2009)	<i>MPDU1</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>ARSB</i>	(Helwak <i>et al.</i> , 2013)	<i>MYLIP</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)
<i>ASCC1</i>	(Chi <i>et al.</i> , 2009)	<i>NCOA3</i>	(Farazi <i>et al.</i> , 2014)
<i>BCL2</i>	(Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2013a)	<i>NCOA6</i>	(Mouillet <i>et al.</i> , 2010)
<i>C12orf49</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>NIT1</i>	(Mouillet <i>et al.</i> , 2010)
<i>C17orf82</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)	<i>NPTN</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011)
<i>C8orf46</i>	(Karginov; Hannon, 2013)	<i>NUFIP2</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>CACNG7</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Lipchina <i>et al.</i> , 2011; Memczak <i>et al.</i> , 2013)	<i>PAK2</i>	(Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2013a)
<i>CASP3</i>	(Cui <i>et al.</i> , 2015)	<i>PDGFRB</i>	(Murakami <i>et al.</i> , 2006)
<i>CASP7</i>	(Cui <i>et al.</i> , 2015)	<i>PEBP1</i>	(Huang <i>et al.</i> , 2012; Liu, H. <i>et al.</i> , 2014)
<i>CCND1</i>	(Krell <i>et al.</i> , 2016)	<i>PEL1I</i>	(Karginov; Hannon, 2013)
<i>CD40</i>	(Mees <i>et al.</i> , 2009)	<i>PHLPP1</i>	(Liao <i>et al.</i> , 2013; He <i>et al.</i> , 2015)
<i>CDC42</i>	(Zhu <i>et al.</i> , 2010; Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2013a; Ke <i>et al.</i> , 2014)	<i>PIGO</i>	(Xue <i>et al.</i> , 2013)
<i>CDH1</i>	(Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2013a; Ling <i>et al.</i> , 2016)	<i>PRRG4</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)

<b>Gene</b>	<b>Referências</b>	<b>Gene</b>	<b>Referências</b>
<i>CHAC1</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011)	<i>PSMD3</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>CLDN12</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Memczak <i>et al.</i> , 2013; Farazi <i>et al.</i> , 2014; Hamilton <i>et al.</i> , 2016)	<i>PTX3</i>	(Rudnicki <i>et al.</i> , 2014)
<i>COASY</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>QKI</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011; Memczak <i>et al.</i> , 2013)
<i>COQ7</i>	(Karginov; Hannon, 2013)	<i>RAB15</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011; Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>COX6B1</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011)	<i>RAB9B</i>	(Murakami <i>et al.</i> , 2006)
<i>CSTF2</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>RAC1</i>	(Geng <i>et al.</i> , 2016)
<i>CXCR4</i>	(Zhu <i>et al.</i> , 2010)	<i>RBM3</i>	(Chi <i>et al.</i> , 2009; Karginov; Hannon, 2013)
<i>DIO1</i>	(Boguslawska <i>et al.</i> , 2011)	<i>RPL15</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)
<i>DPYSL2</i>	(Hashimoto; Akiyama; Yuasa, 2013)	<i>SEC14L5</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)
<i>EDNRA</i>	(Hildebrand <i>et al.</i> , 2011)	<i>SERPINE1</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)
<i>EFNA3</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>SERPINF2</i>	(Upraity <i>et al.</i> , 2014)
<i>ENC1</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011)	<i>SLC12A5</i>	(Farazi <i>et al.</i> , 2014)
<i>EYA4</i>	(Hildebrand <i>et al.</i> , 2011)	<i>SLC41A1</i>	(Karginov; Hannon, 2013)
<i>F3</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011; Memczak <i>et al.</i> , 2013; Whisnant <i>et al.</i> , 2013)	<i>SLC46A3</i>	(Farazi <i>et al.</i> , 2014)
<i>F8A2</i>	(Memczak <i>et al.</i> , 2013)	<i>SLC7A14</i>	(Memczak <i>et al.</i> , 2013)
<i>F8A3</i>	(Memczak <i>et al.</i> , 2013)	<i>SMAD4</i>	(Yao <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2013; Ling <i>et al.</i> , 2016)
<i>FAM84B</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)	<i>STARD5</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)
<i>FEM1B</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011)	<i>TADA2B</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>FOSB</i>	(Mouillet <i>et al.</i> , 2010)	<i>TCEAL1</i>	(Olaru <i>et al.</i> , 2013)
<i>GABARAPL3</i>	(Karginov; Hannon, 2013)	<i>TIAL1</i>	(Karginov; Hannon, 2013)

<b>Gene</b>	<b>Referências</b>	<b>Gene</b>	<b>Referências</b>
<i>GALNT1</i>	(Gottwein <i>et al.</i> , 2011)	<i>TMTC3</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>GIGYF1</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)	<i>TNRC6A</i>	(Farazi <i>et al.</i> , 2014)
<i>GNB4</i>	(Karginov; Hannon, 2013)	<i>TOMIL2</i>	(Majoros <i>et al.</i> , 2013)
<i>GORAB</i>	(Karginov; Hannon, 2013)	<i>TOMM20</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011; Lipchina <i>et al.</i> , 2011)
<i>GRPEL2</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>TPR</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)
<i>HIPK3</i>	(Chi <i>et al.</i> , 2009)	<i>TRIB1</i>	(Lin, Z.-Y. <i>et al.</i> , 2014)
<i>HNRNPC</i>	(Farazi <i>et al.</i> , 2014; Hamilton <i>et al.</i> , 2016)	<i>TXNIP</i>	(Memczak <i>et al.</i> , 2013; Hamilton <i>et al.</i> , 2016)
<i>HNRNPF</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>USP6NL</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>HOXB3</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011; Memczak <i>et al.</i> , 2013)	<i>WRN</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>HOXD10</i>	(Li <i>et al.</i> , 2014)	<i>XPO1</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Kishore <i>et al.</i> , 2011)
<i>HSP90AA1</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010; Memczak <i>et al.</i> , 2013; Krell <i>et al.</i> , 2016)	<i>YES1</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)
<i>IGF1R</i>	(Hafner <i>et al.</i> , 2010)	<i>ZKSCAN8</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>IL20RB</i>	(Chi <i>et al.</i> , 2009)	<i>ZNF135</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)
<i>ITGB3BP</i>	(Lipchina <i>et al.</i> , 2011)	<i>ZNF207</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011)
<i>KBTBD8</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011; Memczak <i>et al.</i> , 2013)	<i>ZNF573</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013)
<i>KCTD2</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011; Farazi <i>et al.</i> , 2014)	<i>ZNF585B</i>	(Kishore <i>et al.</i> , 2011)
<i>KDELRI</i>	(Xue <i>et al.</i> , 2013)	<i>ZWINT</i>	(Whisnant <i>et al.</i> , 2013; Hamilton <i>et al.</i> , 2016)
<i>KLK1</i>	(White <i>et al.</i> , 2010)		
<i>KLK10</i>	(White <i>et al.</i> , 2010)		
<i>KRAS</i>	(Hashimoto; Akiyama; Yuasa, 2013)		
<i>KRT74</i>	(Karginov; Hannon, 2013)		
<i>LHFPL2</i>	(Karginov; Hannon, 2013)		

Em relação ao CP, há poucos estudos de função com o miR-224-5p. Um estudo *in silico* propôs que a sub expressão do miR-224-5p seria associada à progressão tumoral devido a regulação de *UAPI*, *HK2*, *CHIT1*, *TOP2A*, *ACLY* e *RRM2* (Gan *et al.*, 2018). Outros dois estudos descrevem o miR-224 como sub expresso em amostras de tecido tumoral vs tecido saudável de pacientes (Mavridis; Stravodimos; Scorilas, 2013; Lin, Z. Y. *et al.*, 2014).

No presente estudo, identificamos que a linhagem C4-2B possui expressão de miR-224-5p cerca de 20 vezes reduzida em relação à expressão em LNCaP, e portanto, foi o escolhido como alvo para esta parte experimental. Entre os alvos já validados experimentalmente, encontra-se *CDHI*, gene codificador para produção de E-caderina. A transfecção de 10 nMol/L de um inibidor de miR-224-5p foi capaz de aumentar a expressão de *CDHI*, depois de 48h de incubação, em células Huh7 (Zhang, Y. *et al.*, 2013b). Xenoenxertos de células A549 com superexpressão do miR-224-5p possuem tamanho e massa significativamente maiores que os controles, bem como menor expressão de E-caderina (Zhou *et al.*, 2021), e o uso de miR-224-5p antagomiR produz tumores *in vivo* menores que os controles (Wu *et al.*, 2022).

O gene codificador *CDHI* está localizado no cromossomo 16q22.1 e é considerado um supressor tumoral, uma vez que E-caderina assiste a adesão celular para a formação de tecidos organizados sem motilidade individual das células, quando está complexada com cateninas. Em 1992, E-caderina já fora descrita como diminuída em amostras de metástases em comparação com amostras de tumores de CP primários (Umbas *et al.*, 1992). É interessante relatar que níveis de expressão mais altos são encontrados no centro dos tumores, com uma perda nas regiões periféricas, onde as células estão preparando-se para invadir os tecidos adjacentes (Kuniyasu *et al.*, 2000). A promoção da expressão de E-caderina com uso de moléculas sintéticas, previne EMT e diminui invasão celular de células C4-2B e expressão de Slug, Snail, e  $\beta$ -catenina (Deep *et al.*, 2011).

Alterações genéticas ou epigenéticas na sinalização da E-caderina estão associadas à perda da adesão célula-célula e à estrutura celular, interações estromais aberrantes, EMT e consequentemente, oncogênese e metástase (Shenoy, 2019). A deleção de E-caderina em células epiteliais prostáticas de ratos é suficiente para induzir a neoplasia intraepitelial prostática, devido ao aumento de  $\beta$ -catenina livre e indução dependente de andrógenos da proliferação celular (Olson *et al.*, 2019).

O complexo E-caderina/ $\beta$ -catenina tem papel fundamental na manutenção da integridade epitelial, mas também está relacionado à sinalização Wnt.  $\beta$ -catenina é um

regulador chave na sinalização canônica Wnt, ao se translocar, pela ligação à diversos cofatores, do citoplasma para o núcleo, age como ativador de fatores de transcrição que resultam em um subconjunto de efeitos celulares envolvendo adesão celular, morfogênese tecidual, e desenvolvimento tumoral (Clevers, 2006; Grigoryan *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2011).

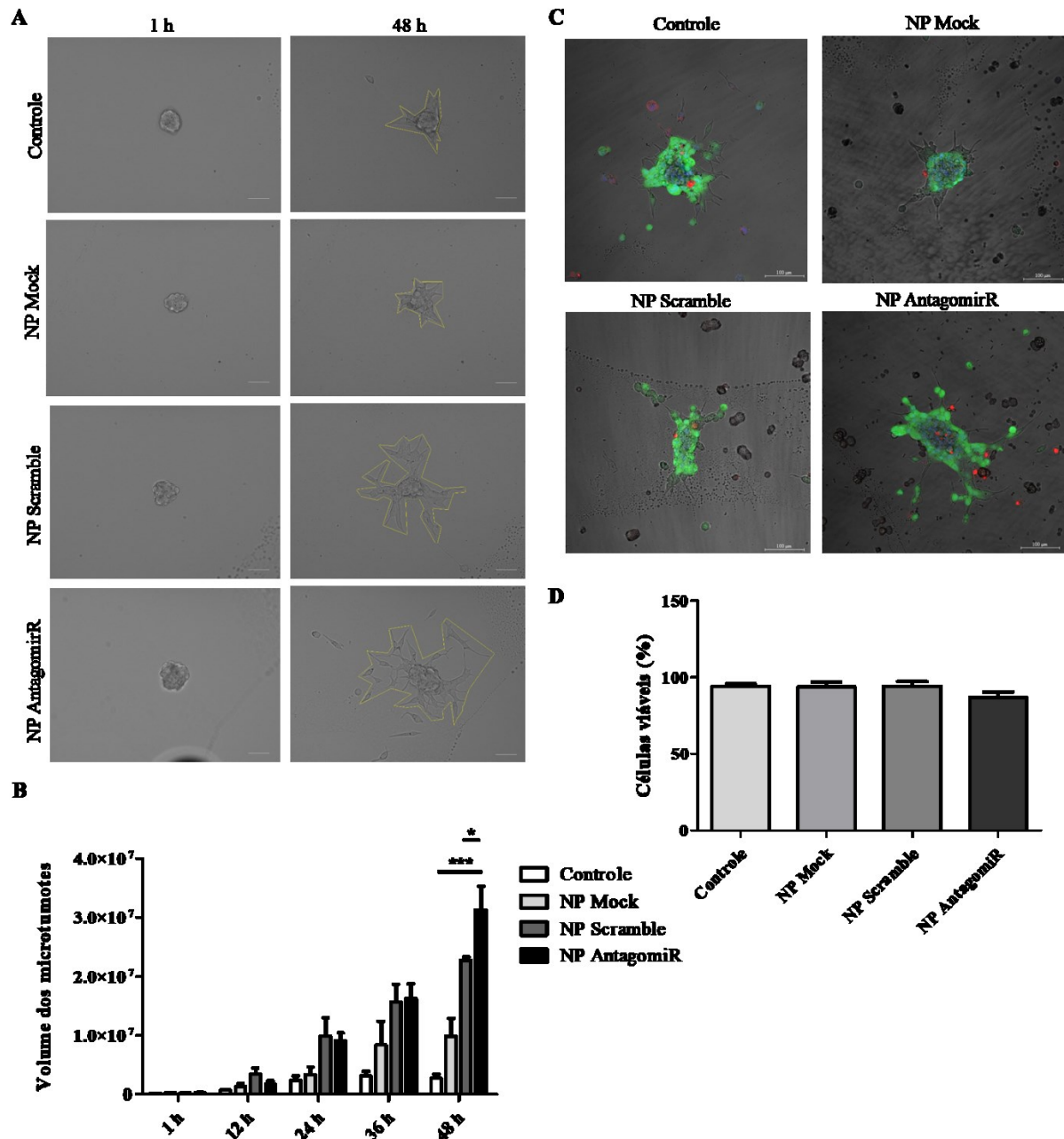
Desordens na expressão de  $\beta$ -catenina são associadas à diversos tipos de câncer (Arend *et al.*, 2013; Tian; He; Lei, 2014; Chiurillo, 2015; Yun *et al.*, 2020). No CP, estudos correlacionam a baixa expressão de  $\beta$ -catenina com um pior prognóstico de CP localizados (Aaltomaa *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2023), entretanto, é observado um aumento na expressão com a progressão para resistência a andrógenos e metástases (De La Taille *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Schweizer *et al.*, 2008; Wang; Chen; Xu, 2021).

Assim, considerando o papel dual mas essencial de E-caderina e  $\beta$ -catenina nas junções celulares e para formação de modelos 3D, a regulação do gene codificador *CDH1* por miR-224-5p encontrado neste trabalho, e na possível ação durante a progressão do CP para um estágio metastático já sugerido na literatura, decidimos investigar o efeito no tamanho, na viabilidade celular, e na regulação da expressão proteica em microtumores de C4-2B após a consistente inibição do miRNA com a respectiva molécula inibidora entregue por NP de CaP. Esta análise visa confirmar os efeitos sugeridos pelo baixo teor de miR-224-5p nas células.

