



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANA EMÍLIA GOULART

**Impactos do silenciamento do RNA não codificante PCA3
em células de câncer de próstata**

Orientador (es): Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino
Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

RIO DE JANEIRO

2014



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANA EMÍLIA GOULART

**Impactos do silenciamento do RNA não codificante PCA3
em células de câncer de próstata**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador (es): Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino
Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

RIO DE JANEIRO

2014

G694i Goulart, Ana Emília.

Impactos do silenciamento do RNA não codificante PCA3 em células de câncer de próstata / Ana Emília Goulart. – Rio de Janeiro, 2014.

xxii, 103 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientadores: Martin Hernan Bonamino; Etel Rodrigues Pereira Gimba.

1. Neoplasia da Próstata. 2. PCA3. 3. Silenciamento I. Bonamino, Martin (orient). II. Gimba, Etel Rodrigues Pereira (orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99463



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANA EMÍLIA GOULART

**IMPACTOS DO SILENCIAMENTO DO RNA NÃO CODIFICANTE PCA3
EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

Orientador (es): Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino
Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Dr. José Andrés Morgado Díaz (INCA)
Prof. Dr. Dr. Luiz Eurico Nasciutti (INCA)
Prof. Dr. Dr. Akira Homma (FIOCRUZ)
Prof. Dr. Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá (INCA)
Prof. Dr. Dr. Marcos da Silva Freire (FIOCRUZ)

RIO DE JANEIRO

2014

Dedico este trabalho ao Sagrado Coração de Jesus e, também, à minha mãe amada, ao meu irmão e ao meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade, capacitação e sustentação que me foi dada para realizar o mestrado em oncologia no INCA, apesar de todos os aspectos desfavoráveis. Senhor, eu jamais conseguiria chegar até aqui sem o seu amor misericordioso.

Ao Divino Espírito Santo por me dar seus dons, principalmente sabedoria, discernimento e fortaleza.

À Virgem Maria por estar sempre cuidando de mim e de tudo ao redor.

À minha mãe amada, Genilde Maria dos Santos Santiago que sempre me apoiou e incentivou em tudo na vida! Agradeço pela força que me deu quando eu já não aguentava suportar as dificuldades da caminhada. Mãe, você é meu exemplo de vida! Obrigada por tudo! Eu te amo!

Ao meu irmão querido Joselino Goulart Junior que sempre me incentivou e sempre me deu força para lutar por todos os meus sonhos! Irmão, obrigada por sempre acreditar em mim!

Ao meu pai Joselino Goulart.

Ao meu noivo, em breve, marido, Carlos André Accacio Lemos pela paciência, compreensão, apoio, incentivo, força, amor e ajuda técnica como designer gráfico. Eu te amo, Carlos!

Ao Diretor Artur Couto e ao Vice-Diretor Dr Marcos da Silva Freire de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, à gerente do Programa de Biofármacos (PBIO), MSc Nadia Maria Batoreu e, ao gerente do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), Dr. Marco Alberto Medeiros pela oportunidade de desenvolver um projeto de colaboração com o INCA dentro do convênio interinstitucional entre a FIOCRUZ e o INCA. Agradeço ainda pela oportunidade de desenvolver minha dissertação de mestrado dentro desta colaboração.

À Nadia Maria Batoreu pelo apoio, incentivo, orientação, discussões científicas, oportunidades, ensinamentos, conselhos, exemplo, amizade e carinho. Muito obrigada por confiar e acreditar em mim.

Aos colegas do Programa de Biofármacos, de modo especial a Ana Carolina, a Aline, o Carlos Otávio, Eneida e o José Procópio pelos ensinamentos e discussões técnico-científicas.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) pelas discussões científicas.

Ao Dr. Martin Bonamino por ter me recebido de braços abertos no INCA. Pelos ensinamentos, discussões científicas, incentivo, oportunidade, boas idéias, desafios, papos e amizade. Agradeço por ter me introduzido no universo dos vírus, do silenciamento por RNAi, dentre outros.

Ao grupo do Dr Martin Bonamino, de modo especial à Bianca, Douglas, Lorena, Mayra, Jackie, Diego, Andressa e Leonardo pela ajuda técnica, discussão científica, e amizade.

À Dra Etel Gimba por ter me dado a oportunidade de entrar no mundo do câncer de próstata. Agradeço pelos ensinamentos, discussões científicas, incentivo, oportunidade, boas idéias, desafios, papos, amizade, confiança, conselhos.

Ao grupo da Dra Etel Gimba, de modo especial à Luciana, Aline, Kivvi e Vanessa pela amizade, união, apoio, ombro amigo, incentivo, ajuda técnica, discussão científica. Meninas, vocês são especiais! À Paula pelo apoio no estudo dos co-reguladores da via do AR e ajuda técnica.

Ao Dr. Luiz Felipe Ribeiro Pinto, à Dra Sheila Coelho Soares Lima e à colega Isabela Gonzaga por terem cedido os oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão de genes com potencial *stemness*. Agradeço ainda por terem cedido os protocolos para a reação de RT-PCR e controles positivos.

Ao Dr José Andrés Morgado Díaz e ao Dr Waldemir Souza por terem cedido o anticorpo Vimentina-Cy3 utilizado na análise da expressão da proteína vimentina. Agradeço de modo especial ao Waldemir por ter realizado os ensaios comigo, além de ter cedido os protocolos.

À equipe técnica do Programa de Carcinogênese Molecular, de modo especial a Fernanda, a Monique e a Andréia, por toda a ajuda e apoio no dia a dia dos experimentos, por facilitarem nossa vida com a organização que nos proporcionam. Agradeço também pelo respeito, carinho e competência.

À todas as agências de suporte financeiro: CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ/ BIO-MANGUINHOS, INCA, INCT, Fundação do Câncer, Swiss Bridge Foundation.

À amiga Aretusa Goulart Andrade Macedo por me dar exemplo de força, amor e paz em uma fase tão difícil de sua vida! Por me ajudar mesmo passando por tribulações. Amiga, você é um grande exemplo de vida. Que Deus te abençoe sempre e te conserve assim! Você merece ser muito feliz ainda!

À querida Flávia Filippozzi por me ajudar na busca pela inteligência emocional.

À Angela Maria e todos os irmãos da Comunidade Eis o Cordeiro de Deus que sempre intercederam por mim junto a Deus.

"Comece a fazer o que é necessário, logo estarás fazendo o possível...
e, perceberás que estarás fazendo o impossível..."

São Francisco de Assis

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT	xxii
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Câncer de Próstata	1
1.1.1) Descrição do Câncer de Próstata	1
1.1.2) Epidemiologia do CaP	1
1.1.3) Etiologia do CaP	2
1.1.4) Relação do CaP com a via do Receptor de Androgênio (AR)	4
1.1.5) Co-reguladores da Via do AR	6
1.1.6) Diagnóstico do CaP	11
1.1.7) Tratamento do CaP	12
1.2) Progressão do CAP	15
1.2.1) CaP resistente à castração (CRPC)	15
1.2.2) Transição Epitelial Mesenquimal (do inglês <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> ou EMT)	17
1.2.3) Potencial Stemness	22
1.3) RNA não codificante	23
1.3.1) Descrição e Classificação dos RNAs não codificante (do inglês <i>non coding RNA</i> ou ncRNA)	23
1.3.2) ncRNA PCA3	24
1.4) Perspectivas de novas ferramentas para tratamento do CaP	27
1.4.1) RNA de interferência	27
1.4.2) Silenciamento transiente e silenciamento estável	30
1.4.2.1) Vetores Virais	30
2) OBJETIVOS	33
2.1) OBJETIVOS GERAIS	33
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3) MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1) Síntese das sequências <i>small interfering RNA</i> (siRNA)	34
3.2.) Desenho das sequências de <i>short hairpin</i> (shRNA)	35

3.3) Etapas de Preparo e Clonagem dos shRNAs	38
3.3.1) Anelamento dos oligonucleotídeos	38
3.3.2) Fosforilação dos oligonucleotídeos.....	38
3.3.3) Clonagem dos oligos no plasmídeo pLVTHM.....	38
3.3.4) Transformação.....	39
3.3.5) Cultura de bactérias para seleção dos clones que possuem o shRNA de interesse	40
3.3.6) Extração de DNA plasmidial	40
3.3.7) Triagem de colônias	40
3.3.8) Eletroforese em gel de agarose.....	40
3.3.9) Purificação de DNA de gel de agarose.....	41
3.4) Avaliação por sequenciamento de DNA das colônias selecionadas após a clonagem	41
3.5) Cultivo das Linhagens celulares	42
3.6) Produção de vetores lentivirais	42
3.7) Titulação dos vetores virais.....	45
3.8) Transdução das células LNCaP com partículas virais	45
3.9) Avaliação e Monitoramento do percentual de células GFP positivas por Citometria de Fluxo	45
3.10) Avaliação da transdução das células LNCaP por microscópio invertido de fluorescência	46
3.11) Transfecção das células LNCaP com moléculas de siRNA.....	46
3.12) Extração de RNA Total	47
3.13) Síntese de cDNA	47
3.14) Análise da expressão qualitativa de genes com potencial <i>STEMNESS</i> por RT-PCR qualitativo	47
3.15) Análise do nível de expressão relativa de RNAm do PCA3, de genes envolvidos no programa de EMT e de co-reguladores do AR por qRT-PCR	49
3.15.1) Protocolo de qRT-PCR usado para amplificação do PCA3	49
3.15.2) Protocolo de qRT-PCR utilizado para amplificação dos transcritos marcadores de EMT	50
3.15.3) Protocolo de qRT-PCR usado para amplificação dos transcritos co-reguladores da via do AR	52
3.16) Análise do nível de expressão relativa de RNAm de 84 genes relacionados ao Câncer por PCR ARRAY.....	53

3.17) Contagem do número de células viáveis por Azul de Tripán	54
3.18) Marcação das células LNCaP interferidas com Vimentina-Cy3	54
3.19) Análise da expressão de vimentina por microscopia confocal	55
3.20) Análises Estatísticas	55
4) RESULTADOS.....	56
4.1) O nível de expressão do PCA3 encontra-se diminuído após o silenciamento transiente com siRNA.	56
4.2) O silenciamento do PCA3 promove desregulação da expressão de co-reguladores da via do AR.....	57
4.3) O PCA3 pode modular a sobrevivência das células LNCaP através de moléculas de transdução de sinal e de fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral.	58
4.4) Alguns marcadores do programa EMT podem estar envolvidos na modulação da sobrevivência das células de CaP regulada pelo PCA3	62
4.5) Expressão de genes com o perfil <i>STEMNESS</i> após o silenciamento do PCA3 em células LNCaP.	67
4.6) Construção de vetores lentivirais para expressão estável do shRNA específico para o PCA3.	68
4.7) Testagem da linhagem celular a ser utilizada nos experimentos <i>in vitro</i> de silenciamento estável do PCA3.....	73
4.8) Desenvolvimento de uma estratégia de silenciamento estável do ncRNA PCA3.....	75
4.9) Estudos <i>in vitro</i> a partir do silenciamento estável do PCA3.....	81
5) DISCUSSÃO	83
6) CONCLUSÃO	90
7) PERSPECTIVAS.....	91
8) REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sequência de siRNA específica para o PCA3 e siRNA scramble utilizada neste estudo.....	34
Tabela 3.2: Sequências de shRNA específicas para o PCA3 e shRNA scramble utilizadas neste estudo.....	36
Tabela 3.3: Fragmentos das sequências de shPCA3 e shScrb1.....	37
Tabela 3.4: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na reação de sequenciamento.....	41
Tabela 3.5: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na reação de RT-PCR convencional para avaliar a expressão de genes com potencial STEMNESS.....	48
Tabela 3.6: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR para avaliar a expressão de PCA3 após a interferência com siPCA3.....	50
Tabela 3.7: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR para avaliar a expressão de marcadores EMT após a interferência com siPCA3.....	51
Tabela 3.8: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR para avaliar a expressão de co-reguladores da via do AR após a interferência com siPCA3	52
Tabela 4.1: Função de cada um dos 16 genes cuja expressão relativa de RNAm se encontra alterada	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estimativa da incidência de câncer na população brasileira masculina para o ano de 2014	2
Figura 1.2: Diagrama demonstrando a ação do androgênio	5
Figura 1.3: Atuação dos co-reguladores na região promotora de genes alvo do AR	6
Figura 1.4: Cinco vias possíveis desenvolvidas por células de CaP resistentes à castração.....	16
Figura 1.5: Algumas alterações morfológicas e genéticas que ocorrem durante a EMT.....	18
Figura 1.6: Estrutura completa do gene PCA3.....	25
Figura 1.7: Mecanismos de silenciamento gênico mediado por RNAi.....	29
Figura 3.1: Localização do RNA de interferência para o PCA3.....	34
Figura 3.2: Desenho base da Sequência de shRNA utilizada na estratégia de clonagem das sequências de shRNA no plasmídeo pLVTHM	35
Figura 3.3: Clonagem dos shRNAs no plasmídeo pLVTHM.....	39
Figura 3.4: Esquema da geração de partículas virais	43
Figura 3.5: Mapa do plasmídeo pLVTHM.....	44
Figura 4.1: Nível de expressão relativa de mRNA do PCA3 em células LNCaP 36h após a interferência com siRNA	56
Figura 4.2: Perfil de expressão gênica de co-reguladores da via do AR 36h após o silenciamento transiente do PCA3 em células LNCaP.....	58
Figura 4.3: Análise do impacto da interferência do PCA3 nas principais vias de sinalização do câncer por PCR ARRAY	61
Figura 4.4: Perfil de expressão de genes marcadores (A) epiteliais e (B) mesenquimais do programa de EMT 36h após a interferência de células LNCaP com siPCA3 em relação às células transfectadas com siScrb1.....	63
Figura 4.5: Expressão da vimentina 36h após interferência das células LNCaP com siPCA3 em comparação às células transfectadas com siScrb1.....	66
Figura 4.6: Perfil de expressão de genes responsáveis pelo potencial STEMNESS (NANOG, Oct 4 e SOX 2) 36h após o silenciamento do PCA3.....	68
Figura 4.7: Clonagem das sequências shPCA3 2 e shPCA3 3 no vetor plasmidial pLVTHM	69