### 5.2.3 Estudos funcionais

As NP de CaP contendo a molécula inibidora do miR-224-5p (NP AntagomiR) foram preparadas conforme descrito no item 4.1.2 e adicionadas aos microtumores previamente preparados e acondicionados sob colágeno tipo I. O acondicionamento em colágeno visa evitar o descolamento dos microtumores. Assim, iniciou-se a aquisição de imagens realizadas durante 48 h. Ao final do tempo de incubação, as mesmas amostras foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular (Figura 22).

Figura 22 - Atividade funcional das NP de CaP em modelo 3D.



Ensaio funcional de microtumores de C4-2B expostos às NP de CaP [100 nMol/L]. (A) Avaliação dinâmica (*live-cell imaging*) do tamanho dos microtumores ao longo de 48 h, imagens representativas em campo claro. Objetiva 20 × no microscópio BZ-X800E, barra de escala 50 μm. (B) Medida do volume dos microtumores, através da relação do eixo X e Y, vs Controle \*\*\*P < 0,001, vs NP Scramble \* P < 0,05, ensaio realizado em quadruplicata n=1. (C) Microtumores expostos a [100 nMol/L] de NP de CaP por 48 h e então corados com calceína AM para identificação de células com atividade das enzimas entearases em verde, consideradas como células viáveis, e com homodímero de etídio 1 em vermelho, relativa às células não viáveis com perda da integridade da membrana plasmática. Imagens de microscópio confocal e multifóton, barra de escala de 100 μm. (D) Porcentagem de células viáveis relativas ao número total de células identificadas em cada microtumor, ensaio realizado em triplicata n=1.

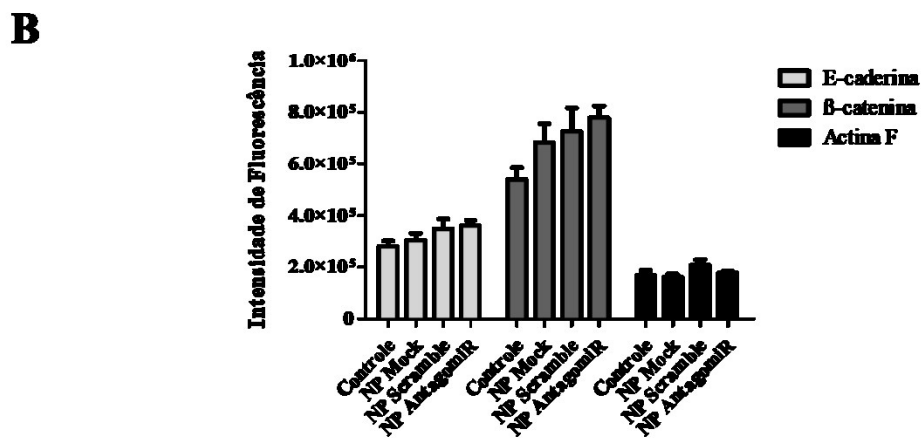
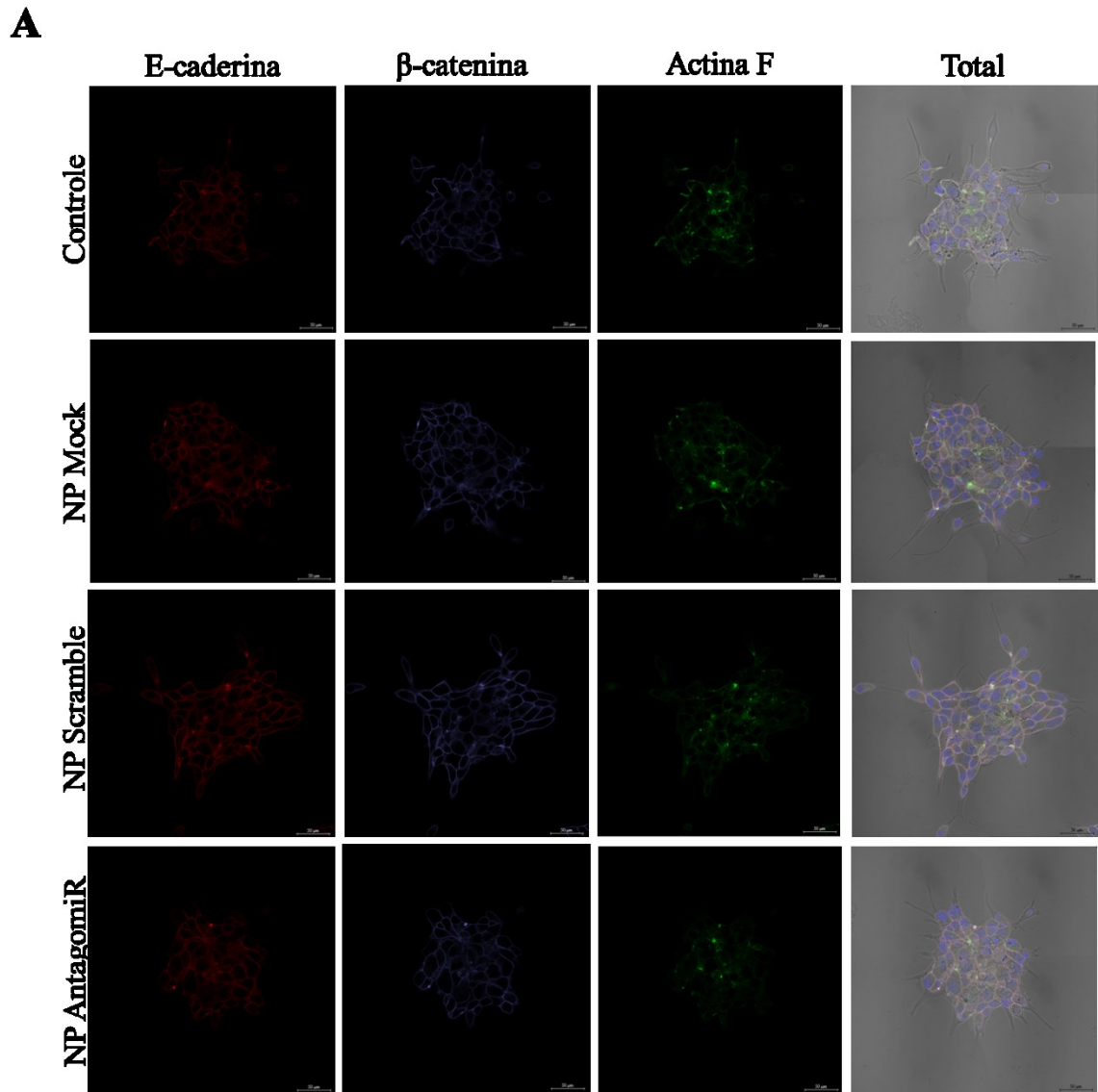
A inibição do miR-224-5p através das NP AntagomiR resultou em microtumores maiores e menos compactos, relativos a uma maior migração, além de não causar toxicidade significativa às células. Para realização dos ensaios com os microtumores, estes não foram encapsulados, conforme descrito por Tellman *et al.* (2021), afim de não impedirmos a penetração das NP de CaP e para que a migração espontânea das estruturas pudesse ser observada, contudo, desta forma é possível que algumas células com maior capacidade migratória tenham movimentando-se para fora do campo ou mesclando-se com os microtumores vizinhos, assim, priorizamos a medida apenas de células diretamente ligadas ao núcleo dos microtumores, conforme demonstrado pela Figura 22A. Além disso, por serem estruturas 3D de considerável dimensão vertical, observamos perdas celulares durante o procedimento de coloração devido a agitação do meio no qual os microtumores estavam inseridos.

A vantagem da organização espacial e interações entre as células deste modelo, também pode ser um desafio (Chipangura *et al.*, 2023). No presente estudo, observamos que apesar de obtermos rendimento, uniformidade, e reprodutibilidade adequadas durante a preparação dos microtumores, estes podem adquirir comportamento mais variável ao longo do período de incubação em diferentes condições, ao qual relacionamos com diversas razões, como: a densidade celular exata de cada microtumor; a distância e comunicação com outros microtumores; a heterogeneidade na distribuição das camadas de células necróticas, quiescentes, e proliferativas nas estruturas; além da necessidade de técnicas e *softwares* atualizados e acessíveis para a correta avaliação deste tipo de organização (Han; Kwon; Kim, 2021). Ainda que as técnicas possam ser aprimoradas, foi possível observar o efeito significativo decorrente das NP AntagomiR no modelo desenvolvido.

Por fim, buscamos compreender como a molécula inibidora do miR-224-5p entregue pelas NP de CaP agiria na expressão de E-caderina e  $\beta$ -catenina através da metodologia de imunofluorescência indireta, utilizando actina F como padrão. Através deste ensaio, não identificamos uma alteração significativa na expressão de E-caderina, entretanto detectamos uma tendência ao aumento de  $\beta$ -catenina nos microtumores tratados com NP de CaP, especialmente condizente com a inibição do miR-224-5p (Figura 23).



Figura 23 - Expressão de proteínas alvo do miR-224-5p em modelo 3D.

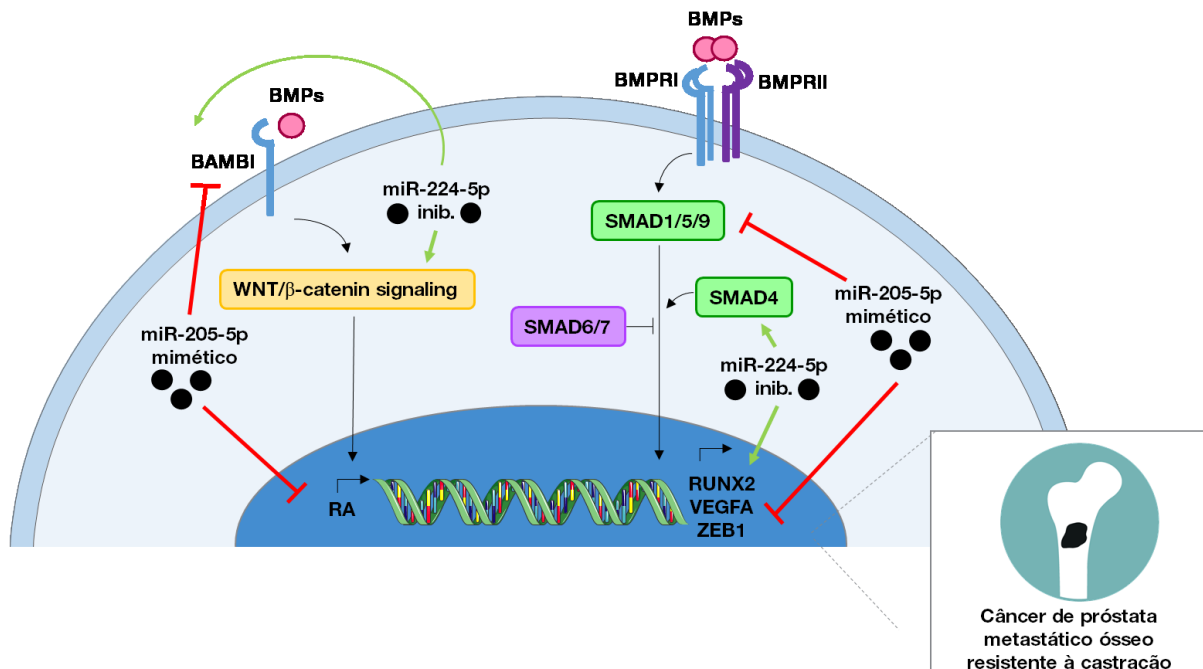


Análise da expressão de proteínas pelo ensaio de imunofluorescência indireta. (A) Imagens de microscopia confocal multifotons dos microtumores da linhagem C4-2B expostos às NP de CaP [100 nMol/L] por 48 h. Anticorpos para E-

caderina (cor vermelha),  $\beta$ -catenina (lilás), actina F (verde), e DAPI (azul). Objetiva de  $60\times$ , barra de escala  $50\ \mu\text{m}$ .  
 (B) Intensidade total de fluorescência medida pelo *software* ImageJ, ensaio realizado em quadruplicada,  $n=1$ .

No presente estudo, não observamos a diminuição de E-caderina pela modulação do miR-224-5p conforme descrito pela literatura (Zhang, Y. *et al.*, 2013b; Zheng *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022). Todavia, a tendência ao aumento da expressão de  $\beta$ -catenina foi condizente com estruturas 3D maiores, menos compactas e mais migratórias. Uma vez que o miR-224-5p tem como alvo o *RA* em células de câncer de pulmão (Zhou *et al.*, 2021), cuja inibição promove a ativação da expressão de SMAD4 e RUNX2 com indução da osteogênese (Cai *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2023), sugerimos que no CP metastático ósseo, aqui representado por microtumores da linhagem C4-2B, a inibição do miR-224-5p simula um ambiente de castração hormonal. Esta condição induz à provável redução da expressão do *RA*, resultando em um aumento da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Esta sinalização pode incluir a ativação de *BAMBI* e induzir a osteogênese. Assim corroboramos a nossa hipótese levantada durante a modulação do miR-205-5p, conforme rede proposta na Figura 24, e justificamos a elevada expressão do miRNA em células LNCaP, que possuem caráter menos agressivo e não relacionadas à metástase óssea.

Figura 24 - Representação esquemática das hipóteses deste estudo.



Vias afetadas pela modulação da expressão do miR-205-5p, através de molécula mimética, e do miR-224-5p através de molécula inibidora, por NP de CaP, na sinalização para a progressão tumoral, resistência a andrógenos, e metástase óssea. *RA* – Receptor de andrógenos, *BAMBI* - do inglês, *BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor*,

BMPs - do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*, BMPR - do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins Receptors*, SMADs - do inglês, *Mothers Against Decapentaplegic Homolog Family*, RUNX2 - do inglês, *RUNX Family Transcription Factor 2*, VEGFA - do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor A*, ZEB1 - do inglês, *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*.

Os miRNA têm papel fundamental na regulação gênica. No entanto, a distribuição e expressão dos mesmos não é uniforme entre os tipos celulares, com a maioria apresentando padrões de expressão únicos e alguns até sendo expressos apenas em populações celulares raras (Aboobaker *et al.*, 2005; Landgraf *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012). Esta característica torna-os alvos para estudos como biomarcadores e agentes terapêuticos, entretanto, conforme evidenciado neste estudo, o mesmo miRNA descrito como oncogênico em um estágio tumoral, pode ser descrito como supressor tumoral em outro estágio, dentro da mesma doença. Assim, ressaltamos a importância de uma literatura extensa e bem fundamentada a respeito das moléculas, com a qual acreditamos contribuir com o presente estudo, afim de que possamos contar com sistemas que garantam a segurança da terapia relacionada à modulação gênica e personalizada em aplicações clínicas.