Figura 4.8: Clonagem das sequências shScrambled PCA3 2 e shScrambled PCA3 3 no vetor plasmidial pLVTHM	71
Figura 4.9: Análise da eficiência de transdução de células LNCaP com vetor viral por citometria de fluxo	74
Figura 4.10: Monitoramento por microscopia de fluorescência da transdução de células LNCaP com vetores virais carreando sequências de shRNA específicas para o PCA3.....	77
Figura 4.11: Monitoramento por microscopia de fluorescência da transdução de células LNCaP com vetores virais carreando sequências de shRNA específicas para o PCA3.....	78
Figura 4.12: Avaliação por citometria de fluxo da transdução de células LNCaP com vetores virais carreando sequências de shRNA específicas para o PCA3 e sequências de shRNA <i>scramble</i>	79
Figura 4.13: Monitoramento das células LNCaP GFP positivas ao longo do tempo por citometria de fluxo após a transdução com vetores virais carreando sequências de shRNA específicas para o PCA3.....	81
Figura 4.14: Estudos <i>in vitro</i> realizados logo após o silenciamento estável do PCA3.....	82
Figura 5.1: Sugestão do papel do PCA3 na modulação da transcrição gênica de diversas vias de sinalização relacionadas ao câncer.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

18S	RNA ribossomal 18S – <i>18S ribosomal RNA</i>
AIB1	Amplificado em câncer de mama 1 – <i>Amplified in breast cancer 1</i>
AKT	Proteína Cinase B – <i>Protein Kinase B</i>
AMP	Adenosina Monofosfato – <i>Adenosine Monophosphate</i>
AP-1	Proteína Ativadora 1 – <i>Activator Protein 1</i>
AR	Receptor de Androgênio – <i>Androgen Receptor</i>
ARA	Proteína associada ao receptor de androgênio – <i>Androgen Receptor Associated protein</i>
AREs	Elementos responsivos ao androgênio – <i>Androgen Responsive Elements</i>
ATCC	Coleção Americana de tipos de Cultura – <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato – <i>Adenosine Triphosphate</i>
BAD	Promotor de morte associado a Bcl-2 – <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BCL-2	Linfoma 2 de célula B – <i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	Câncer de Mama 1 – <i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	Câncer de Mama 2 – <i>Breast cancer 2</i>
BSA	Albumina bovina sérica – <i>Bovine serum albumin</i>
CaP	Câncer de Próstata – <i>Prostate Cancer</i>
CAPB	Associação entre o CaP clinicamente significativo e o tumor de cérebro glioblastoma multiforme - <i>Carcinoma Prostate Brain</i>
CBP	proteína ligadora de CREB – <i>CREB-binding protein</i>
CD	Cluster de diferenciação – <i>Cluster of differentiation</i>
CDK4	cinase dependente de ciclina 4 – <i>Cyclin-dependent Kinase 4</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar – <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CEE	Carcinoma Epidermóide de Esôfago – <i>Esophageal Epidermoid Carcinoma</i>
CG	Citosina/Guanina – <i>Cytosine/ Guanine</i>
Clal	Enzima de Restrição derivada de <i>Caryophanon latum</i> – <i>Restriction Endonuclease derived from Caryophanon latum</i>
CO2	Dióxido de carbono – <i>Carbon Dioxide</i>

COL18A1	Colágeno tipo XVIII, alfa 1 – <i>Collagen, type XVIII, alpha 1</i>
CPRC	Câncer de Próstata Resistente à Castração – <i>Castration-resistant prostate cancer</i>
CPRH	Câncer de Próstata Resistente a Hormônio – <i>Hormony resistant prostate cancer</i>
CREB	Proteína ligadora do elemento responsivo a AMP cíclico – <i>c-AMP response element-binding protein</i>
CBP	proteína ligadora de CREB – <i>CREB binding protein</i>
CDKN1B ou p27	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1 B – <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1 B</i>
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico - <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DD3	Expressão Diferencial 3 – <i>Differential Display code 3</i>
desvpad	Desvio Padrão – <i>Standard Deviation</i>
DHT	Dihidrotestosterona – <i>Dihydrotestosterone</i>
DMEM	Meio de cultura modificado – <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico – <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato – <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DU145	Linhagem celular de CaP derivada de metástase de cérebro – <i>prostate cancer cell line derived from metastatic site: brain</i>
Ebp1	proteína de ligação de ErbB3 – <i>ErbB3 binding protein</i>
E-caderina	Caderina epitelial – <i>Epithelial Cadherin</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético – <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF1a-CD20	Fator de alongamento alfa 1 – cluster de diferenciação 20 – <i>Elongation factor 1 alfa – cluster of differentiation 20</i>
EMT	Transição epitelial mesenquimal – <i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>
ErbB	Receptor do fator de crescimento epidermal – <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERBB2	V-erb-b2 homólogo 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica, homólogo do oncogene derivado de neuro-glioblastoma (aviário) – <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERG	Gene relacionado à ETS – <i>ETS-related gene</i>

ETS	Família de fatores de transcrição denominada E- 26 – <i>E-twenty six family transcription factors</i>
ETV	Variante de translocação ETS – <i>ETS translocation variant</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase – <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	Proteína fluorescente verde – <i>Green Fluorescent Protein</i>
H1	Promotor H1 – <i>H1 promoter</i>
HAT	Histona Acetiltransferase – <i>Histone Acetyltransferase</i>
HDAC	Histonas Deacetilase – <i>Histone Deacetylase</i>
HEK293	Células de rim embrionário humano - <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência humana – <i>Human Immunodeficiency virus 1</i>
HOTAIR	RNA intergênico antisense Hox – <i>Hox antisense intergenic RNA</i>
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna – <i>Benign prostatic hyperplasia</i>
HPC	Câncer de Próstata Hereditário – <i>Hereditary Prostate Cancer</i>
HPCX	Câncer de Próstata Hereditário, ligado ao X – <i>Hereditary Prostate Cancer, X-linked</i>
HSP	Proteínas de choque térmico – <i>Heat Shock Protein</i>
IFNB1	Interferon beta 1 – <i>Interferon, beta 1</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ITGB1	Integrina beta 1 – <i>Integrin , beta 1</i>
Kb	Quilobases – <i>Kilobases</i>
KLK 3	Calicreína – <i>Kallikrein-3</i>
LB	Meio Luria-Bertani – <i>Agar Luria Bertani</i>
LNCaP	Linhagem celular de CaP derivada de metástase linfonodal - <i>prostate cancer cell line derived from metastatic site: linfonodes</i>
lncRNAs	RNA não codificante longo - <i>long non coding RNA</i>
M	Molar
MALAT1	Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmão associado à metástase – <i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i>
MAP2K1	Cinase 1 de proteína cinase ativada por mitógeno – <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno – <i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MET	Transição mesenquimal epitelial – <i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio – <i>Magnesium Chloride</i>
miR	miRNAs ou Micro – RNAs – <i>miRNAs or Micro – RNAs</i>
miRNAs	Micro – RNAs - <i>Micro – RNAs</i>
mL	Mililitros - <i>Mililiters</i>
MluI	Enzima de Restrição derivada de <i>Micrococcus luteus</i> – <i>Restriction Endonuclease derived from Micrococcus luteus</i>
MLV	Vírus derivado de leucemia murina – <i>Murine Leukemia vírus</i>
mRNA	RNA mensageiro – <i>Messenger RNA</i>
MTA2	Membro 2 da família 1 associada à metástase – <i>Metastasis associated 1 family, member 2</i>
MTSS1	Supressor de metástase 1 – <i>Metastasis supresor 1</i>
NaCl	Cloreto de Sódio – <i>Sodium Chloride</i>
N-caderina	Caderina neural – <i>Neural Cadherin</i>
ncRNA	RNA não codificante - <i>Non Coding RNA</i>
NFkB	Fator nuclear Kappa B – <i>Factor nuclear Kappa B</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônia – <i>Ammonium chloride</i>
°C	Graus Celsius – <i>Celsius degrees</i>
Oct-4	Fator de transcrição octâmero 4 – <i>octamer-binding transcription factor 4</i>
ORFs	Região aberta de leitura – <i>open reading frame</i>
pb	pares de base – <i>base pairs</i>
PBS	Tampão fosfato salina – <i>phosphate buffered saline</i>
PC3	linhagem celular de CaP derivada de metástase óssea – <i>prostate cancer cell line derived from metastatic site: bone</i>
PCA3	Antígeno 3 do câncer de próstata - <i>Prostate Cancer Antigen 3</i>
PCAP	Pré-disposição para o Câncer de Próstata – <i>Predisposing for prostate cancer</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIK3R1	Subunidade regulatória 1 (alfa) da fosfoinosídeo 3-cinase – <i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
PLAUR	Receptor de uroquinase, ativador de plasminogênio – <i>Plasminogen activator, urokina receptor</i>
PM	Peso Molecular – <i>Molecular Weight</i>

pol III	Polimerase III – <i>Polymerase III</i>
PR	Prostatectomia Radical – <i>Radical Prostatectomy</i>
pré-miRNAs	Pré- microRNAs – <i>pre-microRNAs</i>
PSA	Antígeno Específico da Próstata – <i>Prostate Specific Antigen</i>
qRT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase com Transcrição Reversa quantitativa – <i>quantitative-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
R ²	Coeficiente de determinação – <i>Coefficient of determination</i>
RISC	Complexo de Silenciamento induzido por RNA – <i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido Ribonucléico – <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA de interferência – <i>RNA interference</i>
RNAr	RNA ribossomal – <i>ribosomal RNA</i>
RNAseL	Ribonuclease L – <i>Ribonuclease L</i>
rpm	rotações por minuto – <i>rotations per minute</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com transcriptase Reversa - <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino – <i>Serum Fetal Bovine</i>
SHBG	Globulina de ligação a hormônio sexual – <i>sex-hormone-binding globulin</i>
shPCA3 2	Sequência 2 de <i>Short Hairpin RNA</i> específica para PCA3 – <i>sequence 2 of short hairpin PCA3</i>
shPCA3 3	Sequência 3 de <i>Short Hairpin RNA</i> específica para PCA3 - <i>sequence 3 of short hairpin PCA3</i>
shRNA	Pequeno RNA contendo estrutura em grampo – <i>short hairpin RNA</i>
shScrb1 PCA3 2	Sequência 2 de <i>Short Hairpin RNA Scramble</i> – <i>sequence 2 of short hairpin PCA3 Scramble</i>
shScrb1 PCA3 3	Sequência 3 de <i>Short Hairpin RNA Scramble</i> – <i>sequence 3 of short hairpin PCA3 Scramble</i>
siPCA3	Pequeno RNA de interferência específico para o PCA3 – <i>Small interference PCA3</i>
siRNAs	Pequeno RNA de interferência – <i>small interference RNA</i>
siScrb1	Pequeno RNA de interferência aleatório – <i>Small interference RNA scrambled</i>
snoRNAs	pequenos RNAs nucleolares – <i>small nucleolar RNA</i>

snRNA	pequenos RNAs nucleares – <i>small nuclear RNA</i>
Sox2	Região Y determinante de sexo – parte 2 - <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
SRC-1	co-ativador receptor de esteróide 1 – <i>steroid receptor co-activator 1</i>
Stat3	Transdutor de Sinal e Ativador de transcrição 3 – <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA – <i>Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer</i>
Taq	Polimerase – <i>Termus aquaticus polymerase</i>
TCF/LEF-1	Fator 1 de célula T/ Fator 1 de crescimento linfóide – <i>T-cell factor - 1/ Lymphoid enhancing factor-1</i>
TERT	Transcriptase Reversa da telomerase – <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TGF- β	Fator de crescimento transformante – <i>Transforming Growth Factor</i>
TIF-2	Fator Intermediário Transcricional 2 – <i>Transcriptional Intermediary Factor 2</i>
TLRs	Receptores do tipo <i>toll</i> - <i>Toll like Receptors</i>
TMPRSS2	Protease transmembrana Serina 2 – <i>Transmembrane Protease, Serine 2</i>
TNFRSF25	Membro 25 da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral – <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25</i>
TNM	Classificação Tumor-Nódulo-Metástase – <i>Tumor Node Metastasis classification</i>
TR	Toque retal – <i>Rectal examination</i>
UV	Ultravioleta – <i>Ultraviolet</i>
VEGFA	Fator de crescimento do endotélio vascular – <i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VSV-G	Glicoproteína G do vírus da Estomatite Vesicular – <i>Vesicular stomatitis virus G glycoprotein</i>
Wt	Selvagem – <i>Wild Type</i>
XbaI	Enzima de Restrição derivada de <i>Xanthomonas badrii</i> - <i>Restriction Endonuclease derived from Xanthomonas badrii</i>
$\Delta\Delta$ CT	Método de análise de quantificação Delta Delta CT – <i>Delta Delta Cycle Threshold Method</i>

RESUMO

Introdução: O PCA3 é um RNA não codificante (ncRNA), expresso especificamente na próstata, estando envolvido no controle da sobrevivência de células de carcinoma de próstata (CaP), através da via de sinalização do receptor de androgênio (AR). **Objetivo:** Investigar se diversos genes relacionados ao câncer – incluindo os envolvidos na Transição Epitelial Mesenquimal (EMT), os que apresentam potencial *stemness* e os co-reguladores do AR – podem estar envolvidos no processo de resposta ao silenciamento do PCA3. Além disso, objetivamos promover o silenciamento estável do PCA3 através da construção de um vetor lentiviral carreando *short hairpin RNA* (shRNA) específico para este ncRNA, vislumbrando estratégias terapêuticas para o CaP. **Metodologia:** Empregamos *small interfering RNA* (siRNA) ou shRNA com expressão baseada em vetores lentivirais para diminuir a expressão de PCA3 em células LNCaP e avaliar os efeitos deste silenciamento na sobrevivência destas células. Para isto, analisamos por qRT-PCR a expressão do PCA3 e de diversos genes relacionados ao câncer. Utilizamos microscopia confocal para analisar a expressão da proteína vimentina. Empregamos citometria de fluxo para verificar o percentual de células LNCaP GFP+ e, azul de tripan para avaliar o número de células viáveis, após o silenciamento estável do PCA3. **Resultados:** Dentre os co-reguladores do AR, ARA 70, ARA 54, Smad3 e EBP1 apresentaram expressão aumentada nas células LNCaP interferidas com siPCA3 em relação às células LNCaP interferidas com siScrb1, enquanto Smad 4 e ciclina D1 apresentaram expressão diminuída. Dentre 84 genes relacionados ao câncer, 16 apresentaram expressão alterada em células LNCaP- siPCA3 em relação ao controle. Destes, 30% codificam moléculas de transdução de sinais e fatores de transcrição. Observou-se expressão aumentada de E-caderina, Claudina-3, Citoqueratina-18, Snail, Twist e Slug em células LNCaP -siPCA3 em relação ao controle, enquanto observou-se expressão diminuída de Claudina-4, Citoqueratina-8 e Vimentina. O padrão de marcação de vimentina foi similar em células LNCaP – siPCA3 e células LNCaP – siScrb1. Não foi detectada a expressão de genes com potencial *stemness* nas condições testadas. Células transduzidas com vetores lentivirais carreando shPCA3 apresentaram diminuição estável da expressão do PCA3. Foi observada redução estável de cerca de 60% de células LNCaP GFP+ transduzidas com shPCA3, além de redução no número de células viáveis. **Conclusão:** O silenciamento do PCA3 reduz o número de células viáveis, através de um processo que envolve moléculas de transdução de sinais e fatores de transcrição que podem orquestrar a sobrevivência das células de CaP. A diminuição no número de células viáveis após a transfecção com siPCA3 parece não ser modulada pelo programa EMT clássico, embora a reversão parcial deste programa possa estar regulando a diminuição da sobrevivência celular induzida por siPCA3. A desregulação da expressão de co-reguladores do AR observada pode estar envolvida na inibição da expressão dos genes alvo do AR. Nossos dados sugerem que este ncRNA desempenha papel regulador na transcrição gênica, sendo capaz de modular a expressão de genes de diversas vias de sinalização relacionadas ao câncer. Nossos resultados sugerem ainda que a redução estável do PCA3 apresenta potencial aplicação em estratégia terapêuticas que visem modular negativamente a sobrevivência das células de CaP.

Palavras-chave: 1. Câncer de Próstata 2. PCA3 3. Silenciamento

ABSTRACT

Introduction: PCA3 is a prostate specific non coding RNA (ncRNA), involved in the control of prostate cancer (PCa) cell survival, through modulating androgen receptor (AR) signaling. **Objective:** In order to better characterize the molecular mechanisms by which PCA3 is controlling LNCaP cell survival, we aimed to investigate whether several cancer related genes, including those involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), stemness potential and AR co-regulators could be involved in this process in response to PCA3 downregulation. Moreover, we aimed to promote PCA3 stable silencing through a lentiviral vector containing a PCA3 short hairpin RNA (shRNA) specific sequence. **Methodology:** We used small interfering RNA (siRNA) or lentivirus vectorbased shRNA to downregulate PCA3 expression and evaluate the effects of this ncRNA knockdown on LNCaP cell survival. After PCA3 downregulation, cells were analyzed by qRT-PCR to investigate PCA3 and several cancer related genes expression. Confocal microscopy was performed to analyze vimentin expression. Flow cytometry was performed to analyze the percentage of LNCaP GFP positive cells and trypan blue staining to analyse the number of viable cells after PCA3 stable silencing. **Results:** Among AR co-regulators genes investigated, ARA70, ARA54, Smad 3 and EBP1 were upregulated in siPCA3-transfected cells in relation to scramble sequence LNCaP transfected cells, while Smad 4 and cyclin D1 were downregulated. We found that among 84 cancer-related genes tested, 16 were differentially expressed in LNCaP siPCA3-transfected cells when compared to transfected cells with a scramble sequence. Of these, 30% are genes coding for signal transduction molecules and transcription factors. Gene expression profile of EMT-related genes revealed that E-cadherin, Claudin-3, Cytokeratin-18, Snail, Twist and Slug are upregulated in LNCaP siPCA3-transfected cells compared to control, while Claudin-4, Cytokeratin-8 and Vimentin are downregulated. Vimentin expression staining patterns were similar between LNCaP siPCA3-transfect cells and control. Expression of stemness markers were not detected in these tested conditions. LNCaP cells transduced with lentiviral vectors carrying the GFP gene and shPCA3 stably downregulated PCA3 expression, producing a reduction of 60% of LNCaP GFP+ cells compared to shScrb1 transduced or non-transduced LNCaP cells. In addition, the number of viable cells was reduced after PCA3 stable silencing. **Conclusion:** PCA3 downregulation by RNAi leads to a loss of viability, through a process that involves key signal transduction molecules and transcription factors that could orchestrate PCa cells survival. Our results also suggested that the decrease in the number of LNCaP viable cells, observed after siPCA3 transfection, seems to don't be modulated by the classical EMT program, although a partial reversion of this program could regulate the reduction of cell survival induced by siPCA3. Observed deregulated expression of AR co-regulators could be involved in the inhibition of the AR target genes expression. Our data suggest that that this ncRNA perform a regulatory role in gene expression, being able to modulate gene expression of several signaling pathways related to cancer. Moreover, our results suggest that the stable downregulation of PCA3 expression shows potential as a PCa therapeutic approach by negatively modulation cell survival.

Keywords: 1. Prostate Cancer 2. PCA3 3. Gene silencing

1) INTRODUÇÃO

1.1) Câncer de Próstata

1.1.1) Descrição do Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é o tumor mais freqüente em homens, exceto tumores de pele não melanoma. Como se trata de uma doença associada ao aumento da idade, é esperado que a incidência aumente com o envelhecimento da população (Estimativa INCa, 2014). O CaP é uma doença silenciosa em sua fase inicial. Muitos pacientes não apresentam sintomas ou apresentam sintomas muito parecidos com os sintomas de HPB (hiperplasia prostática benigna), tais como dificuldade de urinar ou necessidade de urinar mais vezes. Na fase avançada, o CaP pode provocar dor óssea, sintomas urinários ou, ainda, infecção generalizada e insuficiência renal em casos mais graves (<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/sintomas>).

As metástases do CaP são encontradas mais frequentemente nos ossos, linfonodos, fígado e pulmões (BUBENDORF e cols, 2000).

1.1.2) Epidemiologia do CaP

Atualmente, o CaP é a malignidade mais comumente diagnosticada e a terceira causa de morte entre homens em países desenvolvidos (SUTCLIFFE e COLDITZ, 2013). A previsão para o ano 2015 é de 1.220.141 novos casos de CaP diagnosticados no mundo e 79.882 novos casos de CaP diagnosticados no Brasil (GLOBOCAN/ IARC, 2012). A estatística de câncer nos EUA estima cerca de 233 mil novos casos de CaP, equivalendo a cerca de 27% do total de câncer que acometerá a população americana masculina em 2014 (SIEGEL e cols, 2014). O INCA estima cerca 69 mil novos casos de CaP em 2014, significando cerca de 22% do total de 302.350 neoplasias que acometerão aos homens no país (INCa, 2014), conforme descrito na Figura 1.1.

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	68.800	22,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%
Estômago	12.870	4,3%
Cavidade Oral	11.280	3,7%
Esôfago	8.010	2,6%
Laringe	6.870	2,3%
Bexiga	6.750	2,2%
Leucemias	5.050	1,7%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%
Linfoma não-Hodgkin	4.940	1,6%
Pele Melanoma	2.960	1,0%
Linfoma de Hodgkin	1.300	0,4%
Glândula Tireoide	1.150	0,4%
Todas as Neoplasias sem pele*	203.930	
Todas as Neoplasias	302.350	



Figura 1.1: Estimativa da incidência de câncer na população brasileira masculina para o ano de 2014 (INCa, 2014).

Em 2012, foram estimadas 307.471 mortes por CaP no mundo e 17218 no Brasil (GLOBOCAN/ IARC, 2012). Assim como a incidência, a mortalidade por esse câncer apresenta perfil ascendente, porém o CaP pode ser considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado de forma adequada e precoce. A mortalidade por CaP é relativamente baixa, se comparada com o número total de casos diagnosticados (INCa, 2014). Isso porque a maioria dos pacientes morre em consequência de outra doença.

1.1.3) Etiologia do CaP

O aumento da idade, o histórico familiar, a etnia, a condição de viver ou migrar para nações do Ocidente ou ser descendente africano são fatores de risco para o câncer de próstata. Atualmente, outros fatores de risco também são considerados: a altura, a frequência de ejaculação, o tempo de exposição a andrógenos, a exposição a infecções sexualmente transmissíveis (SUTCLIFFE e COLDITZ, 2013).

Além disso, certas alterações genéticas podem estar envolvidos na etiologia do CaP, sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e no restante por alterações genéticas esporádicas (HUGHES e cols, 2005). Foram identificadas mudanças nos genes do AR, RNaseL (1q25.3), ELAC2 (17p11), MSR1 (8p22-23), BRCA1 (17q21) e 2 (13q12-13), HPCX (Xq27-28), KLF6, HPC20 (20q13), HPC1

(1q23-25), PCAP (1q42-43), CAPB (1p36), HPC2 (17p) e genes de fusão, tais como o TMPRSS2-ERG (KUMAR e cols; 2004; KRAL e cols, 2011). Além destes, pode haver alteração genômica em oncogenes como C-MYC, BCL-2 e ERG e, também em genes supressores de tumor tais como o PTEN, NKX3-1 e p 53 (HUGHES e cols, 2005; AHMED e LI, 2013;). Mutações no gene codificador do receptor de androgênio (AR) são comuns, tanto no CaP primário quanto no avançado, apresentando uma frequência de cerca de 50% em câncer de próstata avançado (AHMED e LI, 2013). Estudos Suíços e Americanos mostraram que famílias que apresentam o gene HPC1 no braço longo do cromossomo 1, apresentaram ocorrência de CaP em até 5 parentes e isto ocorreu em pelo menos duas gerações, sendo que os casos ocorreram em uma faixa etária menor que a usual (SMITH e cols, 1996; GRÖNBERG e cols, 1997).