Ademais, com os resultados aqui descritos, destacamos a biocompatibilidade e a eficiência de entrega de miRNA pelo nanocarreador proposto, gerando efeitos significativos nas células alvos em 2D e 3D, sendo o primeiro estudo de nosso conhecimento a utilizar NP de CaP para modulação dos miR-205-5p e miR-224-5p, contribuindo para a robustez da pesquisa de terapia molecular por miRNA no câncer de próstata.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pontuam-se as seguintes conclusões:

- Os miR-205-5p e miR-224-5p foram identificados através de análises de bioinformática após ensaio de microarranjo e SMP respectivamente, com expressão diminuída em linhagens de câncer de próstata metastático ósseo;
- Microtumores de uma linhagem de câncer de próstata metastático ósseo foram desenvolvidos;
- Nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio foram preparadas contendo as moléculas referentes aos miRNA de interesse;
- As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, carga superficial, morfologia, estabilidade, e capacidade de encapsulação de miRNA;
- As nanopartículas foram significativamente incorporadas pelas células alvo e pelos microtumores, e são capazes de promover a modulação da expressão dos miRNA sem causar toxicidade;
- Através da restauração do miR-205-5p nas células alvo, observamos a diminuição da viabilidade celular, bem como a inibição de genes alvo relacionados à progressão tumoral e metástase óssea;
- Através da inibição do miR-224-5p nos microtumores para evidenciar a respectiva sinalização, um ambiente de castração hormonal mimético foi estabelecido, e consequentemente, foram observadas estruturas maiores e com maior potencial para migração, além de uma tendência de aumento da expressão da proteína alvo envolvida na sinalização para metástases;
- Estabelecemos uma rede de sinalizações envolvidas no câncer de próstata metastático ósseo;

Assim, é possível pensar neste trabalho como o início da prospecção de um vetor não viral, biodegradável e biocompatível para a entrega de RNAs de interferência à modelos bidimensionais e tridimensionais de cultura celular, especialmente àqueles voltados a pesquisa em câncer, devido ao tamanho ideal de partícula para acumulação em tumores sólidos pelo efeito EPR. Além disso, ampliamos o conhecimento a respeito dos miRNA citados e das vias de sinalização mediados pelos ácidos nucleicos, identificando-os como importantes supressores tumorais na metástase óssea, afim de corroborar para o avanço em novos biomarcadores e

terapias que impactem significativamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos pelo câncer de próstata.

## 7 PERSPECTIVAS

Tem-se como perspectivas deste trabalho:

- Avaliação da expressão proteica por Western Blot de RA, BAMBI, SMAD1/5/9, VEGFA e ZEB1 em células PC-3 após exposição às NP miR-205;
- Estabelecimento dos modelos de microtumores de C4-2B no Brasil;
- Modulação e confirmação da expressão do miR-224-5p por RT-qPCR nas células C4-2B e microtumores após exposição às NP miR-224 mimético e NP AntagomiR com uma variação na concentração de miRNA utilizado, considerando o tratamento do modelo 3D;
- Avaliação da expressão gênica de *CDHI* e *CTNNB1* por RT-qPCR nas células C4-2B e microtumores após exposição às NP miR-224 mimético e NP AntagomiR.

## REFERÊNCIAS

- AALTOMAA, S. *et al.* Reduced alpha- and beta-catenin expression predicts shortened survival in local prostate cancer. **Anticancer Res**, 25, n. 6C, p. 4707-4712, 2005.
- ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. Molecular genetics of prostate cancer. **Genes Dev**, 14, n. 19, p. 2410-2434, 2000.
- ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. Mouse models of prostate carcinogenesis. **Trends Genet**, 18, n. 5, p. S1-5, 2002.
- ABIDA, W. *et al.* Rucaparib for the Treatment of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Associated with a DNA Damage Repair Gene Alteration: Final Results from the Phase 2 TRITON2 Study. **Eur Urol**, 2023.
- ABOUBAKER, A. A. *et al.* Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 50, p. 18017-18022, 2005.
- AGARWAL, V. *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, 4, 2015.
- AL-BARI, A. A.; AL MAMUN, A. Current advances in regulation of bone homeostasis. **FASEB Bioadv**, 2, n. 11, p. 668-679, 2020.
- ALEKSANDER, S. A. *et al.* The Gene Ontology knowledgebase in 2023. **Genetics**, 224, n. 1, 2023.
- ALEXANDER, N. R. *et al.* N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. **Cancer Res**, 66, n. 7, p. 3365-3369, 2006.
- ALGHANDOUR, R. *et al.* Repurposing metformin as anticancer drug: Randomized controlled trial in advanced prostate cancer (MANSMED). **Urol Oncol**, 39, n. 12, p. 831.e831-831.e810, 2021.
- AMBROS, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, 9, n. 3, p. 277-279, 2003.
- AMIR, S. *et al.* Oncomir miR-125b suppresses p14(ARF) to modulate p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e61064, 2013.
- ARAMI, H. *et al.* In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. **Chem Soc Rev**, 44, n. 23, p. 8576-8607, 2015.
- AREND, R. C. *et al.* The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer: a review. **Gynecol Oncol**, 131, n. 3, p. 772-779, 2013.
- ARORA, S. *et al.* Synthesis, characterization, and evaluation of poly (D,L-lactide-co-glycolide)-based nanoformulation of miRNA-150: potential implications for pancreatic cancer therapy. **Int J Nanomedicine**, 9, p. 2933-2942, 2014.

ARRIGHETTI, N.; BERETTA, G. L. miRNA as Therapeutic Tools and Biomarkers for Prostate Cancer. **Pharmaceutics**, 13, n. 3, 2021.

ASHBURNER, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet**, 25, n. 1, p. 25-29, 2000.

ATAT, O. E. *et al.* 3D modeling in cancer studies. **Hum Cell**, 35, n. 1, p. 23-36, 2022.

BAADE, P. D.; YOULDEN, D. R.; KRNJACKI, L. J. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. **Mol Nutr Food Res**, 53, n. 2, p. 171-184, 2009.

BACA, S. C. *et al.* Punctuated evolution of prostate cancer genomes. **Cell**, 153, n. 3, p. 666-677, 2013.

BAGUR, R.; HAJNÓCZKY, G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> sensing: role in calcium homeostasis and signaling. **Mol Cell**, 66, n. 6, p. 780-788, 2017.

BAI, S. *et al.* MCP mediated active targeting calcium phosphate hybrid nanoparticles for the treatment of orthotopic drug-resistant colon cancer. **J Nanobiotechnology**, 19, n. 1, p. 367, 2021.

BAKER, M. E. Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. **J Endocrinol**, 175, n. 1, p. 121-127, 2002.

BALDESSARI, C. *et al.* Bone Metastases and Health in Prostate Cancer: From Pathophysiology to Clinical Implications. **Cancers (Basel)**, 15, n. 5, 2023.

BANSAL, D. *et al.* Immunotherapy and Immunotherapy Combinations in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Cancers (Basel)**, 13, n. 2, 2021.

BAO, H. *et al.* Effects of nanoparticle size on antitumor activity of 10-hydroxycamptothecin-conjugated gold nanoparticles: in vitro and in vivo studies. **Int J Nanomedicine**, 11, p. 929-940, 2016.

BARBIERI, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. **Nat Genet**, 44, n. 6, p. 685-689, 2012.

BARDOLIWALA, D. *et al.* Nanocarriers in effective pulmonary delivery of siRNA: current approaches and challenges. **Ther Deliv**, 10, n. 5, p. 311-332, 2019.

BARTEL, David P. MicroRNAs. **Cell**, 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BEG, M. S. *et al.* Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. **Invest New Drugs**, 35, n. 2, p. 180-188, 2017.

BELLUCCI, D. *et al.* A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 33, n. 3, p. 1091-1101, 2013.

BELTRAN, H. *et al.* Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. **Cancer Discov**, 1, n. 6, p. 487-495, 2011.

BELTRAN, H. *et al.* Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 20, n. 11, p. 2846-2850, 2014.

BENDER, R. J.; MAC GABHANN, F. Dysregulation of the vascular endothelial growth factor and semaphorin ligand-receptor families in prostate cancer metastasis. **BMC Syst Biol**, 9, p. 55, 2015.

BHATNAGAR, N. *et al.* Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. **Cell Death Dis**, 1, p. e105, 2010.

BITTNER, A. *et al.* Time-Dependent Internalization of Polymer-Coated Silica Nanoparticles in Brain Endothelial Cells and Morphological and Functional Effects on the Blood-Brain Barrier. **Int J Mol Sci**, 22, n. 4, 2021.

BLACKBURN, J. *et al.* TMPRSS2-ERG fusions linked to prostate cancer racial health disparities: A focus on Africa. **Prostate**, 79, n. 10, p. 1191-1196, 2019.

BLUMENTHAL, N. C.; BETTS, F.; POSNER, A. S. Formation and structure of Ca-deficient hydroxyapatite. **Calcif Tissue Int**, 33, n. 2, p. 111-117, 1981.

BOCCCELLINO, M. *et al.* The Role of Curcumin in Prostate Cancer Cells and Derived Spheroids. **Cancers (Basel)**, 14, n. 14, 2022.

BOGUSLAWSKA, J. *et al.* MiR-224 targets the 3' UTR of type 1 5'-iodothyronine deiodinase possibly contributing to tissue hypothyroidism in renal cancer. **PLoS One**, 6, n. 9, p. e24541, 2011.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. **Acta Biomater**, 8, n. 4, p. 1401-1421, 2012.

BOVERHOF, D. R. *et al.* Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regul Toxicol Pharmacol**, 73, n. 1, p. 137-150, 2015.

BRASIL. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata - Relatório de Recomendações. Brasília, DF, Brasil: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias – CONITEC, Ministério da Saúde - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da diretoria de Autorização e Registro Sanitários/Gerência-Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos - Resolução RE Nº 2.812, de 10 de outubro de 2018. 2018.

BRASIL. Abiraterona para câncer de próstata metastático resistente à castração em pacientes com uso prévio de quimioterapia - Relatório de Recomendações. Brasília, DF, Brasil: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias – CONITEC, Ministério da Saúde - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos 2019.



BRASIL. Denosumabe e teriparatida para o tratamento indivíduos com osteoporose grave e falha terapêutica aos medicamentos disponíveis no Sistema Único de Saúde. Relatório de Recomendação. Brasília, DF, Brasil: Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias – CONITEC, Ministério da Saúde - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos 2022.

BRASIL. Estimativa 2023 - Incidência de Câncer no Brasil. Brasília, DF, Brasil: Instituto Nacional de Câncer - INCA. Ministério da Saúde - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos 2023.

BRASIL DA COSTA, F. H. *et al.* SULF1 suppresses Wnt3A-driven growth of bone metastatic prostate cancer in perlecan-modified 3D cancer-stroma-macrophage triculture models. **PLoS One**, 15, n. 5, p. e0230354, 2020.

BUBENDORF, Lukas *et al.* Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. **Human Pathology**, 31, n. 5, p. 578-583, 2000.

BUDD, W. T. *et al.* Dual action of miR-125b as a tumor suppressor and oncomir-22 promotes prostate cancer tumorigensis. **PLoS One**, 10, n. 11, p. e0142373, 2015.

BUYOUNOUSKI, M. K. *et al.* Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA Cancer J Clin**, 67, n. 3, p. 245-253, 2017.

CAI, Q. *et al.* MicroRNA-224 enhances the osteoblastic differentiation of hMSCs via Rac1. **Cell Biochem Funct**, 37, n. 2, p. 62-71, 2019.

CAI, Y. *et al.* A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, 7, n. 4, p. 147-154, 2009.

CALIN, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

CAO, W. *et al.* Circ0001429 regulates progression of bladder cancer through binding miR-205-5p and promoting VEGFA expression. **Cancer Biomark**, 25, n. 1, p. 101-113, 2019.

CAO, Y. *et al.* Reciprocal effect of microRNA-224 on osteogenesis and adipogenesis in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. **Bone**, 145, p. 115844, 2021.

CAPLEN, N. J. *et al.* Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 17, p. 9742-9747, 2001.

CHAKRABORTY, C. *et al.* Therapeutic advances of miRNA: A preclinical and clinical update. **J Adv Res**, 28, p. 127-138, 2021.

CHAN, S. C.; DEHM, S. M. Constitutive activity of the androgen receptor. **Adv Pharmacol**, 70, p. 327-366, 2014.

CHANG, R.; GULLEY, J. L.; FONG, L. Vaccinating against cancer: getting to prime time. **J Immunother Cancer**, 11, n. 6, 2023.

CHEEVER, M. A.; HIGANO, C. S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. **Clin Cancer Res**, 17, n. 11, p. 3520-3526, 2011.

CHEN, G. *et al.* Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. **Cancer**, 101, n. 6, p. 1345-1356, 2004.

CHEN, H. C. *et al.* Effects of particle size on toll-like receptor 9-mediated cytokine profiles. **Biomaterials**, 32, n. 6, p. 1731-1737, 2011.

CHEN, Y.; WANG, X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. **Nucleic Acids Res**, 48, n. D1, p. D127-D131, 2020.

CHERNOUSOVA, S.; EPPLE, M. Live-cell imaging to compare the transfection and gene silencing efficiency of calcium phosphate nanoparticles and a liposomal transfection agent. **Gene Ther**, 24, n. 5, p. 282-289, 2017.

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

CHIPANGURA, J. K. *et al.* A review of challenges and prospects of 3D cell-based culture models used for studying drug induced liver injury during early phases of drug development. **Hum Exp Toxicol**, 42, p. 9603271221147884, 2023.

CHIURILLO, M. A. Role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. **World J Exp Med**, 5, n. 2, p. 84-102, 2015.

CHOI, H. S. *et al.* Renal clearance of quantum dots. **Nat Biotechnol**, 25, n. 10, p. 1165-1170, 2007.

CHOU, J. *et al.* GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. **Nat Cell Biol**, 15, n. 2, p. 201-213, 2013.

CHU, W. *et al.* Improving plasma stability and bioavailability *in vivo* of gemcitabine via nanoparticles of mPEG-PLG-GEM complexed with calcium phosphate. **Pharm Res**, 35, n. 12, p. 230, 2018.

CIRIELLO, G. *et al.* Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. **Nat Genet**, 45, n. 10, p. 1127-1133, 2013.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**, 127, n. 3, p. 469-480, 2006.

COLAO, A. *et al.* Prolactin and prostate hypertrophy: a pilot observational, prospective, case-control study in men with prolactinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 89, n. 6, p. 2770-2775, 2004.

COOK, L. M. *et al.* Integrating new discoveries into the "vicious cycle" paradigm of prostate to bone metastases. **Cancer Metastasis Rev**, 33, n. 2-3, p. 511-525, 2014.

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

CUI, R. *et al.* MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7. **Oncotarget**, 6, n. 26, p. 21802-21815, 2015.

DAI, Y. *et al.* Copy number gain of ZEB1 mediates a double-negative feedback loop with miR-33a-5p that regulates EMT and bone metastasis of prostate cancer dependent on TGF- $\beta$  signaling. **Theranostics**, 9, n. 21, p. 6063-6079, 2019.

DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, 10, n. 2, p. 57-74, 2018.

DANESHMANDI, L. *et al.* Ultra-low binder content 3D printed calcium phosphate graphene scaffolds as resorbable, osteoinductive matrices that support bone formation in vivo. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 6960, 2022.

DASGUPTA, I.; CHATTERJEE, A. Recent Advances in miRNA Delivery Systems. **Methods Protoc**, 4, n. 1, 2021.

DE BONO, J. *et al.* Olaparib for metastatic castration-resistant prostate cancer. **N Engl J Med**, 382, n. 22, p. 2091-2102, 2020.

DE BONO, J. S. *et al.* Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. **N Engl J Med**, 364, n. 21, p. 1995-2005, 2011.

DE CARO, A. *et al.* Gene Electrotransfer Efficiency in 2D and 3D Cancer Cell Models Using Different Electroporation Protocols: A Comparative Study. **Pharmaceutics**, 15, n. 3, 2023.