Com relação a polimorfismos associados ao CaP, foram identificados alguns, como o éxon 1 do gene do AR, que é um domínio de transativação com padrão de repetição. O tamanho destas repetições foi considerado importante, sendo que quanto menor este padrão de repetição, maior a incidência de CaP. Além disso, foram relatados casos de polimorfismo no gene associado com a atividade catalítica da enzima 5 α redutase (KUMAR e cols, 2004), no gene que atua no controle de ciclo celular (CDKN1B ou p27), no gene da enzima responsável pela biossíntese da testosterona (HUGHES e cols, 2005).

Dados da literatura mostram fusões gênicas e rearranjos cromossômicos recorrentes no câncer de próstata. Essas fusões gênicas no CaP são geralmente controladas por androgênio. A fusão do gene TMPRSS2 (que codifica uma serina protease transmembrana específica da próstata e responsiva ao androgênio) e de genes da família ETS (fatores de transcrição oncogênicos – ERG, ETV1, ETV4 ou ETV5) é a mais comum, presente em cerca de 50% de todos os casos de câncer de próstata analisados (KUMAR-SINHA e cols, 2008). As proteínas ETS atuam na regulação de várias funções celulares, como proliferação, diferenciação, angiogênese, apoptose e carcinogênese. A fusão do gene ERG com TMPRSS2 é a mais comum, estando presente em cerca de 50% das biópsias de próstata que apresentaram CaP (MOSQUERA e cols, 2009). A reunião dos dados de Cerveira e cols, 2006, Perner e cols, 2007 e Clarck e cols, 2008 sugerem que o rearranjo do gene ETS pode ser um evento inicial na carcinogênese da próstata. Translocações envolvendo outros membros da família ETS ocorrem mais raramente (KUMAR-SINHA e cols, 2008).

1.1.4) Relação do CaP com a via do Receptor de Androgênio (AR)

As células de CaP primário retêm algumas características de células normais da próstata e, então, respondem ao androgênio. Os hormônios androgênicos possuem um papel essencial na diferenciação e maturação sexual, na manutenção de espermatogênese e no desenvolvimento do órgão reprodutivo masculino (HEEMERS e TINDALL, 2007). Nos estágios mais avançados da vida, os androgênios asseguram a manutenção e o funcionamento do tecido prostático adulto (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Além dos efeitos no sistema reprodutivo masculino, os androgênios afetam uma ampla variedade de tecidos, incluindo pele, osso, músculo e tecido adiposo (HEEMERS e TINDALL, 2007). Os androgênios são os principais reguladores da razão entre proliferação e morte celular, tanto por estimularem a proliferação celular quanto por inibirem a apoptose. Sendo assim, a ablação de androgênio causa regressão do câncer (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). O principal androgênio circulante, a testosterona, é secretado pelas células de Leydig dos testículos ou é formado pela conversão periférica de esteroides adrenais. Estes circulam no sangue, onde se ligam à albumina e à globulina ligante a hormônios sexuais. Quando a testosterona entra na célula prostática, 90% dela é convertida a di-hidrotestosterona (DHT), pela enzima 5 α redutase. A DHT é o hormônio mais ativo, apresentando afinidade 5 vezes maior pelo receptor de androgênio (AR) que a testosterona. O AR é composto de um domínio ativador amino-terminal, um domínio ligante carboxi-terminal e um domínio de ligação de DNA. No estado basal, o AR é predominantemente localizado no citosol e se encontra ligado a proteínas de choque térmico (HSP) e a outras proteínas que previnem a ligação ao DNA (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Devido à alta afinidade pelo AR, a DHT é capaz de deslocar as HSPs ligadas ao AR, o qual sofre uma mudança conformacional e é fosforilado, em parte por ação da proteína cinase A. As mudanças conformacionais induzidas pelo ligante facilitam a formação de homodímeros de AR. Uma vez dimerizado e fosforilado, o AR transloca para o núcleo, onde se liga a elementos responsivos ao androgênio (AREs), localizados nas regiões promotoras dos genes alvo do AR. O complexo ativado formado por homodímeros de AR e DNA recruta proteínas co-reguladoras do complexo AR, facilitando ou prevenindo a interação do AR com o aparato de transcrição. Esta ativação ou repressão de genes alvo da via do AR leva a respostas biológicas como

o crescimento, a sobrevivência e expressão do antígeno específico da próstata (PSA) (FELDMAN e FELDMAN, 2001) (Figura 1.2).

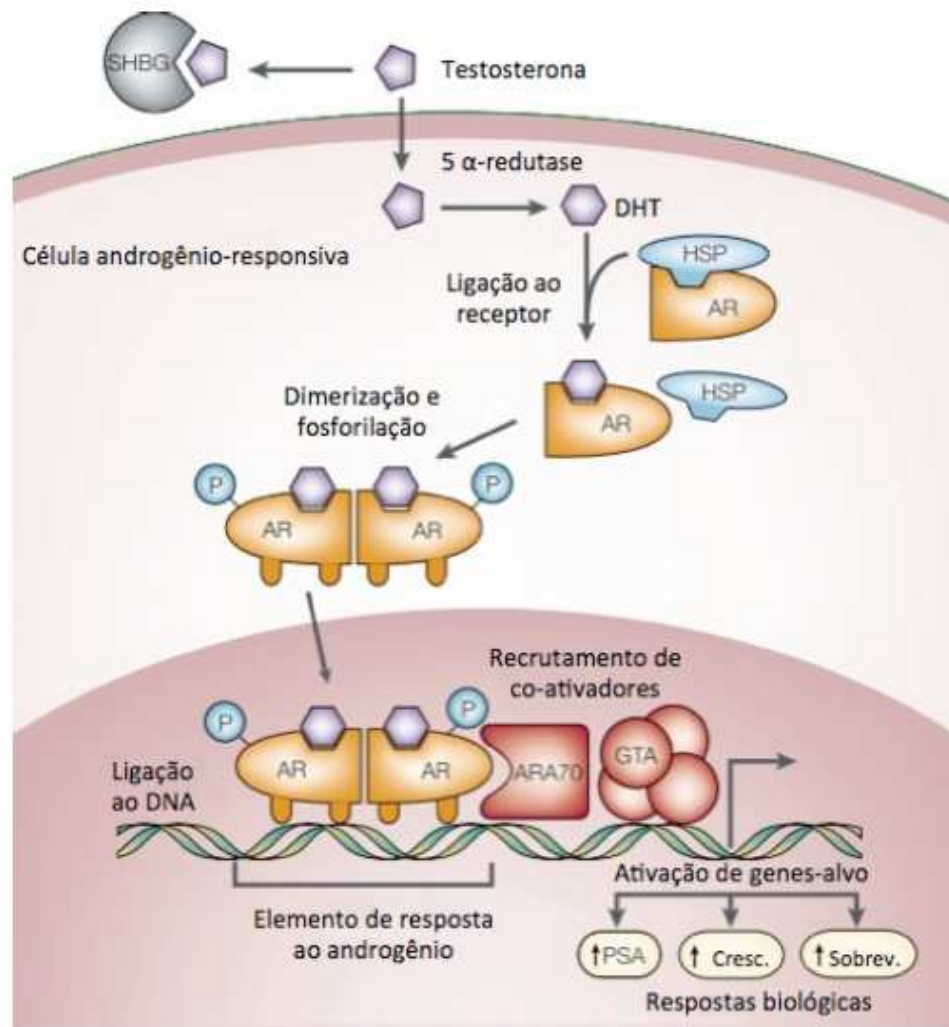


Figura 1.2: Diagrama demonstrando a ação do androgênio. A testosterona circula no sangue ligada à albumina (não mostrado) e à globulina de ligação a hormônio sexual (SHBG). A testosterona livre entra nas células da próstata e é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α-redutase. A ligação da DHT ao receptor androgênico (AR) induz a dissociação de proteínas de choque térmico (HSPs) e subsequente fosforilação do receptor. O AR se dimeriza e pode se ligar a elementos de resposta a androgênio (ARE) nas regiões promotoras de genes-alvo. Co-ativadores (tais como ARA 70) e co-repressores (não mostrados) também se ligam a complexos AR, facilitando ou impedindo, respectivamente, a sua interação com o aparelho geral de transcrição (GTA). Ativação (ou repressão) dos genes alvo do AR leva a respostas biológicas, incluindo o crescimento, sobrevivência e produção de antígeno prostático específico (PSA). (Modificado de FELDMAN & FELDMAN, 2001).

1.1.5) Co-reguladores da Via do AR

Os co-reguladores são macromoléculas biológicas que interagem com o AR (RAHMAN e cols, 2004) e permitem a interação do complexo do AR com o aparato de transcrição para estimular (no caso dos co-ativadores) ou inibir (no caso dos co-repressores) a transcrição dos genes alvo do AR (FELDMAN e FELDMAN, 2001). Os co-reguladores atuam na região promotora dos genes alvo e influenciam a transcrição mediada pelo AR, conforme mostrado na Figura 1.3.

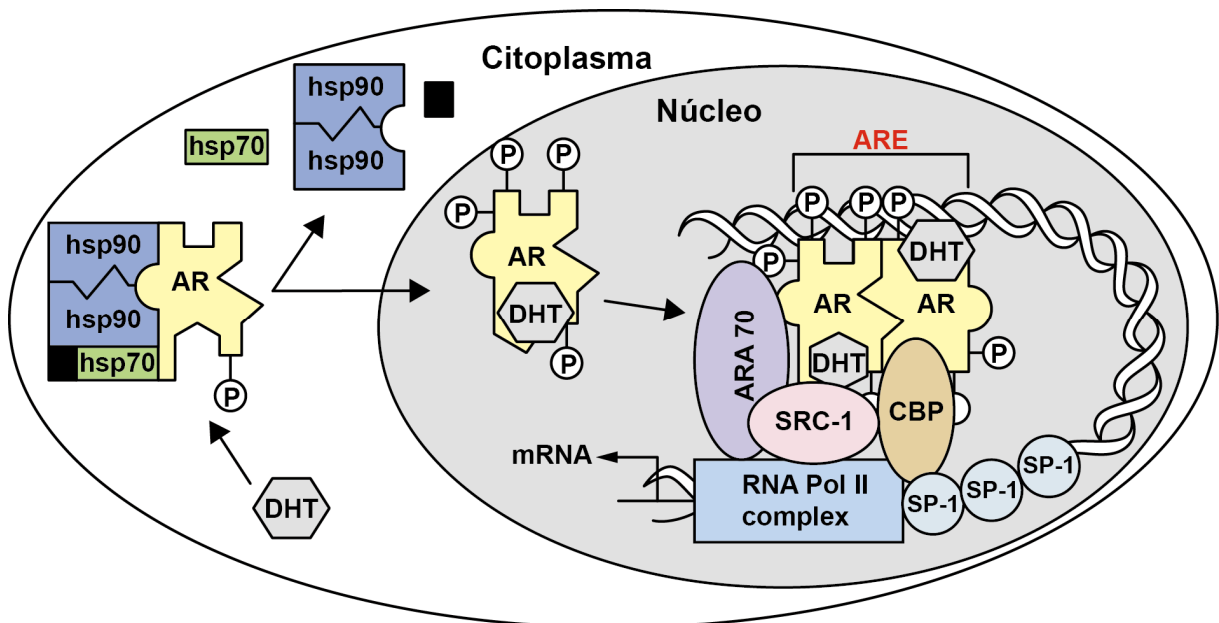


Figura 1.3: Atuação dos co-reguladores na região promotora de genes alvo do AR. Androgênios como o DHT difundem através da membrana plasmática e se ligam ao AR, que por sua vez, sofre mudanças conformacionais para estabilizar. O AR transloca para o núcleo onde sofre dimerização e se liga aos AREs. Os co-reguladores da via do AR, tais como os co-ativadores ARA 70, CBP e SRC-1 ou co-repressores (não mostrados) também se ligam a complexos AR, facilitando ou impedindo, respectivamente, a sua interação com o aparelho geral de transcrição. Ativação (ou repressão) dos genes alvo do AR leva a respostas biológicas. AR (receptor de androgênio); DHT (dihidrotestosterona); CBP (proteína ligadora de CREB); ARE (elemento de resposta ao androgênio); hsp (proteínas de choque térmico); SRC-1 (co-ativador receptor de esteróide 1) (GALANI e cols, 2008).