DE COLA, A. *et al.* MiR-205-5p inhibition by locked nucleic acids impairs metastatic potential of breast cancer cells. **Cell Death Dis**, 9, n. 8, p. 821, 2018.

DE LA TAILLE, A. *et al.* Beta-catenin-related anomalies in apoptosis-resistant and hormone-refractory prostate cancer cells. **Clin Cancer Res**, 9, n. 5, p. 1801-1807, 2003.

DE MELLO, L. J. *et al.* Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. **Nanotechnology**, 28, n. 17, p. 175101, 2017.

DEB, S. *et al.* Characterization of precursor-dependent steroidogenesis in human prostate cancer models. **Cancers (Basel)**, 10, n. 10, 2018.

DEEP, G. *et al.* Role of E-cadherin in antimigratory and antiinvasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells. **Cancer Prev Res (Phila)**, 4, n. 8, p. 1222-1232, 2011.

DEHM, S. M. *et al.* Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. **Cancer Res**, 68, n. 13, p. 5469-5477, 2008.

DELAHUNT, B. *et al.* Gleason grading: past, present and future. **Histopathology**, 60, n. 1, p. 75-86, 2012.

DIEHL, R. *et al.* Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. **Cell Mol Immunol**, 14, n. 2, p. 146-179, 2017.

DING, S. *et al.* MiR-224-5p inhibits osteoblast differentiation and impairs bone formation by targeting Runx2 and Sp7. **Cytotechnology**, 75, n. 6, p. 505-516, 2023.

DO AMARAL, A. E. *et al.* Circulating miRNA in nontumoral liver diseases. **Pharmacol Res**, 128, p. 274-287, 2018.

DOBROVOLSKAIA, M. A. *et al.* Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. **Nanomedicine**, 5, n. 2, p. 106-117, 2009.

DONAHUE, N. D.; ACAR, H.; WILHELM, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Adv Drug Deliv Rev**, 143, p. 68-96, 2019.

DONG, Y. *et al.* miR-101-3p Serves as a Tumor Suppressor for Renal Cell Carcinoma and Inhibits Its Invasion and Metastasis by Targeting EZH2. **Biomed Res Int**, 2021, p. 9950749, 2021.

DOROZHKIN, S. V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. **Acta Biomater**, 6, n. 3, p. 715-734, 2010.

DUCA, R. B. *et al.* MiR-19b-3p and miR-101-3p as potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. **Am J Cancer Res**, 11, n. 6, p. 2802-2820, 2021.

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

EL BEZAWY, R. *et al.* miR-205 enhances radiation sensitivity of prostate cancer cells by impairing DNA damage repair through PKC $\epsilon$  and ZEB1 inhibition. **J Exp Clin Cancer Res**, 38, n. 1, p. 51, 2019.

EL DIKA, I. *et al.* An Open-Label, Multicenter, Phase I, Dose Escalation Study with Phase II Expansion Cohort to Determine the Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Antitumor Activity of Intravenous TKM-080301 in Subjects with Advanced Hepatocellular Carcinoma. **Oncologist**, 24, n. 6, p. 747-e218, 2019.

ELBASHIR, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

ELGAMAL, O. A. *et al.* Tumor suppressive function of mir-205 in breast cancer is linked to HMGB3 regulation. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e76402, 2013.

EMBERTON, M. *et al.* Progression of benign prostatic hyperplasia: systematic review of the placebo arms of clinical trials. **BJU Int**, 102, n. 8, p. 981-986, 2008.

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. **Am J Surg Pathol**, 40, n. 2, p. 244-252, 2016.

ESPOSITO, M.; GUISE, T.; KANG, Y. The Biology of Bone Metastasis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 8, n. 6, 2018.

EUA. The Drug Development Process. US Food and Drug Administration - FDA. 2018.

EZPONDA, T. *et al.* The histone methyltransferase MMSET/WHSC1 activates TWIST1 to promote an epithelial-mesenchymal transition and invasive properties of prostate cancer. **Oncogene**, 32, n. 23, p. 2882-2890, 2013.

FAN, Y.; WANG, K. miR-205 suppresses cell migration, invasion and EMT of colon cancer by targeting mouse double minute 4. **Mol Med Rep**, 22, n. 2, p. 633-642, 2020.

FARAZI, T. A. *et al.* Identification of distinct miRNA target regulation between breast cancer molecular subtypes using AGO2-PAR-CLIP and patient datasets. **Genome Biol**, 15, n. 1, p. R9, 2014.

FARINA, N. H. *et al.* A microRNA/Runx1/Runx2 network regulates prostate tumor progression from onset to adenocarcinoma in TRAMP mice. **Oncotarget**, 7, n. 43, p. 70462-70474, 2016.

FDA. **Drug Approval Package: Onpattro (patisiran)**. 2018. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/210922orig1s000toc.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922orig1s000toc.cfm). Acesso em: 20 jan 2024.

FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **Int J Cancer**, 2021.

FERRARI, E.; GANDELLINI, P. Unveiling the ups and downs of miR-205 in physiology and cancer: transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **Cell Death Dis**, 11, n. 11, p. 980, 2020.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FOGLIETTA, F. *et al.* Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. **Life Sci**, 254, p. 117784, 2020.

FOLLENZI, A.; SANTAMBROGIO, L.; ANNONI, A. Immune responses to lentiviral vectors. **Curr Gene Ther**, 7, n. 5, p. 306-315, 2007.

FRAGNI, M. *et al.* Abiraterone acetate exerts a cytotoxic effect in human prostate cancer cell lines. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 392, n. 6, p. 729-742, 2019.

FRASER, M. *et al.* Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. **Nature**, 541, n. 7637, p. 359-364, 2017.

FREITAS, Chrysantha; MULLER, Rainer H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. 168, n. 2, p. 221 - 229, 1998.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, 7, p. 5577-5591, 2012.

FUJITA, Y. *et al.* MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. **J Biol Chem**, 285, n. 25, p. 19076-19084, 2010.

GALBRAITH, S. M.; DUCHESNE, G. M. Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. **Eur J Cancer**, 33, n. 4, p. 545-554, 1997.

GAMBOA, J. M.; LEONG, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, 65, n. 6, p. 800-810, 2013.

GAN, B. L. *et al.* Downregulation of miR-224-5p in prostate cancer and its relevant molecular mechanism via TCGA, GEO database and in silico analyses. **Oncol Rep**, 40, n. 6, p. 3171-3188, 2018.

GANDAGLIA, G. *et al.* Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. **Prostate**, 74, n. 2, p. 210-216, 2014.

GANDELLINI, P. *et al.* miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. **Cancer Res**, 69, n. 6, p. 2287-2295, 2009.

GANDELLINI, P. *et al.* miR-205 hinders the malignant interplay between prostate cancer cells and associated fibroblasts. **Antioxid Redox Signal**, 20, n. 7, p. 1045-1059, 2014.

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

GANJU, A. *et al.* miRNA nanotherapeutics for cancer. **Drug Discov Today**, 22, n. 2, p. 424-432, 2017.

GAO, X. *et al.* Matrix STIFFNESS-UPREGULATED MicroRNA-17-5p attenuates the intervention effects of metformin on HCC invasion and metastasis by targeting the PTEN/PI3K/Akt pathway. **Front Oncol**, 10, p. 1563, 2020.

GAUSTERER, J. C.; SCHÜßLER, C.; GABOR, F. The impact of calcium phosphate on FITC-BSA loading of sonochemically prepared PLGA nanoparticles for inner ear drug delivery elucidated by two different fluorimetric quantification methods. **Ultrason Sonochem**, 79, p. 105783, 2021.

GE, C. *et al.* Role of Runx2 phosphorylation in prostate cancer and association with metastatic disease. **Oncogene**, 35, n. 3, p. 366-376, 2016.

- GENG, S. *et al.* Retracted: Micro RNA-224 promotes the sensitivity of osteosarcoma cells to cisplatin by targeting Rac1. **Journal of cellular and molecular medicine**, 20, n. 9, p. 1611-1619, 2016.
- GHOSH, S. *et al.* Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. **J Cell Physiol**, 204, n. 2, p. 522-531, 2005.
- GIANNONI, E. *et al.* Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. **Cancer Res**, 70, n. 17, p. 6945-6956, 2010.
- GOMEZ-VEIGA, F. *et al.* Advances in prevention and treatment of bone metastases in prostate cancer. Role of RANK/RANKL inhibition. **Actas Urol Esp**, 37, n. 5, p. 292-304, 2013.
- GOTTWEIN, E. *et al.* Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines. **Cell host & microbe**, 10, n. 5, p. 515-526, 2011.
- GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, 52, n. 2, p. 456-467, 1973.
- GRASSO, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. **Nature**, 487, n. 7406, p. 239-243, 2012.
- GRAYSON, K. A. *et al.* Overcoming TRAIL-resistance by sensitizing prostate cancer 3D spheroids with taxanes. **PLoS One**, 16, n. 3, p. e0246733, 2021.
- GREGORY, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nat Cell Biol**, 10, n. 5, p. 593-601, 2008.
- GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA Registry. **Nucleic Acids Res**, 32, n. Database issue, p. D109-111, 2004.
- GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res**, 34, n. Database issue, p. D140-144, 2006.
- GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res**, 36, n. Database issue, p. D154-158, 2008.
- GRIGORYAN, T. *et al.* Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. **Genes Dev**, 22, n. 17, p. 2308-2341, 2008.
- GRINDEL, B. J. *et al.* Matrilysin/MMP-7 Cleavage of Perlecan/HSPG2 Complexed with Semaphorin 3A Supports FAK-Mediated Stromal Invasion by Prostate Cancer Cells. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 7262, 2018.
- GU, Z. *et al.* Inhibition of MicroRNA miR-101-3p on prostate cancer progression by regulating Cullin 4B (CUL4B) and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways. **Bioengineered**, 12, n. 1, p. 4719-4735, 2021.

GULEI, D. *et al.* The silent healer: miR-205-5p up-regulation inhibits epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells by indirectly up-regulating E-cadherin expression. **Cell Death Dis**, 9, n. 2, p. 66, 2018.

GUO, H. *et al.* ONECUT2 is a driver of neuroendocrine prostate cancer. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 278, 2019.

GUO, S. *et al.* Tuning the size, shape and structure of RNA nanoparticles for favorable cancer targeting and immunostimulation. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, 12, n. 1, p. e1582, 2020.

GURBUZ, V. *et al.* miR-148a, miR-152 and miR-200b promote prostate cancer metastasis by targeting DNMT1 and PTEN expression. **Oncol Lett**, 22, n. 5, p. 805, 2021.

GUSTAFSON, H. H. *et al.* Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. **Nano Today**, 10, n. 4, p. 487-510, 2015.

HABANJAR, O. *et al.* 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. **Int J Mol Sci**, 22, n. 22, 2021.

HABRA, K.; PEARSON, J. R. D.; MCARDLE, S. E. B. Robust formation of optimal single spheroids towards cost-effective in vitro three-dimensional tumor models. **FEBS Open Bio**, 13, n. 7, p. 1266-1277, 2023.

HAFNER, M. *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. **Cell**, 141, n. 1, p. 129-141, 2010.

HALAMODA-KENZAOU, B. *et al.* The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation. **J Nanobiotechnology**, 15, n. 1, p. 48, 2017.

HAMILTON, M.P. *et al.* The landscape of microRNA targeting in prostate cancer defined by AGO-PAR-CLIP. **Neoplasia**, 18, n. 6, p. 356-370, 2016.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell Int**, 21, n. 1, p. 152, 2021.

HAO, L. *et al.* Nucleic acid-gold nanoparticle conjugates as mimics of microRNA. **Small**, 7, n. 22, p. 3158-3162, 2011.

HARRISON, Ross G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 4, n. 1, p. 140 - 143, 1906.

HASHIMOTO, Y.; AKIYAMA, Y.; YUASA, Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. **PLoS One**, 8, n. 5, p. e62589, 2013.

HASSAN, M. *et al.* MicroRNA-122 mimic/microRNA-221 inhibitor combination as a novel therapeutic tool against hepatocellular carcinoma. **Noncoding RNA Res**, 8, n. 1, p. 126-134, 2023.



HAUSSER, J. *et al.* Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation. **Mol Syst Biol**, 9, p. 711, 2013.

HAYASHI, M. *et al.* Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as a vaccine adjuvant. **Vaccine**, 34, n. 3, p. 306-312, 2016.

HAYES, J. H.; BARRY, M. J. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. **JAMA**, 311, n. 11, p. 1143-1149, 2014.

HE, P. *et al.* High phosphate actively induces cytotoxicity by rewiring pro-survival and pro-apoptotic signaling networks in HEK293 and HeLa cells. **FASEB J**, 35, n. 1, p. e20997, 2021.

HE, W. *et al.* Correlations between serum levels of microRNA-148a-3p and microRNA-485-5p and the progression and recurrence of prostate cancer. **BMC Urol**, 22, n. 1, p. 195, 2022.

HE, X. C. *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. **Nat Genet**, 36, n. 10, p. 1117-1121, 2004.

HE, X. *et al.* Expression and role of oncogenic miRNA-224 in esophageal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, 15, p. 1-12, 2015.

HELWAK, A. *et al.* Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. **Cell**, 153, n. 3, p. 654-665, 2013.

HIERONYMUS, H. *et al.* Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 30, p. 11139-11144, 2014.

HILDEBRAND, J. *et al.* A comprehensive analysis of microRNA expression during human keratinocyte differentiation in vitro and in vivo. **Journal of investigative dermatology**, 131, n. 1, p. 20-29, 2011.

HOANG, N. T. D. *et al.* BMP and activin membrane-bound inhibitor regulate connective tissue growth factor controlling mesothelioma cell proliferation. **BMC Cancer**, 22, n. 1, p. 984, 2022.

HODGSON, M. C. *et al.* The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. **J Biol Chem**, 280, n. 8, p. 6511-6519, 2005.

HOFFMANN, O. I. *et al.* Impact of the spheroid model complexity on drug response. **J Biotechnol**, 205, p. 14-23, 2015.

HONEGGER, P. Overview of cell and tissue culture techniques. **Curr Protoc Pharmacol**, Chapter 12, p. Unit12.11, 2001.

HONG, D. S. *et al.* Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. **Br J Cancer**, 122, n. 11, p. 1630-1637, 2020.

HOROSZEWICZ, J. S. *et al.* The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. **Prog Clin Biol Res**, 37, p. 115-132, 1980.

HOROSZEWICZ, J. S. *et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Res**, 43, n. 4, p. 1809-1818, 1983.

HOWARD, N. *et al.* New developments in mechanisms of prostate cancer progression. **Semin Cancer Biol**, 57, p. 111-116, 2019.

HU, C. D.; CHOO, R.; HUANG, J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. **Front Oncol**, 5, p. 90, 2015.

HUANG, H. Y. *et al.* miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. **Nucleic Acids Res**, 50, n. D1, p. D222-D230, 2022.

HUANG, J. *et al.* A polymer-calcium phosphate nanocapsule for RNAi-induced oxidative stress and cascaded chemotherapy. **J Control Release**, 340, p. 259-270, 2021.

HUANG, L. *et al.* MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 425, n. 2, p. 127-133, 2012.

HULF, T. *et al.* Epigenetic-induced repression of microRNA-205 is associated with MED1 activation and a poorer prognosis in localized prostate cancer. **Oncogene**, 32, n. 23, p. 2891-2899, 2013.

IAFISCO, M. *et al.* Fluoride-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles as a promising biomimetic material for dental remineralization. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 17016, 2018.

IBARROLA-VILLAVA, M.; CERVANTES, A.; BARDELLI, A. Preclinical models for precision oncology. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, 1870, n. 2, p. 239-246, 2018.

ILIC, D. *et al.* Screening for prostate cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD004720, 2013.

ILLE, F. *et al.* Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. **Dev Biol**, 304, n. 1, p. 394-408, 2007.

IMAMURA, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncol Rep**, 33, n. 4, p. 1837-1843, 2015.

IMANGALI, N. *et al.* Functionalized calcium phosphate nanoparticles to direct osteoprotegerin to bone lesion sites in a medaka. **Front. Endocrinol**, 14, p. 1101758, 2023.

IONESCU, A. C. *et al.* Dental tissue remineralization by bioactive calcium phosphate nanoparticles formulations. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 5994, 2022.

IORIO, M. V. *et al.* microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. **Cancer Res**, 69, n. 6, p. 2195-2200, 2009.

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

ISMAIL, M.; GOMELLA, L. G. Ultrasound for prostate imaging and biopsy. **Curr Opin Urol**, 11, n. 5, p. 471-477, 2001.

IVANOV, D. P.; GRABOWSKA, A. M. Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. **Sci Rep**, 7, p. 41160, 2017.

IVANOVIC, R. F. *et al.* miR-29b enhances prostate cancer cell invasion independently of MMP-2 expression. **Cancer Cell Int**, 18, p. 18, 2018.

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

JAROSŁAWSKI, S.; TOUMI, M. Sipuleucel-T (Provenge®)-Autopsy of an Innovative Paradigm Change in Cancer Treatment: Why a Single-Product Biotech Company Failed to Capitalize on its Breakthrough Invention. **BioDrugs**, 29, n. 5, p. 301-307, 2015.

JASINSKI, D. L. *et al.* Hydrophobic effect from conjugated chemicals or drugs on *in vivo* biodistribution of RNA nanoparticles. **Hum Gene Ther**, 29, n. 1, p. 77-86, 2018.

JENSEN, M. M. *et al.* Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. **BMC Med Imaging**, 8, p. 16, 2008.

JEONG, D. H. *et al.* Parallel analysis of RNA ends enhances global investigation of microRNAs and target RNAs of *Brachypodium distachyon*. **Genome Biol**, 14, n. 12, p. R145, 2013.

JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **Prostate**, 3, n. 1, p. 81-97, 1982.

JIANG, W. *et al.* Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nat Nanotechnol**, 3, n. 3, p. 145-150, 2008.

JIANG, Y.; LODGE, T. P.; REINEKE, T. M. Packaging pDNA by polymeric ABC micelles simultaneously achieves colloidal stability and structural control. **J Am Chem Soc**, 140, n. 35, p. 11101-11111, 2018.

JIN, H. Y. *et al.* Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. **Front Genet**, 6, p. 340, 2015.

JORALEMON, M. J.; MCRAE, S.; EMRICK, T. PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems. **Chem Commun (Camb)**, 46, n. 9, p. 1377-1393, 2010.

JUNG, H. *et al.* Long chain microRNA conjugates in calcium phosphate nanoparticles for efficient formulation and delivery. **Arch Pharm Res**, 38, n. 5, p. 705-715, 2015.

JUNG, S. J. *et al.* Clinical Significance of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling and Androgen Receptor Expression in Prostate Cancer. **World J Mens Health**, 31, n. 1, p. 36-46, 2013.

KAIGHN, M. E. *et al.* Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Invest Urol**, 17, n. 1, p. 16-23, 1979.

KAKIZAWA, Y.; FURUKAWA, S.; KATAOKA, K. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **J Control Release**, 97, n. 2, p. 345-356, 2004.

KALINKOVA, L. *et al.* miR-205-5p Downregulation and ZEB1 Upregulation Characterize the Disseminated Tumor Cells in Patients with Invasive Ductal Breast Cancer. **Int J Mol Sci**, 23, n. 1, 2021.

KALYANE, D. *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 98, p. 1252-1276, 2019.

KAMARAJ, S. *et al.* Curcumin drug delivery by vanillin-chitosan coated with calcium ferrite hybrid nanoparticles as carrier. **Eur J Pharm Sci**, 116, p. 48-60, 2018.

KAPALCZYŃSKA, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. **Arch Med Sci**, 14, n. 4, p. 910-919, 2018.

KARADAG, A. *et al.* Identification of miRNA signatures and their therapeutic potentials in prostate cancer. **Mol Biol Rep**, 48, n. 7, p. 5531-5539, 2021.

KARGINOV, F. V.; HANNON, G. J. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. **Genes Dev**, 27, n. 14, p. 1624-1632, 2013.

KE, T.-W. *et al.* MicroRNA-224 suppresses colorectal cancer cell migration by targeting Cdc42. **Disease markers**, 2014, n. 617150, p. 1-11, 2014.

KELLER, Evan T.; BROWN, Julie. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. **Journal of Cellular Biochemistry**, 91, n. 4, p. 718-729, 2004.

KHALIFEHZADEH, R.; ARAMI, H. Biodegradable calcium phosphate nanoparticles for cancer therapy. **Adv Colloid Interface Sci**, 279, p. 102157, 2020.

KIEVIT, F. M. *et al.* Proliferation and enrichment of CD133(+) glioblastoma cancer stem cells on 3D chitosan-alginate scaffolds. **Biomaterials**, 35, n. 33, p. 9137-9143, 2014.

KIM, C. H. *et al.* Artificial Intelligence Techniques for Prostate Cancer Detection through Dual-Channel Tissue Feature Engineering. **Cancers (Basel)**, 13, n. 7, 2021.

KIM, J. B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Semin Cancer Biol**, 15, n. 5, p. 365-377, 2005.

- KISHORE, S. *et al.* A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. **Natural Methods**, 8, n. 7, p. 559-564, 2011.
- KOTHARI, V. *et al.* DNA-Dependent Protein Kinase Drives Prostate Cancer Progression through Transcriptional Regulation of the Wnt Signaling Pathway. **Clin Cancer Res**, 25, n. 18, p. 5608-5622, 2019.
- KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D155-D162, 2019.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Res**, 39, n. Database issue, p. D152-157, 2011.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res**, 42, n. Database issue, p. D68-73, 2014.
- KRELL, J. *et al.* TP53 regulates miRNA association with AGO2 to remodel the miRNA-mRNA interaction network. **Genome research**, 26, n. 3, p. 331-341, 2016.
- KRETZSCHMAR, K. *et al.* The Androgen Receptor Antagonizes Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Epidermal Stem Cells. **J Invest Dermatol**, 135, n. 11, p. 2753-2763, 2015.
- KU, S. Y. *et al.* Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. **Science**, 355, n. 6320, p. 78-83, 2017.
- KÜÇÜKTÜRKMEN, B.; BOZKIR, A. Development and characterization of cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide to glioblastoma cells. **Drug Dev Ind Pharm**, 44, n. 2, p. 306-315, 2018.
- KUNİYASU, H. *et al.* Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers. **Clin Cancer Res**, 6, n. 6, p. 2295-2308, 2000.
- KWELDAM, C. F.; VAN LEENDERS, G. J.; VAN DER KWAST, T. Grading of prostate cancer: a work in progress. **Histopathology**, 74, n. 1, p. 146-160, 2019.
- KWOK, W. K. *et al.* Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. **Cancer Res**, 65, n. 12, p. 5153-5162, 2005.
- KYPRIANOU, N. Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance. **J Urol**, 169, n. 4, p. 1520-1525, 2003.
- LABAN, B. B. *et al.* A combined experimental and DFT study of metal core/indocyanine green shell hybrid nanoparticles. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, 309, p. 123828, 2023.
- LAI, X. *et al.* MiR-205-5p and miR-342-3p cooperate in the repression of the E2F1 transcription factor in the context of anticancer chemotherapy resistance. **Theranostics**, 8, n. 4, p. 1106-1120, 2018.

LAM, J. K. *et al.* siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. **Mol Ther Nucleic Acids**, 4, p. e252, 2015.

LANDGRAF, P. *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell**, 129, n. 7, p. 1401-1414, 2007.

LAYZER, J. M. *et al.* In vivo activity of nuclease-resistant siRNA. **RNA**, 10, n. 5, p. 766-771, 2004.

LEE, B. H. *et al.* Modulation of Huh7.5 spheroid formation and functionality using modified PEG-based hydrogels of different stiffness. **PLoS One**, 10, n. 2, p. e0118123, 2015.

LEE, H. *et al.* PEGylated polyethyleneimine grafted silica nanoparticles: enhanced cellular uptake and efficient siRNA delivery. **Anal Bioanal Chem**, 400, n. 2, p. 535-545, 2011.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, W. H. *et al.* Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. **Expert Opin Drug Deliv**, 11, n. 8, p. 1183-1201, 2014.

LENG, Y. *et al.* Overexpression of microRNA-29b inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis of colorectal cancer through the ETV4/ERK/EGFR axis. **Cancer Cell Int**, 21, n. 1, p. 17, 2021.

LI, A.; WU, N.; SUN, J. E2F1-induced microRNA-224-5p expression is associated with hepatocellular carcinoma cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via MREG. **Oncol Lett**, 23, n. 3, p. 82, 2022.

LI, C. *et al.* MicroRNA-29b-2-5p inhibits cell proliferation by directly targeting Cbl-b in pancreatic ductal adenocarcinoma. **BMC Cancer**, 18, n. 1, p. 681, 2018.

LI, J. *et al.* The circHMGCS1-miR-205-5p-ErBB3 axis mediated the Sanggenon C-induced anti-proliferation effects on human prostate cancer. **Pharmacol Res**, 187, p. 106584, 2023.

LI, J. *et al.* Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **J Control Release**, 142, n. 3, p. 416-421, 2010.

LI, J. *et al.* A genomic and epigenomic atlas of prostate cancer in Asian populations. **Nature**, 580, n. 7801, p. 93-99, 2020.

LI, L.; LI, S. miR-205-5p inhibits cell migration and invasion in prostatic carcinoma by targeting ZEB1. **Oncol Lett**, 16, n. 2, p. 1715-1721, 2018.

LI, Q. *et al.* miR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 29, n. 4, p. 835-842, 2014.

LI, Z. *et al.* SYTL2 promotes metastasis of prostate cancer cells by enhancing FSCN1-mediated pseudopodia formation and invasion. **J Transl Med**, 21, n. 1, p. 303, 2023.

- LIANG, Z. *et al.* Inhibition of prostate cancer RM1 cell growth *in vitro* by hydroxyapatite nanoparticle-delivered short hairpin RNAs against Stat3. **Mol Med Rep**, 16, n. 1, p. 459-465, 2017.
- LIAO, W.-T. *et al.* microRNA-224 promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer by repressing *PHLPP1* and *PHLPP2*. **Clinical Cancer Research**, 19, n. 17, p. 4662-4672, 2013.
- LIAO, W. *et al.* Powering up the molecular therapy of RNA interference by novel nanoparticles. **Biomater Sci**, 4, n. 7, p. 1051-1061, 2016.
- LIM, M. *et al.* Runx2 regulates survivin expression in prostate cancer cells. **Lab Invest**, 90, n. 2, p. 222-233, 2010.
- LIN, D. L. *et al.* Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes *in vitro*. **Prostate**, 47, n. 3, p. 212-221, 2001.
- LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 6, p. 321-333, 2015.
- LIN, Z.-Y. *et al.* MicroRNA-224 inhibits progression of human prostate cancer by downregulating *TRIB1*. **International journal of cancer**, 135, n. 3, p. 541-550, 2014.
- LIN, Z. Y. *et al.* MicroRNA-224 inhibits progression of human prostate cancer by downregulating *TRIB1*. **Int J Cancer**, 135, n. 3, p. 541-550, 2014.
- LING, H. *et al.* The clinical and biological significance of *MIR-224* expression in colorectal cancer metastasis. **Gut**, 65, n. 6, p. 977-989, 2016.
- LIPCHINA, I. *et al.* Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for *miR-302* in modulating BMP response. **Genes Dev**, 25, n. 20, p. 2173-2186, 2011.
- LIU, C. *et al.* Potential effect of matrix stiffness on the enrichment of tumor initiating cells under three-dimensional culture conditions. **Exp Cell Res**, 330, n. 1, p. 123-134, 2015.
- LIU, H. *et al.* *RKIP* suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion and enhances apoptosis regulated by microRNA-224. **Tumor Biology**, 35, p. 10095-10103, 2014.
- LIU, K. *et al.* Knockdown of *BAMBI* inhibits  $\beta$ -catenin and transforming growth factor  $\beta$  to suppress metastasis of gastric cancer cells. **Mol Med Rep**, 10, n. 2, p. 874-880, 2014.
- LIU, W.; WANG, X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. **Genome Biol**, 20, n. 1, p. 18, 2019.
- LIU, X. *et al.* The effect of calcium phosphate nanoparticles on hormone production and apoptosis in human granulosa cells. **Reprod Biol Endocrinol**, 8, p. 32, 2010.
- LIU, Y. *et al.* *MiR-224-5p* Targeting *OCN* Promotes the Proliferation, Migration, and Invasion of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Cells. **Urol Int**, 106, n. 11, p. 1185-1194, 2022.

LIU, Y. *et al.* An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery. **Int J Nanomedicine**, 6, p. 721-727, 2011.

LIU, Y. *et al.* Down-regulation of miR-29b in carcinoma associated fibroblasts promotes cell growth and metastasis of breast cancer. **Oncotarget**, 8, n. 24, p. 39559-39570, 2017.

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

LOGOTHETIS, Christopher J.; LIN, Sue Hwa. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. **Nature Reviews Cancer**, 5, n. 1, p. 21-28, 2005.

LOH, C. Y. *et al.* The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, 8, n. 10, 2019.

LU, M. *et al.* Tumor suppressor role of miR-3622b-5p in ERBB2-positive cancer. **Oncotarget**, 8, n. 14, p. 23008-23019, 2017.

LYTLE, J. R.; YARIO, T. A.; STEITZ, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 23, p. 9667-9672, 2007.

MACHADO CRUZ, R. *et al.* Identification and pharmaceutical characterization of a new itraconazole terephthalic acid cocrystal. **Pharmaceutics**, 12, n. 8, 2020.

MAGI-GALLUZZI, C. *et al.* TMPRSS2-ERG gene fusion prevalence and class are significantly different in prostate cancer of Caucasian, African-American and Japanese patients. **Prostate**, 71, n. 5, p. 489-497, 2011.

MAITLAND, N. J. Resistance to antiandrogens in prostate cancer: Is it inevitable, intrinsic or induced? **Cancers (Basel)**, 13, n. 2, 2021.

MAJID, S. *et al.* MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. **Cancer**, 116, n. 24, p. 5637-5649, 2010.

MAJOROS, W. H. *et al.* MicroRNA target site identification by integrating sequence and binding information. **Nature methods**, 10, n. 7, p. 630-633, 2013.

MARTIN, K. J. *et al.* Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. **PLoS One**, 3, n. 8, p. e2994, 2008.

MARTINEZ, N. J. *et al.* Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. **Genome Res**, 18, n. 12, p. 2005-2015, 2008.

MATEO, J. *et al.* Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. **J Clin Invest**, 130, n. 4, p. 1743-1751, 2020.



MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res**, 46, n. 12 Pt 1, p. 6387-6392, 1986.

MAVRIDIS, K.; STRAVODIMOS, K.; SCORILAS, A. Downregulation and prognostic performance of microRNA 224 expression in prostate cancer. **Clin Chem**, 59, n. 1, p. 261-269, 2013.

MAXWELL, P. J. *et al.* Attenuating Adaptive VEGF-A and IL8 Signaling Restores Durable Tumor Control in AR Antagonist-Treated Prostate Cancers. **Mol Cancer Res**, 20, n. 6, p. 841-853, 2022.

MCCLOY, R. A. *et al.* Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, 13, n. 9, p. 1400-1412, 2014.

MCNEAL, J. E. Normal and pathologic anatomy of prostate. **Urology**, 17, n. Suppl 3, p. 11-16, 1981.

MCNEAL, J. E. *et al.* Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. **Am J Surg Pathol**, 12, n. 12, p. 897-906, 1988.

MEES, S. T. *et al.* Involvement of *CD40* targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas. **Annals of surgical oncology**, 16, p. 2339-2350, 2009.

MEHARWADE, T. *et al.* Cross-activation of FGF, NODAL, and WNT pathways constrains BMP-signaling-mediated induction of the totipotent state in mouse embryonic stem cells. **Cell Rep**, 42, n. 5, p. 112438, 2023.

MELISSARIDOU, S. *et al.* The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. **Cancer Cell Int**, 19, p. 16, 2019.

MEMCZAK, S. *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. **Nature**, 495, n. 7441, p. 333-338, 2013.

MENG, X. *et al.* miR-101-3p sensitizes lung adenocarcinoma cells to irradiation via targeting BIRC5. **Oncol Lett**, 21, n. 4, p. 282, 2021.

MENG, Y. *et al.* MicroRNA-140-5p regulates osteosarcoma chemoresistance by targeting HMG5 and autophagy. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 416, 2017.

MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Physical approaches to biomaterial design. **Nat Mater**, 8, n. 1, p. 15-23, 2009.

MITTAL, A. *et al.* Efficacy of gemcitabine conjugated and miRNA-205 complexed micelles for treatment of advanced pancreatic cancer. **Biomaterials**, 35, n. 25, p. 7077-7087, 2014.

MIZUGUCHI, K. *et al.* Three-dimensional spheroid culture induces apical-basal polarity and the original characteristics of immortalized human renal proximal tubule epithelial cells. **Exp Cell Res**, 404, n. 1, p. 112630, 2021.

MONTGOMERY, R. B. *et al.* Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. **Cancer Res**, 68, n. 11, p. 4447-4454, 2008.

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. **Eur Urol**, 70, n. 1, p. 120-123, 2016.

MOORE, T. L. *et al.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chem Soc Rev**, 44, n. 17, p. 6287-6305, 2015.

MORAES, F. C. *et al.* miRNA delivery by nanosystems: State of the art and perspectives. **Pharmaceutics**, 13, n. 11, 2021.

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**, 16, n. 12, p. 2493-2502, 2010.

MOTTET, Nicolas *et al.* EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. **European Urology**, 71, n. 4, p. 618-629, 2017.

MOUILLET, J. F. *et al.* MiR-205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts. **FASEB J**, 24, n. 6, p. 2030-2039, 2010.

MULHOLLAND, David J. *et al.* Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells. **Cancer Research**, 72, n. 7, p. 1878-1889, 2012.

MÜLLER, K.; FEDOSOV, D. A.; GOMPPER, G. Margination of micro- and nano-particles in blood flow and its effect on drug delivery. **Sci Rep**, 4, p. 4871, 2014.

MURAKAMI, Y. *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. **Oncogene**, 25, n. 17, p. 2537-2545, 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 Prostatic Dis**, 13, n. 4, p. 356-361, 2010.

NADAL, M. *et al.* Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain. **Nat Commun**, 8, p. 14388, 2017.

NAGESH, P. K. B. *et al.* miRNA-205 Nanoformulation Sensitizes Prostate Cancer Cells to Chemotherapy. **Cancers (Basel)**, 10, n. 9, 2018.

NAKAI, Y. *et al.* Efficacy of an orally active small-molecule inhibitor of RANKL in bone metastasis. **Bone Res**, 7, p. 1, 2019.

NAKHLA, A. M. *et al.* Human sex hormone-binding globulin gene expression- multiple promoters and complex alternative splicing. **BMC Mol Biol**, 10, p. 37, 2009.

NANNURU, K. C. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface. **Cancer Res**, 70, n. 9, p. 3494-3504, 2010.

NASCIMENTO-GONÇALVES, E. *et al.* Modelling human prostate cancer: Rat models. **Life Sci**, 203, p. 210-224, 2018.

NASCIMENTO-GONCALVES, E. *et al.* Appraising Animal Models of Prostate Cancer for Translational Research: Future Directions. **Anticancer Res**, 43, n. 1, p. 275-281, 2023.

NEL, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nat Mater**, 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NEUMANN, S. *et al.* The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection. **Biomaterials**, 30, n. 35, p. 6794-6802, 2009.

NICOLAS, J. *et al.* 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. **Biomacromolecules**, 21, n. 6, p. 1968-1994, 2020.

NIGRO, M. C. *et al.* Current androgen receptor antagonists under investigation for resistant prostate cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, 22, n. 2, p. 191-202, 2022.

NIH. **SOLAR: Efficacy and safety of cobomarsen (MRG-106) vs. active comparator in subjects with mycosis fungoides (SOLAR)**. USA, 2020. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03713320>. Acesso em: 10 Mar 2022.

O'DOHERTY, M. *et al.* Improving the Intercellular Uptake and Osteogenic Potency of Calcium Phosphate via Nanocomplexation with the RALA Peptide. **Nanomaterials (Basel)**, 10, n. 12, 2020.

OADES, G. M.; COXON, J.; COLSTON, K. W. The potential role of bisphosphonates in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, 5, n. 4, p. 264-272, 2002.

OH, N.; PARK, J. H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. **Int J Nanomedicine**, 9 Suppl 1, p. 51-63, 2014.

OLARU, A. V. *et al.* MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, 19, n. 3, p. 471-480, 2013.

OLSON, A. *et al.* The comprehensive role of E-cadherin in maintaining prostatic epithelial integrity during oncogenic transformation and tumor progression. **PLoS Genet**, 15, n. 10, p. e1008451, 2019.

ONER, E.; GRAY, S. G.; FINN, S. P. Cell Viability Assay with 3D Prostate Tumor Spheroids. **Methods Mol Biol**, 2645, p. 263-275, 2023.

OTTOSEN, S. *et al.* In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. **Antimicrob Agents Chemother**, 59, n. 1, p. 599-608, 2015.

OUNI, M. *et al.* MiR-205 is up-regulated in islets of diabetes-susceptible mice and targets the diabetes gene Tcf712. **Acta Physiol (Oxf)**, 232, n. 4, p. e13693, 2021.

OUYANG, Z. *et al.* LncRNA ENST00000563492 promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by functions as a ceRNA for miR-205-5p. **Cell Death Dis**, 11, n. 6, p. 486, 2020.

PARK, C. Y. *et al.* A resource for the conditional ablation of microRNAs in the mouse. **Cell Rep**, 1, n. 4, p. 385-391, 2012.

PARK, J. *et al.* MicroRNA-101-3p Suppresses Cancer Cell Growth by Inhibiting the USP47-Induced Deubiquitination of RPL11. **Cancers (Basel)**, 14, n. 4, 2022.

PARK, J. W. *et al.* Reprogramming normal human epithelial tissues to a common, lethal neuroendocrine cancer lineage. **Science**, 362, n. 6410, p. 91-95, 2018.

PASQUINELLI, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, 408, n. 6808, p. 86-89, 2000.

PEĆINA-SLAUS, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell Int**, 3, n. 1, p. 17, 2003.

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

PELOFY, S. *et al.* Transfer of small interfering RNA by electropermeabilization in tumor spheroids. **Bioelectrochemistry**, 141, p. 107848, 2021.

PENG, X. *et al.* miR-224-5p regulates the proliferation, migration and invasion of pancreatic mucinous cystadenocarcinoma by targeting. **Mol Med Rep**, 23, n. 5, 2021.

PENNATI, M. *et al.* miR-205 impairs the autophagic flux and enhances cisplatin cytotoxicity in castration-resistant prostate cancer cells. **Biochem Pharmacol**, 87, n. 4, p. 579-597, 2014.

PIENTA, K. J.; BRADLEY, D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 12, n. 6, p. 1665-1671, 2006.

PITTELLA, F. *et al.* Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**, 32, n. 11, p. 3106-3114, 2011.

PORKKA, K. P. *et al.* MicroRNA expression profiling in prostate cancer. **Cancer Res**, 67, n. 13, p. 6130-6135, 2007.

POTOSKY, A. L. *et al.* The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. **JAMA**, 273, n. 7, p. 548-552, 1995.

PRIOLO, C. *et al.* AKT1 and MYC induce distinctive metabolic fingerprints in human prostate cancer. **Cancer Res**, 74, n. 24, p. 7198-7204, 2014.

QIAN, Tang *et al.* Functionalized PAMAM-Based system for targeted delivery of miR-205 and 5-fluorouracil in breast cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 67, p. 102959, 2022.

QIN, D.; LI, H.; XIE, H. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated miR-205 enhances cisplatin cytotoxicity in prostate cancer cells. **Mol Med Rep**, 18, n. 3, p. 3242-3250, 2018.

QIU, C. *et al.* Systemic delivery of siRNA by hyaluronan-functionalized calcium phosphate nanoparticles for tumor-targeted therapy. **Nanoscale**, 8, n. 26, p. 13033-13044, 2016.

QIU, C. *et al.* Preparation and application of calcium phosphate nanocarriers in drug delivery. **Mater Today Bio**, 17, p. 100501, 2022.

RAMACHANDRAN, R.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Synthesis and characterization of PEGylated calcium phosphate nanoparticles for oral insulin delivery. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 88, n. 1, p. 41-48, 2009.

RAMCHANDRAN, R.; CHALUVALLY-RAGHAVAN, P. miRNA-mediated RNA activation in mammalian cells. **Adv Exp Med Biol**, 983, p. 81-89, 2017.

RAMESH, M. *et al.* Effects of the physico-chemical nature of two biomimetic crystals on the innate immune response. **Int Immunopharmacol**, 7, n. 13, p. 1617-1629, 2007.

REBELLO, R. J. *et al.* Prostate cancer. **Nat Rev Dis Primers**, 7, n. 1, p. 9, 2021.

REEL, B. *et al.* The Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression and the Role of Discoidin Domain Receptor 1/2 Signalling in Zoledronate-treated PC3 Cells. **J Cancer**, 6, n. 10, p. 1020-1029, 2015.

REES, J.; BULTITUDE, M.; CHALLACOMBE, B. The management of lower urinary tract symptoms in men. **BMJ**, 348, p. g3861, 2014.

ROBINS, D. M. Androgen receptor gene polymorphisms and alterations in prostate cancer: of humanized mice and men. **Mol Cell Endocrinol**, 352, n. 1-2, p. 26-33, 2012.

ROBINSON, D. *et al.* Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. **Cell**, 162, n. 2, p. 454, 2015.

RODE, M. P. *et al.* miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. **Cell Signal**, 87, p. 110113, 2021.

ROPER, S. J. *et al.* 3D spheroid models of paediatric SHH medulloblastoma mimic tumour biology, drug response and metastatic dissemination. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 4259, 2021.

ROSS, R. W. *et al.* Efficacy of androgen deprivation therapy (ADT) in patients with advanced prostate cancer: association between Gleason score, prostate-specific antigen level, and prior ADT exposure with duration of ADT effect. **Cancer**, 112, n. 6, p. 1247-1253, 2008.

ROTINEN, M. *et al.* ONECUT2 is a targetable master regulator of lethal prostate cancer that suppresses the androgen axis. **Nat Med**, 24, n. 12, p. 1887-1898, 2018.

RUDNICKI, A. *et al.* microRNA-224 regulates Pentraxin 3, a component of the humoral arm of innate immunity, in inner ear inflammation. **Human molecular genetics**, 23, n. 12, p. 3138-3146, 2014.

RUVINOV, E. *et al.* Calcium-siRNA nanocomplexes: what reversibility is all about. **J Control Release**, 203, p. 150-160, 2015.

SABLATURA, L. K. *et al.* A 3D Perfusible Platform for In Vitro Culture of Patient Derived Xenografts. **Adv Healthc Mater**, 12, n. 14, p. e2201434, 2023.

SAID, R. *et al.* Correlation between E-cadherin/ $\beta$ -catenin, Vimentin expression, clinicopathologic features and drug resistance prediction in naïve prostate cancer: A molecular and clinical study. **Gensis**, p. e23543, 2023.

SAJID, M. I. *et al.* Overcoming barriers for siRNA therapeutics: from bench to bedside. **Pharmaceuticals (Basel)**, 13, n. 10, 2020.

SARASWATHIBHATLA, A.; INDANA, D.; CHAUDHURI, O. Cell-extracellular matrix mechanotransduction in 3D. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 24, n. 7, p. 495-516, 2023.

SARTOR, O. *et al.* Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **N Engl J Med**, 385, n. 12, p. 1091-1103, 2021.

SASTRE, D. *et al.* Focused screening reveals functional effects of microRNAs differentially expressed in colorectal cancer. **BMC Cancer**, 19, n. 1, p. 1239, 2019.

SBOC. Próstata: Doença Avançada. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica: Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, Brasil 2021.

SCHER, H. I. *et al.* Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. **N Engl J Med**, 367, n. 13, p. 1187-1197, 2012.

SCHER, H. I.; SAWYERS, C. L. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. **J Clin Oncol**, 23, n. 32, p. 8253-8261, 2005.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SCHIRALDI, C. *et al.* Nanoparticles for the delivery of zoledronic acid to prostate cancer cells: a comparative analysis through time lapse video-microscopy technique. **Cancer Biol Ther**, 15, n. 11, p. 1524-1532, 2014.

SCHLOMM, T. Re: The molecular taxonomy of primary prostate cancer. **Eur Urol**, 69, n. 6, p. 1157, 2016.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHWEIZER, L. *et al.* The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens. **BMC Cell Biol**, 9, p. 4, 2008.

SCHWEIZER, M. T. *et al.* A phase I study of niclosamide in combination with enzalutamide in men with castration-resistant prostate cancer. **PLoS One**, 13, n. 6, p. e0198389, 2018.

SCOTT, G. K. *et al.* Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. **J Biol Chem**, 282, n. 2, p. 1479-1486, 2007.

SCOTT, L. J. Abiraterone acetate: A review in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Drugs**, 77, n. 14, p. 1565-1576, 2017.

SERPELONI, J. M. *et al.* Flavonoid bradykinin B decreases viability, proliferation, and migration in human metastatic prostate (DU145) cells grown in 2D and 3D culture models. **Toxicol Res (Camb)**, 12, n. 2, p. 321-331, 2023.

SETHURAMAN, V. *et al.* In vivo synergistic anti-tumor effect of lumefantrine combined with pH responsive behavior of nano calcium phosphate based lipid nanoparticles on lung cancer. **Eur J Pharm Sci**, 158, p. 105657, 2021.

SETO, A. G. *et al.* Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. **Br J Haematol**, 183, n. 3, p. 428-444, 2018.