A atividade transcricional do AR é modulada por co-reguladores através de vários mecanismos, tais como o controle da afinidade do AR pelo ligante, a modulação do nível de expressão do AR, a modulação da translocação nuclear do AR, o recrutamento de fatores de transcrição (CHMELAR e cols 2007; HEEMERS e TINDALL, 2007) e a capacidade do AR se ligar ao DNA (RAHMAN e cols, 2004). Os co-ativadores podem facilitar a ligação do AR ativado ao DNA, remodelar a cromatina e/ ou recrutar os fatores de transcrição gerais associados com a RNA polimerase II, ou ainda garantir que o AR aumente a expressão gênica diretamente. Os co-repressores, por sua vez, modulam negativamente todas essas ações. Uma alteração na regulação da expressão dos genes co-reguladores do AR pode contribuir para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao androgênio ou ao AR, incluindo o CaP (RAHMAN e cols, 2004; CRAIG e cols, 2006).

Mais de 200 proteínas que se ligam ao AR já foram descritas na literatura e, muitas delas (cerca de 170) aumentam (co-ativadores) ou diminuem (co-repressores) sua capacidade transcricional (HEEMERS e TINDALL, 2007; WIJNGAART e cols, 2012;). Um grupo bem caracterizado de co-ativadores é a família p160 de proteínas, a qual é composta por SRC-1 (co-ativador receptor de esteróide 1), TIF-2 (fator intermediário transcricional 2) e AIB1 (amplificado em câncer de mama 1). Os co-ativadores p160 interagem com as regiões N e C-terminal do AR, promovendo o remodelamento da cromatina, através da atividade Histona Acetiltransferase (HAT) ou da atividade do complexo de remodelamento de cromatina dependente de ATP (CULIG e cols, 2004). O co-ativador SRC-1 é importante para a atividade transcricional em células de CaP. Pacientes que apresentam alto nível de expressão de SRC-1 apresentam maior risco de desenvolver tumores mais agressivos. TIF-2 é necessário para a atividade transcricional ótima do AR e para a proliferação de linhagens celulares de CaP dependente e independente de AR. A expressão de TIF-2 aumenta durante a progressão do CaP e é máxima em cânceres recorrentes que não respondem à terapia hormonal. SRC-1 e TIF-2 são requeridos para a indução ótima dos genes alvo do AR (AGOULNIK e cols, 2009).

O co-ativador p300 e o seu homólogo funcional CBP (proteína ligadora de CREB, a proteína ligadora do elemento responsivo a AMP cíclico) pertencem a outra classe de co-ativadores e são integradores transcricionais, já que podem atuar na interação com outras vias de sinalização. P300/CBP preenchem a maquinaria de transcrição de receptores nucleares, tais como o AR (CULIG e cols, 2004), e, podem

se ligar a proteínas alvo, regulando a afinidade de ligação ao DNA, ativando a transcrição, atuando na interação proteína-proteína, atuando na estabilidade de fatores de transcrição e se ligando a outras proteínas celulares através da acetilação. A acetilação do AR por sua vez aumenta a ligação dos co-ativadores e promove o crescimento celular de CaP. No CaP, p300 e CBP apresentam potencial oncogênico (SANTER e cols, 2011) e se encontram superexpressos, podendo induzir a transcrição de genes responsivos ao AR, mesmo na ausência ou na presença de AR em níveis muito baixos (SANTER e cols, 2011).

Os co-ativadores das famílias p160 e p300/CBP são recrutados após a ligação de dímeros de AR a regiões regulatórias de genes responsivos a androgênio. Proteínas p300 são recrutadas para regiões regulatórias através da sua interação com proteínas p160. A seguir, os níveis de acetilação de histonas enfraquecem sua interação com o DNA e ocorre o remodelamento da cromatina, permitindo a ligação da maquinaria de transcrição basal ao DNA (CULIG e cols, 2004)

Há ainda outra classe de co-ativadores que abrange as proteínas associadas ao receptor de androgênio (ou ARA) tais como o ARA 70, ARA 54 e ARA 55 que também modulam a transcrição do AR. Esses três co-ativadores se ligam ao domínio de ligação do ligante do AR (MIYOSHI e cols, 2003; Culig e cols, 2004). O ARA 70 é capaz de aumentar de forma muito intensa (cerca de 10 vezes) a atividade transcricional do AR, enquanto é capaz de aumentar a atividade transcricional de outros receptores esteroidais, tais como os receptores de glicocorticóide, de progesterona e de estrogênio em cerca de 2 vezes (GOLIAS e cols, 2009). Alguns estudos mostram que os níveis de ARA 70 se encontram aumentados em carcinomas de próstata de alto grau e linhagens de CaP, enquanto outros estudos mostram diminuição ou nenhuma mudança na expressão deste co-regulador ou na expressão deste co-ativador entre amostras de CaP e de próstata normal. Desse modo, a significância da interação AR-ARA70 na progressão do CaP permanece desconhecida (CHMELAR e cols, 2006). O ARA55 também não apresenta especificidade pelo AR, e também atua no receptor de glicocorticóide e de progesterona (MIYOSHI e cols, 2003), sendo capaz de se ligar ao AR de forma ligante dependente, aumentando sua capacidade transcricional (GOLIAS e cols, 2009). ARA 55 é expresso na linhagem celular de CaP derivada de metástase óssea PC3, mas não é expresso na linhagem celular de CaP derivada de metástase linfonodal LNCaP e na linhagem celular de CaP derivada de metástase de cérebro DU145 (MIYOSHI e cols, 2003; CULIG e cols, 2004). ARA 54 aumenta a atividade

transcricional do AR na linhagem celular DU145 (GOLIAS e cols, 2009). ARA 54 apresenta função ubiquitina ligase E3 (HEEMERS e TINDALL, 2007), atuando no processo de ubiquitinação de si mesma e de proteínas nucleares e, desse modo, permitindo a degradação por proteassoma (RAHMAN e cols, 2004).

Além dos co-ativadores supracitados, podemos citar ARA267, ARA160, supervilina, gelsolina, SWI/ SNF, dentre outros (HEEMERS e TINDALL, 2007).

Co-repressores são moléculas que se ligam diretamente ao AR e recrutam enzimas modificadoras de cromatina para evitar a ativação transcricional. No entanto, diversos outros mecanismos de ação dos co-repressores já foram descritos, tais como: regulação da interação dos domínios N e C terminais do AR; impedimento da translocação nuclear do AR; impedimento da associação do AR à cromatina; inibição do recrutamento de co-ativadores (BURD e cols, 2006). Os co-repressores que disparam condensação e/ ou modificações da cromatina recrutam histonas deacetilases (HDAC) para o complexo AR (BURD e cols, 2006). Estas enzimas tais como a histona deacetilase 1 (HDAC-1), reduzem a atividade transcricional do AR direta ou indiretamente através da deacetilação de resíduos de lisina de histonas (HEEMERS e TINDALL, 2007). Diversos co-repressores, tais como a ciclina D1, interagem com HDACs e utilizam os mecanismos de deacetilação para reprimir o AR (BURD e cols, 2006). Além de recrutar HDACs para reprimir a atividade do AR, a ciclina D1 inibe interações com os domínios N e C terminais do AR, interferindo assim na estabilidade do AR, na ligação do AR com a cromatina e na função de co-ativadores. A ciclina D1 se liga a co-ativadores (como SRC-1) e inibe a sua função (BURD e cols, 2006). A habilidade da ciclina D1 de se ligar diretamente e inibir o AR serve como *feedback* negativo para modular a atividade mitogênica do androgênio. Em 1997, Lu e cols mostraram que em células de CaP, o androgênio induz acúmulo de ciclina D1 e esta indução, por sua vez, é necessária para estimular atividade de cinase dependente de ciclina 4 (CDK4), estimulando a progressão do ciclo celular. Apesar destes dados terem sido confirmados por Knudsen em 1998, Petre e cols mostraram em 2002 que a indução de ciclina D1 em células de CaP inibe a proliferação celular através da sua habilidade de regular o AR. Desse modo, a função da ciclina D1 como um co-repressor pode apresentar impacto na resposta ao estímulo de androgênio e na regulação da via do AR no CaP (BURD e cols, 2006).

Outros co-repressores empregam complexos formados por proteínas regulatórias transcricionais e por histonas deacetilases para exercer a repressão transcricional do AR. Um exemplo destes co-repressores é a Ebp1, uma proteína de

ligação de ErbB3 que interage com o AR e inibe a transcrição mediada por ele (BURD e cols, 2006). Foi demonstrado que Ebp1 pode interagir com o receptor de androgênio na ausência de ligante, mas na presença de ligante, a interação Ebp1-AR é aumentada. Ebp1 medeia uma ligação entre os receptores ErbB e AR (ZHANG e cols, 2002).

A metilação de histonas também pode ser um indicativo de repressão da transcrição da cromatina, dependendo da posição da modificação da histona. Por exemplo, a metilação da lisina 9 na histona 3 pela metiltransferase está associada com a repressão da transcrição (HEEMERS e TINDALL, 2007).

Sabe-se que Smad 3 se liga ao AR, podendo aumentar ou diminuir a atividade funcional do AR, dependendo da presença de Smad 4. Smad 4, por sua vez pode interagir com o domínio de ligação ao DNA do AR, modulando assim a transativação do AR. Em células LNCaP, observou-se que Smad 3 é capaz de aumentar a transativação de AR, entretanto, na presença de Smad4, observou-se repressão dessa transativação, seguida da redução dos níveis do RNAm de PSA. Portanto, Smad 4 pode diminuir a interação Smad 3-AR e reprimir a transativação do AR aumentada por Smad 3. Smad 3 e 4 podem cooperar com o complexo histona deacetilase para modular a acetilação do AR (RAHMAN e cols, 2004). A ligação de Smad 3 e 4 ao AR pode mediar a interação entre a via do AR e a via de TGF- β (fator de crescimento transformante). O TGF- β apresenta um papel ambíguo na tumorigênese, pois é capaz de regular negativamente a via do AR, agir como um potente inibidor de células epiteliais prostáticas e induzir inibidores do ciclo celular. É também é capaz de promover o processo de malignização durante os estágios avançados da tumorigênese. Assim, ainda não está claro o significado da interação mediada por Smad 3/ 4 entre as vias de sinalização TGF- β e AR, embora se saiba que Smad 3 e 4 atuam como mediadores de sinalização intracelular de TGF- β na progressão do CaP (RAHMAN e cols, 2004).

Conforme descrito acima, os co-repressores atuam em praticamente todos os aspectos da regulação do AR, incluindo a modulação da localização do AR, a acessibilidade à cromatina e o recrutamento e ligação à co-ativadores.

1.1.6) Diagnóstico do CaP

O rastreamento do CaP é realizado através da dosagem sérica de PSA, da ultrassonografia transretal e do exame de toque retal (TR) (HEIDENREICH e cols, 2011).

O PSA é uma glicoproteína serino protease regulada por androgênio que é codificada pelo gene KLK3. O PSA é produzido pelas células da glândula prostática e encontra-se em grandes quantidades nas secreções prostáticas, apresentando a função de liquefazer o coágulo seminal, permitindo que os espermatozóides se movam livremente (PAL e cols, 2013). O PSA é uma proteína intraluminal que cai na circulação sanguínea quando o epitélio da próstata está rompido, o que ocorre em situações de inflamação e de câncer de próstata. Com isto, o PSA tem sido empregado para diagnosticar e monitorar homens com CaP (CRAWFORD e cols, 2013). A ultrassonografia transretal é utilizada para mapear as regiões da próstata e para guiar as agulhas durante a biópsia da próstata. O exame de TR é capaz de detectar tumores que se encontram na zona periférica da próstata e que alcançam mais de 0,2mL.

Quando a presença de nódulos é detectada no TR e o valor de PSA se encontra acima de 4 ng/mL, o paciente é encaminhado para biópsia guiada por ultrassonografia transretal. Após a biópsia, é realizada uma avaliação histológica do material coletado para determinar o grau de diferenciação celular, denominado Grau de Gleason. O sistema de graduação de Gleason leva em consideração as variações de tamanho, forma e propriedades celulares, sendo, portanto, um dos sistemas utilizados para classificar o CaP (GLEASON e MELLINGER, 1974). O outro sistema que classifica o CaP é denominado Tumor-Nódulo-Metástase (TNM). O sistema de estadiamento TNM avalia a localização e o tamanho do tumor e refere-se a sua extensão. Trata-se de um dos determinantes da evolução do tumor (QIAN e cols 1997), capaz de avaliar o crescimento local (T), linfonodal (N) ou metastático (M) do tumor.

Além dos métodos descritos acima, a descoberta e a introdução de biomarcadores que podem identificar homens propensos a desenvolver CaP revolucionou o diagnóstico e o gerenciamento de pacientes com CaP (PAL e cols, 2013). O antígeno 3 específico da próstata (PCA3), por exemplo, é um RNA não codificante de expressão específica da próstata, sendo superexpresso em células de câncer de próstata (BUSSEMAKERS e cols, 1999; PAL, e cols, 2013). O PCA3 é

utilizado como um marcador para o CaP em teste diagnóstico que detecta RNAm deste gene em amostras de urina, após massagem prostática intensa ou exame de toque retal (QIU e cols, 2013). A urina assim coletada contém células liberadas da próstata durante a passagem da excreção. O teste de urina que realiza dosagem do PCA3 se encontra comercialmente disponível (Progensa PCA3). Os níveis de transcritos de PCA3 são medidos nos primeiros 30 mL de urina coletados após intensa massagem prostática e normalizados em relação aos níveis de PSA. Quanto maior o nível de expressão do PCA3, maior a chance de a biópsia ser positiva (PAL e cols, 2013). Também é possível observar a expressão do PCA3 em amostras de tecido e sangue (KLECKA e cols, 2010; FERREIRA e cols, 2012). Diferente do PSA, o PCA3 é específico da próstata e do CaP, não apresentando expressão em outros tipos de câncer, como o de pulmão, íleo, cólon, pâncreas, testículos, mama, bexiga e melanoma (KOK e cols, 2002). Essas características sugerem que o PCA3 apresenta vantagens como um biomarcador específico de CaP. Assim, o uso do PCA3 em combinação com o PSA sérico e outras informações clínicas poderá aumentar a exatidão do diagnóstico de CaP e permitirá aos médicos gerenciar melhor o risco de um indivíduo desenvolver CaP e o momento mais indicado para iniciar o tratamento. É importante ressaltar que além de atuar como biomarcador de CaP, o PCA3 foi descrito primeiramente como um RNA não codificante (ncRNA). O ítem III deste capítulo apresenta uma descrição mais detalhada deste biomarcador

1.1.7) Tratamento do CaP

O tratamento de CaP depende se a doença se apresenta localizada na próstata ou se já se encontra metastática (HEIDENREICH e cols, 2011), da presença de comorbidades, da progressão da doença.

Atualmente, o tratamento padrão ouro de CaP localizado é a prostatectomia radical (PR) (TEFEKLI e TUNC, 2013), uma cirurgia que remove completamente a próstata, as vesículas seminais, as extremidades do canal deferente e, dependendo das áreas acometidas pelo tumor, fibras nervosas, tecido adiposo e vasos sanguíneos adjacentes (BERGLUND e cols, 2006). Além da PR para tratamento de CaP localizado, existe ainda a radioterapia, que pode ser externa (no caso de pacientes com contra-indicação à cirurgia) ou intersticial (no caso de pacientes com bom prognóstico), denominada braquiterapia, em que se realiza o implante de sementes radioativas (D'AMICO e cols, 1998; SADAR, 2012). Ainda para o CaP

localizado é possível fazer o monitoramento da progressão clínica da doença através do acompanhamento do indivíduo. Existe a observação vigilante (*Watchful waiting*) que geralmente é aplicada a homens idosos que apresentam comorbidades significativas e, por essa razão, foram advertidos a não realizar tratamento, a menos que apresentem sintomas de doença avançada. Nesse caso, a indicação é o tratamento paleativo de deprivação de androgênio. Além deste monitoramento, há a vigilância ativa (*active surveillance*) que geralmente é aplicada a homens que foram diagnosticados e que não apresentam ou apresentam poucos sintomas clínicos, sendo uma doença de baixo risco. O paciente é então monitorado através de testes de PSA, biópsias repetidas e, em alguns casos, de outros testes como a pesquisa de biomarcadores. Nos primeiros sinais da progressão da doença, o câncer é tratado, dentro de uma janela de oportunidade de cura (TEFEKLI e TUNC, 2013).

Infelizmente, 20 a 40% dos pacientes com CaP apresentam recorrência da doença e desenvolvem metástases. Estes pacientes são tratados por hormonioterapia, que envolve ablação de androgênio por castração química ou cirúrgica e aplicação de antiandrogênios (SADAR, 2012). A castração cirúrgica (ou orquiectomia) é um procedimento que remove os testículos, que são a maior fonte de hormônios masculinos, resultando numa diminuição de 90 a 95 % dos níveis de testosterona circulante. A terapia hormonal é realizada, pois a próstata é um tecido dependente do androgênio. Assim, uma vez que o paciente é submetido à supressão de androgênio, observa-se uma regressão no câncer de próstata (GRONBERG, 2003) devido à apoptose das células epiteliais luminais. Algumas moléculas que incluem inibidores da síntese de androgênio são: abiraterona, TOK-001, cetoconazol. Os anti-androgênios competem com o androgênio pelo domínio de ligação do ligante do receptor de androgênio para inibir a atividade transcricional do AR. Os anti-androgênios geralmente usados na clínica são: flutamida, bicalutamida e nilutamida. Existem antagonistas que se ligam a sítios desconhecidos do AR e são capazes de reduzir o recrutamento de RNA polimerase II e apresentar algum efeito no bloqueio da proliferação dependente de androgênio das células LNCaP (SADAR, 2012).

Inicialmente, a terapia hormonal é eficiente, mas inevitavelmente fracassa, pois a redução de androgênio testicular não elimina completamente os níveis de androgênio. Androgênios adrenais ou a síntese *de novo* de androgênio pelas células de CaP desempenham um papel crucial no fracasso deste tratamento. Com isto, a doença progride para o CaP resistente à castração (CRPC) e os pacientes vão a

óbito em cerca de dois anos (SADAR, 2012). Este CaP progressivo se manifesta, apesar dos baixos níveis séricos de testosterona (< 50 ng/ dL) (MOTTET e cols, 2011; LIU e ZHANG, 2013). Os pacientes diagnosticados com CRPC apresentam 3 dosagens consecutivas de PSA aumentado, com progressão apesar das manipulações hormonais. Estes pacientes não respondem a terapia com flutamida por, pelo menos, 4 semanas e, com bicalutamida por, pelo menos, 6 semanas. Além disso, apresentam progressão ou aparecimento de duas ou mais lesões ósseas (MOTTET e cols, 2011). Estudos recentes apresentam drogas com efeito citotóxico para pacientes com CRPC. Atualmente, o docetaxel é o medicamento de primeira linha utilizado por estes pacientes, principalmente por aqueles que apresentam CRPC com metástases ósseas. Este agente aumenta a expectativa de vida dos doentes e alivia as dores. No entanto, com o tempo, os pacientes desenvolvem resistência a este tratamento. A medicação alternativa para indivíduos resistentes à docetaxel é o cabazitaxel, que também aumenta a sobrevida dos pacientes CRPC (MOTTET e cols, 2011). Novas abordagens terapêuticas que atuam no campo da imunoterapia estão sendo desenvolvidas com o objetivo de tratar os pacientes com câncer de próstata resistente a hormônios (CPRH). Estes indivíduos são resistentes à qualquer terapia hormonal (MOTTET e cols, 2011). Como as células do CaP expressam inúmeros antígenos associados ao tumor, é possível utilizar estes antígenos como alvo para imunoterapia. A resposta imune ao CaP é limitada porque o sistema imune do paciente se encontra comprometido, não sendo capaz de realizar o reconhecimento de antígenos de superfície, que por sua vez, apresentam imunogenicidade diminuída. Um tipo de vacina terapêutica contra o CaP resistente à hormônios e metastático denominado Sipuleucel-T foi desenvolvido recentemente. Trata-se de uma imunoterapia celular ativa autóloga, projetada para estimular a resposta imune a um antígeno de CaP amplamente expresso. Este antígeno é uma proteína recombinante (PA2024) gerada a partir da fusão da proteína fosfatase ácida prostática com fator estimulador de colônias de macrófago e granulócito (LIU e ZHANG, 2013). Para isto, células mononucleares autólogas, incluindo células apresentadoras de antígeno, são ativadas *ex vivo* com esta proteína de fusão e retornam para o paciente com o objetivo de ativar suas células imunes (MALUF e cols, 2012; KAWALEC e cols, 2012). Este imunoterápico é capaz de proporcionar uma sobrevida global de cerca de 4 meses. Outras imunoterapias, tais como a anti-CTLA vem sendo desenvolvidas. A imunoterapia anti-CTLA se dá através de um anticorpo monoclonal denominado Ipilimumab, capaz de bloquear o CTLA-4, um

regulador negativo do ataque aos antígenos pelas células T. Ipilimumab se encontra em estudo clínico de fase III (LIU e ZHANG, 2013).

Apesar de a imunoterapia ser uma esperança para os pacientes com CaP resistente à castração e resistente a hormônios, trata-se de um mecanismo que apenas aumenta em menos de um ano a sobrevida global dos pacientes (LIU e ZHANG, 2013). Com isto, é necessário investigar outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento do CaP refratário para desenvolver e implementar novas terapias alvo específicas. Neste sentido, é válido avaliar o papel de genes possivelmente relacionados à ativação de vias de sinalização que se encontram alteradas no CaP. A compreensão da atuação de genes nessas vias é de suma importância, pois a alteração da expressão desses genes poderia constituir-se em uma estratégia terapêutica alternativa para burlar os mecanismos de resistência aos tratamentos já existentes. Além disso, é necessário investigar os processos pelos quais a proliferação e a morte das células do CaP resistentes à terapia hormonal são controladas. A partir desse conhecimento, novas terapias poderão ser desenvolvidas.

1.2) Progressão do CAP

1.2.1) CaP resistente à castração (CRPC)

Durante a progressão tumoral, as células adquirem alterações genéticas que as permitem ignorar sua necessidade de androgênio, ocorrendo o desenvolvimento da CRPC (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Assim, no CRPC, as células do CaP podem ou não continuar dependendo do androgênio e/ou da função do AR para o seu crescimento e sobrevivência. Contudo, os mecanismos de sinalização se encontram alterados, já que os níveis de testosterona se encontram reduzidos (AHMED e LI, 2013). Em 2001, Feldman e Feldman descreveram cinco possíveis vias alternativas desenvolvidas pelas células de CaP após a castração, conforme Figura 1.4.

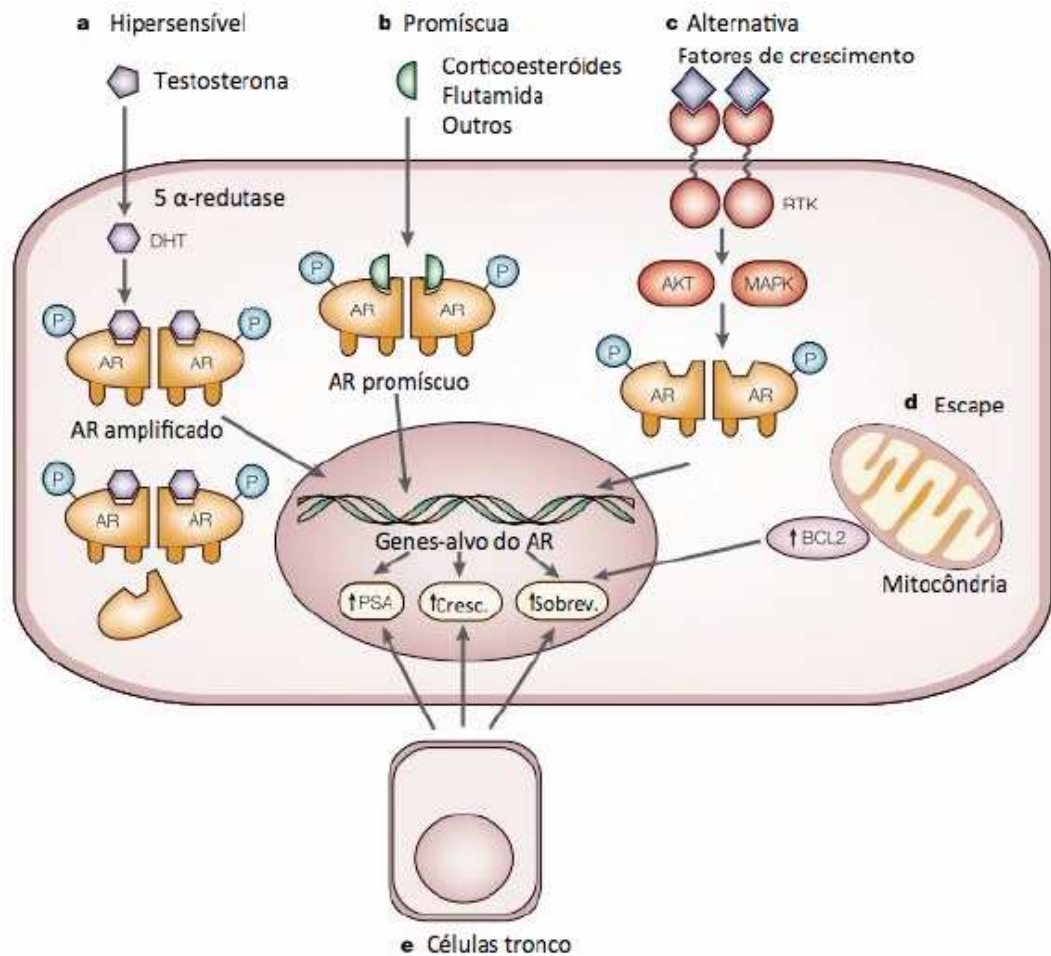


Figura 1.4: Cinco vias possíveis desenvolvidas por células de CaP resistentes à castração. (1) via da hipersensibilidade, onde mais AR são produzidos (geralmente por amplificação) ou os AR apresentam sensibilidade aumentada para compensar os baixos níveis de androgênio ou mais testosterona é convertida a dihidrotestosterona (DHT) através da 5 α redutase; (2) via promíscua, onde a especificidade do AR é ignorada e o receptor pode ser ativado por moléculas não androgênicas presentes na circulação normalmente, tais como corticóides; (3) via alternativa, em que receptores tirosina quinase são ativados e o AR é fosforilado via AKT (proteína cinase B) ou via MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno), produzindo um AR independente de ligante; (4) via de escape, em que vias de sobrevivência paralelas, tal como a que envolve a proteína anti-poptótica BCL2, evitando a necessidade de AR ou de seus ligantes; (5) via de células tronco, em que células de câncer independentes de androgênio estão presentes na próstata durante todo o tempo – possivelmente células tronco epiteliais – que podem ser alvo terapêutico (Modificado de FELDMAN & FELDMAN, 2001).