SETTEN, R. L.; ROSSI, J. J.; HAN, S. P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, 18, n. 6, p. 421-446, 2019.

SHARIAT, S. F. *et al.* Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. **J Clin Oncol**, 22, n. 9, p. 1655-1663, 2004.

SHARMA, A. *et al.* The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. **J Clin Invest**, 120, n. 12, p. 4478-4492, 2010.

SHENDEROV, E. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab, with or without enzalutamide, in AR-V7-expressing metastatic castration-resistant prostate cancer: A phase-2 nonrandomized clinical trial. **Prostate**, 81, n. 6, p. 326-338, 2021.

SHENOY, S. CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. **Cancer Manag Res**, 11, p. 10477-10486, 2019.

SHI, S. *et al.* Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression. **J Control Release**, 194, p. 228-237, 2014.

SHI, X. B. *et al.* miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic gens. **Prostate**, 71, n. 5, p. 538-549, 2011.

SHIOZAWA, Y. *et al.* Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. **J Clin Invest**, 121, n. 4, p. 1298-1312, 2011.

SHIRLEY, J. L. *et al.* Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. **Mol Ther**, 28, n. 3, p. 709-722, 2020.

SHOLA, D. T. *et al.* Hic-5 controls BMP4 responses in prostate cancer cells through interacting with Smads 1, 5 and 8. **Oncogene**, 31, n. 19, p. 2480-2490, 2012.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA Cancer J Clin**, 74, n. 1, p. 12-49, 2024.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 1, p. 7-33, 2021.

SIKKEMA, F. D. *et al.* Monodisperse polymer-virus hybrid nanoparticles. **Org Biomol Chem**, 5, n. 1, p. 54-57, 2007.

SINGH, Ohio.; BOLLA, Sun Ri. **Anatomy, Abdomen and Pelvis, Prostate**. StatPearls.: 2021.

SITU, J. *et al.* MicroRNA-939 Directly Targets. **Onco Targets Ther**, 13, p. 4257-4270, 2020.

SMITH, M. R. *et al.* Niraparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and DNA repair gene defects (GALAHAD): a multicentre, open-label, phase 2 trial. **Lancet Oncol**, 23, n. 3, p. 362-373, 2022.

SOARES, D. C. F. *et al.* Polymer-hybrid nanosystems for antiviral applications: Current advances. **Biomed Pharmacother**, 146, p. 112249, 2022.

SOKOLOVA, V.; EPPLE, M. Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells. **Angew Chem Int Ed Engl**, 47, n. 8, p. 1382-1395, 2008.

SOKOLOVA, V.; EPPLE, M. Biological and Medical Applications of Calcium Phosphate Nanoparticles. **Chemistry**, 27, n. 27, p. 7471-7488, 2021.

SOKOLOVA, V. *et al.* Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono- and co-culture cell models. **Acta Biomater**, 84, p. 391-401, 2019.

SOUSA DE ALMEIDA, M. *et al.* Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. **Chem Soc Rev**, 50, n. 9, p. 5397-5434, 2021.

SOUZA, G. R. R. *et al.* Short interfering RNA delivered by a hybrid nanoparticle targeting VEGF: Biodistribution and anti-tumor effect. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**, 1865, n. 9, p. 129938, 2021.

SPANS, L. *et al.* Comparative genomic and transcriptomic analyses of LNCaP and C4-2B prostate cancer cell lines. **PLoS One**, 9, n. 2, p. e90002, 2014.



SRINIVAS-SHANKAR, U.; WU, F. C. Drug insight: testosterone preparations. **Nat Clin Pract Urol**, 3, n. 12, p. 653-665, 2006.

SRIRAM, V.; LEE, J. Y. Calcium phosphate-polymeric nanoparticle system for co-delivery of microRNA-21 inhibitor and doxorubicin. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 208, p. 112061, 2021.

STEINHARDT, R. A.; ALDERTON, J. Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. **Nature**, 332, n. 6162, p. 364-366, 1988.

STIUFUC, Rares *et al.* One-step synthesis of PEGylated gold nanoparticles with tunable surface charge. **Journal of Nanomaterials**, 2013, 2013. Research Article.

STOPSACK, K. H. *et al.* Oncogenic genomic alterations, clinical phenotypes, and outcomes in metastatic castration-sensitive prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 26, n. 13, p. 3230-3238, 2020.

SU, H. *et al.* Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. **Genes Dev**, 23, n. 3, p. 304-317, 2009.

SUKUMAR, U. K. *et al.* Intranasal delivery of targeted polyfunctional gold-iron oxide nanoparticles loaded with therapeutic microRNAs for combined theranostic multimodality imaging and presensitization of glioblastoma to temozolomide. **Biomaterials**, 218, p. 119342, 2019.

SUN, Y. *et al.* Downregulation of miRNA-205 expression and biological mechanism in prostate cancer tumorigenesis and bone metastasis. **Biomed Res Int**, 2020, p. 6037434, 2020.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUR, S. *et al.* miRNA-29b Inhibits Prostate Tumor Growth and Induces Apoptosis by Increasing Bim Expression. **Cells**, 8, n. 11, 2019.

SUTHERLAND, R. M.; MCCREDIE, J. A.; INCH, W. R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, 46, n. 1, p. 113-120, 1971.

TAHIR, N. *et al.* Development and optimization of methotrexate-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery applications. **Int J Pharm**, 533, n. 1, p. 156-168, 2017.

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

TAKAGI, A. *et al.* Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. **Anticancer Res**, 27, n. 1A, p. 45-53, 2007.

TAM, W. L.; WEINBERG, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nat Med**, 19, n. 11, p. 1438-1449, 2013.

TAN, M. H. *et al.* Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacol Sin**, 36, n. 1, p. 3-23, 2015.

TANG, J. *et al.* Preparation of optimized lipid-coated calcium phosphate nanoparticles for enhanced in vitro gene delivery to breast cancer cells. **J Mater Chem B**, 3, n. 33, p. 6805-6812, 2015.

TAO, L. *et al.* HIPK3 Inhibition by Exosomal hsa-miR-101-3p Is Related to Metabolic Reprogramming in Colorectal Cancer. **Front Oncol**, 11, p. 758336, 2021.

TAYLOR, J. T. *et al.* Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. **World J Gastroenterol**, 14, n. 32, p. 4984-4991, 2008.

TELLMAN, T. V. *et al.* Cleavage of the Perlecan-Semaphorin 3A-Plexin A1-Neuropilin-1 (PSPN) Complex by Matrix Metalloproteinase 7/Matrilysin Triggers Prostate Cancer Cell Dyscohesion and Migration. **Int J Mol Sci**, 22, n. 6, 2021.

THALMANN, G. N. *et al.* LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. **Prostate**, 44, n. 2, p. 91-103 Jul 101;144(102), 2000.

TIAN, J.; HE, H.; LEI, G. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in bone cancers. **Tumour Biol**, 35, n. 10, p. 9439-9445, 2014.

TIAN, X. *et al.* E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier. **J Biomed Biotechnol**, 2011, p. 567305, 2011.

TIAN, Z. *et al.* Insight Into the Prospects for RNAi Therapy of Cancer. **Front Pharmacol**, 12, p. 644718, 2021.

TOBIN, L. A. *et al.* Pegylated siRNA-loaded calcium phosphate nanoparticle-driven amplification of cancer cell internalization *in vivo*. **Biomaterials**, 34, n. 12, p. 2980-2990, 2013.

TOIVANEN, R.; SHEN, M. M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development**, 144, n. 8, p. 1382-1398, 2017.

TOMLINS, S. A. *et al.* Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. **Neoplasia**, 10, n. 2, p. 177-188, 2008.

TOMLINS, S. A. *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. **Science**, 310, n. 5748, p. 644-648, 2005.

TORO, A. U.; SHUKLA, S. K.; BANSAL, P. Micronome Revealed miR-205-5p as Key Regulator of VEGFA During Cancer Related Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. **Mol Biotechnol**, 65, n. 7, p. 1178-1186, 2023.

TRABER, G. M.; YU, A. M. RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. **J Pharmacol Exp Ther**, 384, n. 1, p. 133-154, 2023.

TUCCI, P. *et al.* Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 38, p. 15312-15317, 2012.

UMBAS, R. *et al.* Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. **Cancer Res**, 52, n. 18, p. 5104-5109, 1992.

UPRAITY, S. *et al.* MiR-224 expression increases radiation sensitivity of glioblastoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 448, n. 2, p. 225-230, 2014.

VAN DE WATER, F. M. *et al.* Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. **Drug Metab Dispos**, 34, n. 8, p. 1393-1397, 2006.

VAN DER STEEN, T.; TINDALL, D. J.; HUANG, H. Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. **Int J Mol Sci**, 14, n. 7, p. 14833-14859, 2013.

VERDOODT, B. *et al.* MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein Bcl2, is downregulated in prostate cancer. **Int J Oncol**, 43, n. 1, p. 307-314, 2013.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nat Rev Urol**, 13, n. 7, p. 379-386, 2016.

WALTER, B. A. *et al.* Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. **J Cancer**, 4, n. 5, p. 350-357, 2013.

WAN, Y. *et al.* Dysregulated microRNA-224/apelin axis associated with aggressive progression and poor prognosis in patients with prostate cancer. **Human Pathology**, 46, n. 2, p. 295-303, 2015.

WANG, C.; CHEN, Q.; XU, H. Wnt/ $\beta$ -catenin signal transduction pathway in prostate cancer and associated drug resistance. **Discov Oncol**, 12, n. 1, p. 40, 2021.

WANG, D.; CHEN, X.; ZHANG, R. BAMBI promotes macrophage proliferation and differentiation in gliomas. **Mol Med Rep**, 17, n. 3, p. 3960-3966, 2018.

WANG, J. *et al.* Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. **AAPS J**, 12, n. 4, p. 492-503, 2010.

WANG, X. *et al.* E-cadherin bridges cell polarity and spindle orientation to ensure prostate epithelial integrity and prevent carcinogenesis in vivo. **PLoS Genet**, 14, n. 8, p. e1007609, 2018.

WANG, Y. *et al.* Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. **Journal of Biological Chemistry**, 283, n. 19, p. 13205-13215, 2008.

WANG, Y. *et al.* MicroRNA-224 targets SMAD family member 4 to promote cell proliferation and negatively influence patient survival. **PLoS One**, 8, n. 7, p. e68744, 2013.

WANG, Y. *et al.* miR-224-5p Carried by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Regulates Autophagy in Breast Cancer Cells via HOXA5. **Front Cell Dev Biol**, 9, p. 679185, 2021.

WARDE-FARLEY, L. *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic Acids Res**, 38, p. 214-220, 2010.

WASUNGU, L. *et al.* A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. **Int J Pharm**, 379, n. 2, p. 278-284, 2009.

WATSON, P. A.; ARORA, V. K.; SAWYERS, C. L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 12, p. 701-711, 2015.

WEI, C. G. *et al.* Calcium phosphate-based nanomedicine mediated CRISPR/Cas9 delivery for prostate cancer therapy. **Front Bioeng Biotechnol**, 10, p. 1078342, 2022.

WEIDLE, U. H. *et al.* The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. **Cancer Genomics Proteomics**, 14, n. 1, p. 1-15, 2017.

WEILBAECHER, K. N.; GUISE, T. A.; MCCAULEY, L. K. Cancer to bone: a fatal attraction. **Nat Rev Cancer**, 11, n. 6, p. 411-425, 2011.

WHISNANT, A. W. *et al.* In-depth analysis of the interaction of HIV-1 with cellular microRNA biogenesis and effector mechanisms. **mBio**, 4, n. 2, p. e000193, 2013.

WHITE, N. M. *et al.* Three dysregulated miRNA control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, 102, n. 8, p. 1244-1253, 2010.

WHO. **Cancer**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 04 jan 2024.

WIKLUND, E. D. *et al.* Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. **Int J Cancer**, 128, n. 6, p. 1327-1334, 2011.

WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**, 323, n. 9, p. 844-853, 2020.

WU, F. *et al.* Exosomal miR-224-5p from Colorectal Cancer Cells Promotes Malignant Transformation of Human Normal Colon Epithelial Cells by Promoting Cell Proliferation through Downregulation of CMTM4. **Oxid Med Cell Longev**, 2022, p. 5983629, 2022.

WU, H. C. *et al.* Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. **Int J Cancer**, 57, n. 3, p. 406-412, 1994.

WU, H.; ZHU, S.; MO, Y. Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. **Cell Res**, 19, n. 4, p. 439-448, 2009.

XU, F. *et al.* HOXD13 suppresses prostate cancer metastasis and BMP4-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting SMAD1. **Int J Cancer**, 148, n. 12, p. 3060-3070, 2021.

XU, K. *et al.* 3D bioprinting of multi-cellular tumor microenvironment for prostate cancer metastasis. **Biofabrication**, 15, n. 3, 2023.

XUE, Y. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. **Cell**, 152, n. 1-2, p. 82-96, 2013.

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

YANG, C. *et al.* Hybrid FeWO. **Int J Nanomedicine**, 18, p. 8023-8037, 2023.

YANG, D. *et al.* Inhibition of hepatic fibrosis with artificial microRNA using ultrasound and cationic liposome-bearing microbubbles. **Gene Ther**, 20, n. 12, p. 1140-1148, 2013.

YANG, F. *et al.* Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. **J Biol Chem**, 277, n. 13, p. 11336-11344, 2002.

YANG, L. *et al.* In vitro the behaviors of metastasis with suppression of VEGF in human bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line. **J Exp Clin Cancer Res**, 31, n. 1, p. 40, 2012.

YANG, Q. *et al.* Bone-targeted calcium phosphate-polymer hybrid nanoparticle co-deliver zoledronate and docetaxel to treat bone metastasis of prostate cancer. **J Pharm Sci**, 110, n. 2, p. 876-887, 2021.

YANG, W. *et al.* Exosomal miR-205-5p enhances angiogenesis and nasopharyngeal carcinoma metastasis by targeting. **Mol Ther Oncolytics**, 24, p. 612-623, 2022.

YANG, Y. *et al.* PTEN Loss Promotes Intratumoral Androgen Synthesis and Tumor Microenvironment Remodeling via Aberrant Activation of RUNX2 in Castration-Resistant Prostate Cancer. **Clin Cancer Res**, 24, n. 4, p. 834-846, 2018.

YANG, Y. *et al.* Systemic delivery of siRNA via LCP nanoparticle efficiently inhibits lung metastasis. **Mol Ther**, 20, n. 3, p. 609-615, 2012.

YAO, G. *et al.* MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor- $\beta$ -mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4. **Molecular endocrinology**, 24, n. 3, p. 540-551, 2010.

YONG, T. *et al.* Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 3838, 2019.

YUAN, K. *et al.* Decreased levels of miR-224 and the passenger strand of miR-221 increase MBD2, suppressing maspin and promoting colorectal tumor growth and metastasis in mice. **Gastroenterology**, 145, n. 4, p. 853-864.e859, 2013.

YUMOTO, K. *et al.* Axl is required for TGF- $\beta$ 2-induced dormancy of prostate cancer cells in the bone marrow. **Sci Rep**, 6, p. 36520, 2016.

YUN, E. J. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway induces autophagy-mediated temozolomide-resistance in human glioblastoma. **Cell Death Dis**, 11, n. 9, p. 771, 2020.