Além do desenvolvimento dessas vias alternativas à via do AR pelas células de CaP, é possível observar que a progressão do CaP está relacionada a alterações epigenéticas, especialmente metilação e modificação de histonas (LI e cols., 2004; LI e cols., 2005).

1.2.2) Transição Epitelial Mesenquimal (do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition* ou EMT)

Além da aquisição de novas alterações genéticas e epigenéticas durante a progressão tumoral, é possível observar nas células do tumor um fenótipo mais agressivo, que inclui características de invasão e metástase. Trata-se de uma sequência complexa de etapas, conhecida por cascata invasão-metástase, que pode ser originada a partir de sinais de origem estromal (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011).

Durante este processo de disseminação do tumor, as células do carcinoma *in situ* devem ser capazes de romper a membrana basal (perdendo a interação célula-célula) e, conseqüentemente, invadir o estroma próximo e intravasos microvasos sanguíneos e/ou linfáticos. Através desses vasos, as células de câncer podem ir para locais anatomicamente distantes e, extravasar para o tecido, formando micrometástases dormentes. Algumas destas micrometástases podem ser capazes de colonizar os tecidos onde chegaram, formando macrometástases (UNGEFROREN e cols, 2011; MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Atualmente sabemos que estes processos são possíveis devido à forte interação entre as células do tumor e as células do microambiente tumoral, através de mecanismos de regulação cruzada, capazes de determinar o fenótipo agressivo ao tumor, conferindo-lhe as capacidades de crescimento, invasão e disseminação metastática (HANAHAN e WEINBERG, 2011; UNGEFROREN e cols, 2011).

Estas características de mobilidade e invasividade são adquiridas durante o processo de transição epitelial mesenquimal (EMT), em que as células de carcinoma alteram muito o seu fenótipo epitelial. Estas células destacam-se das camadas epiteliais e, sofrem mudanças drásticas, sob a influência da sinalização do microambiente tumoral. Na EMT, as células epiteliais perdem suas características morfológicas e seu padrão de expressão gênica e adquirem forma e programa transcricional característicos de células mesenquimais (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). A EMT ocorre fisiologicamente durante a embriogênese e também durante

processos de cicatrização de ferimentos (VERNON e LABONNE, 2004; MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). O processo patológico da EMT observado na margem de carcinomas que estão invadindo tecidos adjacentes é similar à EMT que ocorre nos processos fisiológicos supracitados (THIERY, 2003), uma vez que as células epiteliais deixam de expressar proteínas marcadoras epiteliais e passam a expressar proteínas mesenquimais (VERNON e LABONNE, 2004; MICALIZZI e cols, 2010). Simultaneamente, as células perdem a morfologia epitelial e adquirem morfologia de fibroblastos. Tudo isso ocorre através da ativação de um programa morfogenético, que já está codificado no genoma destas células, sendo utilizado no desenvolvimento inicial do embrião e, habilitado novamente durante o desenvolvimento de metástases, permitindo a execução das múltiplas etapas deste processo (YANG e cols, 2004).

A EMT começa com a perda da polaridade ápico-basal das junções *tight*, seguida da desestruturação das junções célula-célula, incluindo junções *gap* e aderentes e, da degradação da membrana basal. Proteínas da superfície celular que medeiam conexões com as células vizinhas e a membrana basal são substituídas por outras proteínas que providenciam propriedades de adesão mais transiente, permitindo a migração; os componentes do citoesqueleto também são reorganizados. Todas essas alterações proporcionam mudanças morfológicas nas células em transição, conforme Figura 1.5 (MICALIZZI e cols, 2010).

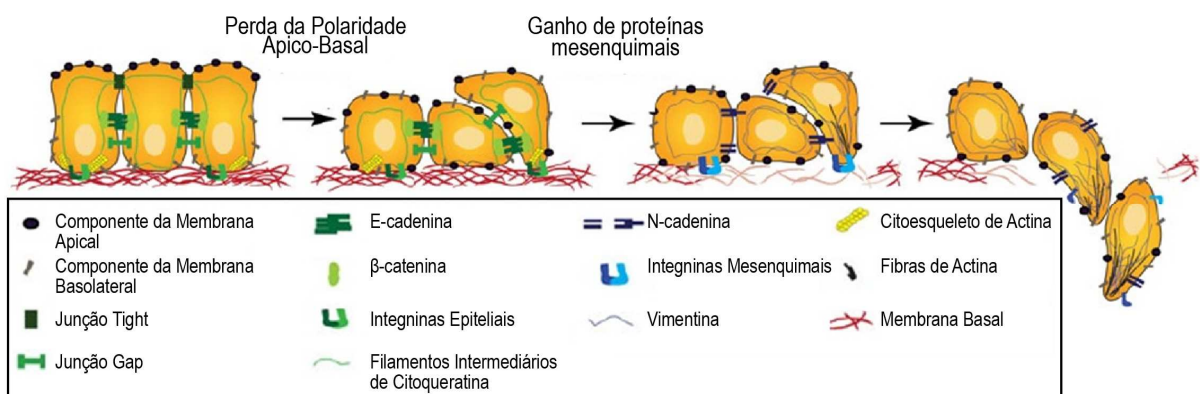


Figura 1.5: Algumas alterações morfológicas e genéticas que ocorrem durante a EMT. Durante a EMT, as células epiteliais perdem a polaridade ápico-basal. As junções *tight* que mantinham a polaridade ápico-basal são dissolvidas, permitindo a mistura de proteínas das membranas apical e basolateral. As junções aderentes e *gap* são perdidas e as proteínas da superfície celular, tais como E-caderina e integrinas específicas do epitélio (em verde) são substituídas por N-caderina e

integrinas específicas de componentes extracelulares (em azul). O citoesqueleto de actina é remodelado em fibras de estresse, enquanto citoqueratina é substituída por vimentina. A membrana basal é degradada e as células invadem e se movem para o estroma circundante, desprovido de contato célula-célula (Modificado de MICALIZZI e cols, 2010).

Além da alteração na forma das células, é possível observar alterações na expressão gênica das células tumorais que estão em transição epitelial mesenquimal, tais como: a perda da expressão de E-caderina, um marcador das junções aderentes de células epiteliais e, a aquisição da expressão de N-caderina, um marcador das junções aderentes de células mesenquimais. O gene que codifica a E-caderina, CDH1 é reprimido por metilação no promotor ou, por certos repressores transcricionais ou por mutações que alteram a fase de leitura (WEINBERG, 2008). A perda de E-caderina e a aquisição de N-caderina são passos críticos para a progressão tumoral, pois permitem que as células tumorais percam a ancoragem e se tornem capazes de invadir outros tecidos. Este fenômeno denominado "troca" de caderinas (ou *cadherin switching*), é observado em vários carcinomas, inclusive o da próstata. A E-caderina apresenta um papel supressor de tumor e, portanto, a sua perda pode contribuir para a ocorrência de eventos da carcinogênese, tais como a perda de controle sobre o crescimento e a proliferação celular. A expressão de citoqueratina também é alterada durante a progressão do tumoral. Este marcador epitelial tem sua expressão reprimida, enquanto a expressão de vimentina, um componente filamentosso intermediário do citoesqueleto de células mesenquimais é induzida (MICALIZZI e cols, 2010). A troca da expressão de queratina por vimentina durante o processo de EMT está associada à diminuição da adesão célula-célula, permitindo aumento da capacidade invasiva (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011).

Existem alguns genes que desempenham papel regulador de genes envolvidos na EMT e, portanto, também estão envolvidos no processo de metástase tumoral. Twist é um desses genes com função regulatória e apresenta como alvo transcricional genes como a E-caderina. Quando a expressão de Twist é induzida durante a EMT, observa-se a perda da adesão célula-célula mediada por E-caderina, devido à repressão da expressão desta proteína. Por outro lado, a expressão de N-caderina e fibronectina (uma proteína da matriz extracelular secretada normalmente apenas por células mesenquimais, como os fibroblastos) é induzida por Twist. Com isto, o fator de transcrição Twist promove o crescimento

tumoral infiltrante (metastático) em vários carcinomas humanos (YANG e cols, 2004). Além de Twist, Snail e Slug são dois fatores de transcrição que também atuam como repressores da transcrição do gene de E-caderina. Esses três fatores de transcrição regulam outros aspectos EMT. Por exemplo, Snail e Slug regulam a estabilidade das junções tight, a expressão de proteínas de junção gap, a expressão de proteases. Twist não só reprime E-caderina, mas também induz a expressão de genes mesenquimais. A expressão desses três fatores de transcrição que atuam como reguladores de características EMT é induzida pela sinalização através de TGF- β e Wnt (MICALIZZI e cols, 2010). De modo geral, Twist e Slug capacitam as células a resistirem à apoptose e anoikis (um tipo de morte celular programada disparada pela liberação das células do substrato sólido como a matriz extracelular) e protegem as células em metástase de alguns estresses fisiológicos que poderiam levá-las à morte antes de chegarem e se implantarem nos tecidos distantes. Além disso, durante a EMT é possível observar a repressão da expressão de β -catenina e γ -catenina.

Atualmente, sabe-se que nem sempre a transição entre os fenótipos epitelial e mesenquimal representa dois estados celulares independentes e absolutos. Ao invés disso, é possível que exista um espectro contínuo entre as propriedades epiteliais e mesenquimais. Esta teoria é atraente no contexto de câncer, que tipicamente perde a organização e a indução de uma EMT completa e ordenada. (MICALIZZI e cols, 2010). Nesse caso, cada célula pode passar apenas parcialmente por EMT, em que algumas características epiteliais são retidas junto com características mesenquimais adquiridas, ao invés de cada célula passar por uma EMT total, durante a qual ela perde toda a característica epitelial.

É importante ressaltar que o fenótipo EMT é adquirido reversivelmente e, que as células tumorais em processo de invasão e metástase frequentemente reverterem esse fenótipo, uma vez que tenham completado todas as etapas desse processo e tenham colonizado outro tecido. Nesse caso, as células passam pela transição mesenquimal epitelial (MET) (MICALIZZI e cols, 2010; MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Isso ocorre, pois a sinalização que as células de câncer recebem varia dependendo do microambiente. Desse modo, células de linha de frente invasiva de um tumor primário recebem sinais específicos do estroma reativo. No entanto, uma vez que estas células tenham deixado o tumor primário e tenham colonizado um tecido distante, elas passam a receber sinais desse outro tecido que não está

induzindo EMT e, na ausência dessa sinalização, as células tendem a reverter o fenótipo EMT passando pela MET (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011).

Dados publicados pelo grupo de Matuszak e Kyprianou (2011) sugerem que a EMT ativada durante a tumorigênese pode estar envolvida em uma troca funcional com componentes do eixo de sinalização androgênico, principalmente o AR. Desse modo, a reativação da EMT durante a tumorigênese é promovida pelo microambiente tumoral para facilitar o início do CaP, uma dinâmica regulada pela via de sinalização do AR/ androgênio. A interação entre EMT e a via do AR atua no surgimento de tumores avançados independentes de andrógenos e, na alteração das principais características do citoesqueleto, desenvolvendo um comportamento metastático. Relatos recentes mostram que o aumento na atividade do AR corrobora com o aumento da invasão celular, indicando o envolvimento de processos EMT na desregulação da via de sinalização do androgênio. O AR ativado é capaz de atuar como Snail e Twist, suprimindo a expressão de E-caderina em linhagem celular metastática da próstata (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Como a perda de expressão de E-caderina e o aumento da expressão de N-caderina são atualmente definidas como o principal marco de EMT (LUO e cols, 2013), então podemos observar a forte interação entre EMT e a via do AR na progressão do CaP. Outra forte evidência da interação entre a via do AR e o programa EMT na sobrevivência das células de CaP é que a ativação de β -catenina mediada por androgênios pode também servir como um mecanismo alternativo pelo qual a sinalização androgênica induz EMT nas células epiteliais do CaP (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Isso porque em células epiteliais, a β -catenina se encontra ligada à cauda citoplasmática de E-caderina, formando junções aderentes entre células vizinhas. Além disso, β -catenina atua como intermediária na via de Wnt, regulando vários processos celulares, incluindo a diferenciação, a proliferação e a migração. A perda de E-caderina da membrana plasmática libera β -catenina que migra para o núcleo e se associa a fatores de transcrição TCF/LEF-1, induzindo a expressão de genes e orquestrando o programa EMT. Simultaneamente, β -catenina atua como co-ativador da via do AR e, parece ser importante para a formação do complexo de transcrição do AR, podendo alterar a expressão de genes alvo do AR que podem estar envolvidos na sobrevivência e na proliferação celular (CULIG e cols, 2004; MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011).