ZHANG, G. F. *et al.* Overexpression of microRNA-205-5p exerts suppressive effects on stem cell drug resistance in gallbladder cancer by down-regulating PRKCE. **Biosci Rep**, 40, n. 9, 2020.

ZHANG, J.; LI, X.; HUANG, L. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. **J Control Release**, 190, p. 440-450, 2014.

ZHANG, J. *et al.* MiR-205-5p suppresses angiogenesis in gastric cancer by downregulating the expression of VEGFA and FGF1. **Exp Cell Res**, 404, n. 2, p. 112579, 2021.

ZHANG, R. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. **Bone**, 52, n. 1, p. 145-156, 2013.

ZHANG, S.; SHEN, T.; ZENG, Y. Epigenetic Modifications in Prostate Cancer Metastasis and Microenvironment. **Cancers (Basel)**, 15, n. 8, 2023.

ZHANG, X. *et al.* Codelivery of GRP78 siRNA and docetaxel via RGD-PEG-DSPE/DOPA/CaP nanoparticles for the treatment of castration-resistant prostate cancer. **Drug Des Devel Ther**, 13, p. 1357-1372, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Involvement of micro RNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 28, n. 3, p. 565-575, 2013a.

ZHANG, Y. *et al.* Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol Hepatol**, 28, n. 3, p. 565-575, 2013b.

ZHAO, H. *et al.* Expression of miR-224-5p is associated with the original cisplatin resistance of ovarian papillary serous carcinoma. **Oncol Rep**, 32, n. 3, p. 1003-1012, 2014.

ZHAO, Y. *et al.* Co-Polymer Carrier with Dual Advantages of Cartilage-Penetrating and Targeting Improves Delivery and Efficacy of MicroRNA Treatment of Osteoarthritis. **Adv Healthc Mater**, 12, n. 6, p. e2202143, 2023.

ZHAO, Y. *et al.* A comparison between sphere and rod nanoparticles regarding their *in vivo* biological behavior and pharmacokinetics. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 4131, 2017.

ZHENG, Q. *et al.* miR-224 targets BTRC and promotes cell migration and invasion in colorectal cancer. **3 Biotech**, 10, n. 11, p. 485, 2020.

ZHENG, T. *et al.* Anti-MicroRNA-21 Oligonucleotide Loaded Spermine-Modified Acetalated Dextran Nanoparticles for B1 Receptor-Targeted Gene Therapy and Antiangiogenesis Therapy. **Adv Sci (Weinh)**, 9, n. 5, p. e2103812, 2022.

ZHOU, J. *et al.* miR-224-5p-enriched exosomes promote tumorigenesis by directly targeting androgen receptor in non-small cell lung cancer. **Mol Ther Nucleic Acids**, 23, p. 1217-1228, 2021.

ZHOU, L. *et al.* The overexpression of BAMBI and its involvement in the growth and invasion of human osteosarcoma cells. **Oncol Rep**, 30, n. 3, p. 1315-1322, 2013.

ZHOU, Y. *et al.* 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. **J Cell Mol Med**, 21, n. 6, p. 1073-1084, 2017.

ZHU, S. *et al.* Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner. **Oncogene**, 29, n. 12, p. 1763-1772, 2010.

ZSCHENKER, O. *et al.* Genome-wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e34279, 2012.

ZUCKERMAN, J. E. *et al.* Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 31, p. 11449-11454, 2014.

## ANEXO A – Artigos

## a) Artigos publicados como primeira autora, durante doutorado.

Cellular Signalling 87 (2021) 110126



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Signalling

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cellsig](http://www.elsevier.com/locate/cellsig)

## Pro-angiogenic effect of PC-3 exosomes in endothelial cells in vitro

Anne Natalie Prigol<sup>b</sup>, Michele Patrícia Rode<sup>b</sup>, Adny Henrique Silva<sup>b</sup>, Júlia Cisilotto<sup>b</sup>, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil<sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Prostate cancer  
Castration resistance  
Exosomes  
Angiogenesis  
miRNA

## ABSTRACT

The progression to a castration-resistant prostate cancer can occur after treatment with androgen deprivation therapy, resulting in poor prognosis and ineffective therapy response. Hormone dependence transition has been associated with increased tumor vascularization. Considering that exosomes are important components in communication between tumor cells and the microenvironment, we examined the angiogenic potential of exosomes released from Pca cell lines with distinctive profiles of androgen response through exosomes isolation, microscopy and uptake, functional assays follow up by microarray, RT-qPCR and bioinformatics analysis. HUVEC cells treated with PC-3 exosomes (androgen independent) showed increased invasion and tube formation ability. In order to identify microRNAs (miRNAs) related to the angiogenic response, the characterization of exosomal miRNA profile was performed. As result we suggest that the miR-27a-3p could be involved in the pro-angiogenic effect of PC-3 exosomes.

## 1. Introduction

Prostate cancer (Pca) is the second most incident cancer in men and the fourth more common cancer overall in the globe [1]. During initial development, the proliferation of cancer cells is dependent on androgens, such as testosterone and dihydrotestosterone, a condition known as androgen-responsive [2], and androgen deprivation is indicated as a treatment [3]. However, in advanced disease, cells can continue to proliferate even in absence of androgens, the castration-resistant (CRPC). Patients with organ-confined disease have five-year survival nearly 100%, in contrast to patients with metastatic disease, which survival rate is 31% [4]. The late stage of Pca development, the metastatic castration-resistant (mCRPC), is estimated in 10% to 50% of cases progress within 3 years of diagnosis [5], with a five-year survival rate of approximately 15% [6]. This stage has no effective treatment and is the major cause of death in Pca.


Transition to androgen resistance is associated with increased tumor vascularization [7]. No metabolically active tissue in the body is more than a few hundred micrometres from a blood capillary [8,9], which is formed by the process of angiogenesis, one of the hallmarks of cancer [10]. The expansion of a vascular network through the angiogenesis process requires coordinated control of many cellular functions, which are regulated by several growth factors and cytokines that can be influenced by extracellular components, as vesicles and exosomes [11–13].

Exosomes refer to small vesicles, ranging from 30 to 150 nm of diameter with endosomal origin, which may carry DNA, mRNA, miRNAs, lipids, and proteins [14]. Exosomes release has been described as an important component in the communication between tumor cells and tumor microenvironments, such as fibroblasts, endothelial cells, and cells of the immune system, promoting the modulation of activities in recipient cells through horizontal transfer of information [15,16].



Review

# The Bone Microenvironment Soil in Prostate Cancer Metastasis: An miRNA Approach

Anne Natalie Prigol <sup>†</sup> , Michele Patricia Rode <sup>†</sup>, Fernanda da Luz Efe, Najla Adel Saleh and Tânia Beatriz Crezynski-Pasa <sup>\*</sup>

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina State, Brazil; anne.prigol@posgrad.ufsc.br (A.N.P.); michele.rode@ufsc.br (M.P.R.); fernanda.efel@posgrad.ufsc.br (F.d.L.E.); adelsale@msu.edu (N.A.S.)

<sup>\*</sup> Correspondence: tania.pasa@ufsc.br; Tel.: +55-48-3721-2212

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** Prostate cancer (PCa) is the second most incident cancer in men worldwide. Despite having high cure rates when locally confined, PCa has a high risk of mortality in advanced stages, owing to the few treatment options for the metastatic disease, which occurs mostly in bones. Tumor progression seems to be related to deregulation of microRNA (miRNA) expression. These small noncoding RNA molecules act as posttranscriptional regulators of gene expression in donor cells or distant sites (by exosome transportation), preparing the future metastatic niche. Identification of suitable miRNAs may assist in an early and less invasive diagnosis and drug therapy, positively impacting patient quality of life and improving our understanding of the molecular aspects of bone metastasis.

**Abstract:** Bone metastatic prostate cancer (PCa) is associated with a high risk of mortality. Changes in the expression pattern of miRNAs seem to be related to early aspects of prostate cancer, as well as its establishment and proliferation, including the necessary steps for metastasis. Here we compiled, for the first time, the important roles of miRNAs in the development, diagnosis, and treatment of bone metastasis, focusing on recent *in vivo* and *in vitro* studies. PCa exosomes are proven to promote metastasis-related events, such as osteoblast and osteoclast differentiation and proliferation. Aberrant miRNA expression in PCa may induce abnormal bone remodeling and support tumor development. Furthermore, miRNAs are capable of binding to multiple mRNA targets, a dynamic property that can be harnessed for the development of treatment tools, such as antagomiRs and miRNA mimics, which have emerged as promising candidates in PCa treatment. Finally, miRNAs may serve as noninvasive biomarkers, as they can be detected in tissue and bodily fluids, are highly stable, and show differential expression between nonmetastatic PCa and bone metastatic samples. Taken together, the findings underscore the importance of miRNA expression profiles and miRNA-based tools as rational technologies to increase the quality of life and longevity of patients.

**Keywords:** bone metastasis; bone microenvironment; prostate cancer; miRNAs; exosomes



Citation: Prigol, A.N.; Rode, M.P.; Efe, F.d.L.; Saleh, N.A.; Crezynski-Pasa, T.B. The Bone Microenvironment Soil in Prostate Cancer Metastasis: An miRNA Approach. *Cancers* **2023**, *15*, 4027. <https://doi.org/10.3390/cancers15164027>

Academic Editor: David Wong

Received: 14 May 2023

Revised: 28 July 2023

Accepted: 2 August 2023

Published: 9 August 2023

## b) Artigos publicados como co-autora, durante doutorado.

## Article

## Semisynthetic Sesquiterpene Lactones Generated by the Sensibility of Glaucolide B to Lewis and Brønsted–Lowry Acids and Bases: Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Activities

Layson A. Lemos da Silva <sup>1</sup>, Louis P. Sandjo <sup>2,\*</sup>, Laura S. Assunção <sup>1</sup>, Anne N. Prigol <sup>1</sup>, Carolina D. de Siqueira <sup>1</sup>, Tânia B. Creczynski-Pasa <sup>3</sup>, Marcus T. Scotti <sup>4</sup>, Luciana Scotti <sup>4</sup>, Fabíola B. Filippin-Monteiro <sup>5</sup> and Maíque W. Biavatti <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduate Program of Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis CEP 88040-900, SC, Brazil

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis CEP 88040-900, SC, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis CEP 88040-900, SC, Brazil

<sup>4</sup> Post-Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária—Castelo Branco III, João Pessoa CEP 58051-900, PB, Brazil

<sup>5</sup> Department of Clinical Analysis, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis CEP 88040-900, SC, Brazil

\* Correspondence: p.lusandjo@ufsc.br (L.P.S.); maique.biavatti@ufsc.br (M.W.B.); Tel.: +55-48-3721-3634 (L.P.S.); +55-48-3721-3493 (M.W.B.)



Citation: da Silva, L.A.L.; Sandjo, L.P.; Assunção, L.S.; Prigol, A.N.; de Siqueira, C.D.; Creczynski-Pasa, T.B.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; Filippin-Monteiro, F.B.; Biavatti, M.W. Semisynthetic Sesquiterpene Lactones Generated by the Sensibility of Glaucolide B to Lewis and Brønsted–Lowry Acids and Bases: Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Activities. *Molecules* **2023**, *28*, 1243. <https://doi.org/10.3390/molecules28031243>

Academic Editor: Arjun H. Basakota

Received: 26 December 2022

Revised: 16 January 2023

Accepted: 20 January 2023

Published: 27 January 2023

**Abstract:** Sesquiterpene lactone (SL) subtypes including hirsutinolide and cadinanolide have a controversial genesis. Metabolites of these classes are either described as natural products or as artifacts produced via the influence of solvents, chromatographic mobile phases, and adsorbents used in phytochemical studies. Based on this divergence, and to better understand the sensibility of these metabolites, different pH conditions were used to prepare semisynthetic SLs and evaluate the anti-inflammatory and antiproliferative activities. Therefore, glaucolide B (**1**) was treated with various Brønsted–Lowry and Lewis acids and bases—the same approach was applied to some of its derivatives—allowing us to obtain 14 semisynthetic SL derivatives, 10 of which are hereby reported for the first time. Hirsutinolide derivatives **7a** (CC<sub>50</sub> = 5.0 μM; SI = 2.5) and **7b** (CC<sub>50</sub> = 11.2 μM; SI = 2.5) and the germacranolide derivative **8a** (CC<sub>50</sub> = 3.1 μM; SI = 3.0) revealed significant cytotoxic activity and selectivity against human melanoma SK-MEL-28 cells when compared with that against non-tumoral HUVEC cells. Additionally, compounds **7a** and **7c.1** showed strongly reduced interleukin-6 (IL-6) and nitrite (NO<sub>x</sub>) release in pre-treated M1 macrophages J774A.1 when stimulated with lipopolysaccharide. Despite the fact that hirsutinolide and cadinanolide SLs may be produced via plant metabolism, this study shows that acidic and alkaline extraction and solid-phase purification processes can promote their formation.

**Keywords:** sesquiterpene lactones; semisynthesis; anti-inflammatory activity; cytotoxic activity



## MicroRNA-Mediated Antiproliferative Effects of M1 Macrophage-Derived Extracellular Vesicles on Melanoma Cells

Najla Adel Saleh<sup>a</sup>, Michele Patricia Rode<sup>a</sup>, Júlia Cisilotto<sup>a</sup>, Adry Henrique Silva<sup>a</sup>, Anne Natalie Prigo<sup>b</sup>, Fernanda da Luz Efe<sup>a</sup>, Evelyn Winter<sup>b</sup>, Fabíola Branco Filippin-Monteiro<sup>a,c</sup>, and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program In Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>b</sup>Department of Agriculture, Biodiversity and Forest, Federal University of Santa Catarina, Curitibaanos, Brazil; <sup>c</sup>Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>d</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

### ABSTRACT

**Introduction:** Research in tumor treatment has shown promising results using extracellular vesicles (EVs) derived from immune cells. EVs derived from M1 macrophages (proinflammatory), known as M1-EVs, have properties that suppress tumor growth, making them a promising treatment tool for immune susceptible tumors such as melanoma. Here, small unaltered M1-EVs (M1-sEVs) were employed in a 3D mouse melanoma model (melanospheres) to evaluate such activity.

**Methods:** Macrophages were polarized and EVs were isolated by ultracentrifugation. The EVs obtained were characterized based on size, with measurements performed by dynamic light scattering and electron microscopy, and the expression profiles of microRNAs were analyzed by microarray and PCR. Melanospheres were used to evaluate the cytotoxicity of M1-sEVs. Pondering a possible future transposition from the animal model to the human, human melanoma cells were transfected with a specific miRNA, and the impact on cell proliferation was evaluated.

**Results:** The isolated EVs showed a size distribution between 50–400 nm in diameter, but preeminently in a range of 70–90 nm. M1-sEVs demonstrated a remarkable ability to reduce cell proliferation and viability in the melanospheres, leading to a decrease in their volume. M1-sEVs contained unique miRNAs, including miR-29a-3p, which exhibited significant antitumor activities according to bioinformatics analysis. Validation of the antitumor effects of miR-29a-3p was obtained by a functional evaluation, i.e., by inducing miRNA overexpression in human melanoma cells (SK-MEL-28).

**Conclusion:** Although further research would be advisable, the study provides evidence supporting the potential of M1-sEVs and their miRNA load as a possible targeted immune therapy for melanoma.

### KEYWORDS

3D tumor model;  
extracellular vesicle therapy;  
M1 macrophage;  
melanoma; miRNA