1.2.3) Potencial Stemness

Além de aumentar a capacidade migratória e invasiva das células tumorais e, lhes conferir resistência à apoptose, a ativação do programa EMT pode reverter as células cancerosas a um estado indiferenciado, conferindo-lhes propriedades fenotípicas e genômicas similares às das células tronco, inclusive capacidade de auto-renovação e de gerar diversos tipos de células terminalmente diferenciadas. Então, outra potencial consequência do processo de EMT é a geração de células tronco tumorais (ou *cancer stem-like cells*) (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Essas células mesenquimais indiferenciadas são caracterizadas pela troca na expressão de caderinas (de E para N caderina), expressão de fatores Snail, vimentina e metaloproteases (que ativam a degradação proteolítica da membrana basal/ matriz extracelular, alterando a interação célula-célula, célula-matriz). Essas células também retêm a expressão de diversos fatores de transcrição relacionados a circuitos de manutenção de pluripotência, incluindo Nanog e Oct-4, indicando que as células tronco podem adotar um perfil fenotípico mesenquimal sem perder a pluripotência (THIERY e cols, 2009). Nanog é uma proteína que mantém a pluripotência de células tronco embrionárias em camundongos através da inibição de NFkB e da cooperação com Stat3. Oct4 é um fator de transcrição que se liga a Sox2 e, também é um regulador essencial para a pluripotência e a capacidade de auto-renovação de células tronco embrionárias. Sox2 foi inicialmente descrito como inibidor da diferenciação neuronal e, atualmente, sabe-se que atua como um importante fator de transcrição para manter a capacidade de auto-renovação de células tronco embrionárias (LUO e cols, 2013). Em resumo, Nanog, Oct4 e Sox 2 são reguladores chaves da transcrição que mantêm a pluripotência e as propriedades de auto-renovação das células tronco embrionárias. A expressão estável desses três reguladores pode promover o crescimento celular, inibir a apoptose e promover metástase *in vitro* e *in vivo*, apresentando um importante papel na carcinogênese (LUO e cols, 2013). Apesar de descrito na literatura que a indução de EMT em células epiteliais permite a aquisição de características de células tronco, a conexão entre EMT e células tipo tronco em tecidos sólidos de tumor humano ainda não foi completamente esclarecida.

1.3) RNA não codificante

1.3.1) Descrição e Classificação dos RNAs não codificante (do inglês *non coding RNA* ou ncRNA)

A partir do sequenciamento genômico, a compreensão a respeito da organização e da estrutura genômica foi modificada e demonstrou-se que a complexidade do genoma humano não pode ser explicada apenas pelos genes que codificam proteínas. Neste sentido, diversos estudos empregando técnicas de clonagem de cDNA em larga escala revelaram que a maioria dos genomas são altamente expressos e, que o número de RNA não codificantes (ncRNA) é muito maior do que o previsto anteriormente (YAZGAN e KREBS, 2007). Sabe-se que cerca de 98% dos transcritos do genoma humano corresponde a ncRNAs (MATTICK, 2001). Os transcritos do genoma eucariótico podem ser divididos em duas categorias: codificantes de proteínas e os não codificantes (COSTA, 2010). Os ncRNAs são definidos como RNAs biologicamente funcionais, ou seja, são RNAs que não são simplesmente mensageiros intermediários entre DNA e proteínas, mas que apresentam função biológica. A maioria dos ncRNAs apresentam função ainda desconhecida, mas recentemente, foram descritas algumas funções tais como atuação em mecanismos epigenéticos (COSTA, 2010), organização de domínios cromossômicos, remodelamento de cromatina e regulação da transcrição (QIU e cols, 2013). Os ncRNAs são divididos em classes de acordo com o tamanho e a função que desempenham (COSTA, 2010). A classe dos pequenos RNAs é formada a partir do processamento e do “splicing” alternativo de ncRNAs. Esta classe é composta por pequenos RNAs de interferência (siRNAs), pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) e outros. Os siRNAs são produtos com 21 a 25 nucleotídeos de comprimento (MORRIS, 2005), obtidos a partir do processamento de RNAs fita dupla e possuem a função de silenciamento gênico através da degradação do RNAm complementar. Os snoRNAs contribuem para modificações nos RNAs que são ainda menores, tais como os ribossomais (RNAr), os pequenos RNAs nucleares (snRNA) e outros RNAs (COSTA, 2010). Outra classe de ncRNAs é representada pelos microRNAs (miRNAs), com cerca de 23 nucleotídeos, parcialmente complementares a RNAm alvos. Os miRNAs são capazes de regular a expressão gênica de maneira pós-transcricional, através do silenciamento gênico (COSTA, 2010), interrompendo a tradução ou desestabilizando o RNA mensageiro (RNAm)

de genes codificantes, o que leva à degradação destes por RNases. Níveis anormais de expressão de precursores de miRNAs ou miRNAs imaturos leva à diversos tipos de câncer em humanos, mostrando a importância do papel dos miRNAs (BARBAROTTO e cols, 2007). Além dessas classes de ncRNAs, existe ainda a dos lncRNAs (RNAs não codificantes longos). Inicialmente, os lncRNAs eram definidos como moléculas que apresentam mais de 200 nucleotídeos em seu comprimento ao invés de levar em consideração a função e a estrutura. Atualmente, não se usa mais esta definição. Os lncRNAs são definidos como moléculas que podem ser transcritos primários ou transcritos que sofreram *splicing* e que não se enquadram dentro das classes de pequenos RNAs ou RNAs estruturais (QIU e cols, 2013). Os lncRNAs regulam a transcrição de genes alvo e também atuam na regulação pós-transcricional, agindo como sinais moleculares para fatores de transcrição e modificadores epigenéticos (WANG e TRAN, 2013). Muitos lncRNAs podem ajudar na mudança da expressão gênica em resposta a estímulos extracelulares. Os lncRNAs podem ser processados e codificar microRNAs (miRNAs). Apesar da descrição dessas funções, a grande maioria dos lncRNAs em humanos (cerca de 8000) apresentam funções ainda desconhecidas (WANG e TRAN, 2013). Os lncRNAs se encontram desregulados no câncer humano e a expressão aberrante está associada ao início e a recorrência da doença, a metástase e/ou o prognóstico (QIU e cols, 2013). Vários esforços vêm sendo realizados nos últimos anos para identificar potenciais lncRNAs relacionados ao câncer.

1.3.2) ncRNA PCA3

Em 1999, Bussemakers e colaboradores identificaram a superexpressão do lncRNA DD3 em CaP através da análise de expressão diferencial (*differential display analysis*). O DD3 foi posteriormente denominado por PCA3 (*prostate cancer antigen 3*) (QIU e cols, 2013). Bussemakers e cols. identificaram o PCA3 e o caracterizaram como um marcador altamente específico do tecido prostático, que se apresentou altamente expresso em carcinoma prostático quando comparado com tecidos não-neoplásicos. Além disso, análises por Reação em Cadeia da Polimerase pela transcriptase Reversa (RT-PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para o PCA3 indicaram que a expressão do mesmo é específica do tumor prostático, não apresentando expressão em câncer de pulmão, esôfago, íleo, cólon, pâncreas,

testículos, mama, bexiga e melanoma (KOK e cols, 2002). O PCA3 é um dos genes mais específicos descritos, superexpresso na maioria das neoplasias prostáticas incluindo metástases distantes (VERHAEGH e cols, 2000; Schalken e cols, 2005). Esta atividade específica do promotor do PCA3 em células de CaP pode ser utilizada como uma estratégia de ferramenta terapêutica alvo específica (FAN e cols, 2012). O gene que codifica o PCA3 sofre *splicing* alternativo e, apresenta um grande número de códons de terminação em todas as seqüências abertas de leitura (*ORFs*) identificadas a partir de sua seqüência de RNA, sugerindo que este gene seja um ncRNA (BUSSEMAKERS e cols, 1999; CLARKE e cols, 2009). Além disso, não existe evidência para a expressão de uma proteína PCA3. O gene PCA3 localiza-se no cromossomo 9q21-22 em orientação antisenso, dentro do íntron 6 do gene BMCC1-1 (ou PRUNE2), um gene envolvido no controle da transformação oncogênica. Estes achados sugerem que o PCA3 seja um transcrito antisenso intrônico (CLARKE e cols, 2009). Em 1999, Bussemakers e cols. descreveram a estrutura parcial do PCA3 com 4 exons, apresentando *splicing* alternativo no éxon 2 e poliadenilação alternativa em 3 diferentes posições do éxon 4 (ou seja, três sítios de terminação da transcrição no éxon 4), produzindo 3 diferentes tamanhos de transcritos (4a+ 4b+ 4c; 4a+4b; 4a). Estes autores mostraram por meio de *Northern Blot* que o éxon 2 está ausente em 3 transcritos, em virtude de *splicing* alternativo. Em 2009, Clarke e colaboradores identificaram 4 novos sítios de início da transcrição no PCA3 no éxon 1, 4 novos sítios de poliadenilação no éxon 4 (totalizando 7 atualmente) e novos éxons (temos agora éxons 2a, 2b e 2c), conforme ilustrado na Figura 1.6. O tamanho completo do gene PCA3 corresponde a 25 Kb (CLARKE e cols, 2009).

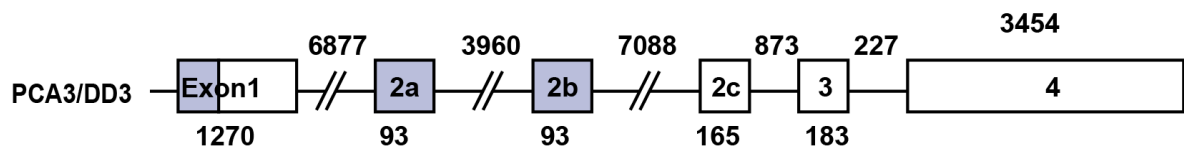


Figura 1.6: Estrutura completa do gene PCA3. As caixas brancas simbolizam os 4 éxons previamente descritos por Bussemakers e cols, em 1999. Em 2009, Clarke e cols. identificaram dois novos éxons (2a e 2b). Além disso, identificaram uma nova parte do éxon 1, expandindo o tamanho deste éxon de 120pb para 1270 pb. As caixas sombreadas simbolizam as novas regiões do PCA3 identificadas por Clarke e cols. em 2009. Sendo assim, o gene do PCA3 é composto por 6 éxons, havendo *splicing* alternativo do éxon 2a (93pb), do éxon 2b (93 pb) e do éxon 2c (original

éxon 2, com 165pb). O primeiro íntron é relativamente grande com cerca de 20 Kb, enquanto os outros dois íntrons são pequenos, contendo 873 e 227 pb, respectivamente.(Modificado de CLARKE e cols, 2009).

A superexpressão do PCA3 no CaP parece ser um evento inicial no desenvolvimento do CaP, uma vez que sua expressão foi observada em amostras de tecidos de tumores de próstata em diversos estágios (bem, moderada ou pobremente diferenciados) (BUSSEMAKERS e cols, 1999). Este dado indica a importância deste ncRNA na tumorigênese e progressão do CaP.

Apesar da alta expressão de PCA3 em quase todos os tumores de próstata examinados, apenas a linhagem celular dependente de androgênio denominada LNCaP (estabelecida a partir de metástase de linfonodo originada de adenocarcinoma prostático) apresenta alta expressão do PCA3 (FAN e cols, 2010; FERREIRA e cols, 2012) quando em comparação com as outras linhagens celulares amplamente empregadas em estudos de CaP. Isso nos leva a crer que a expressão do PCA3 possa ser modulada pela via do AR e, que também possa estar envolvido no controle dos genes relacionados à via do AR. Além disso, linhagens celulares não prostáticas não apresentam expressão de PCA3 (FERREIRA e cols, 2012).

Embora o PCA3 tenha sido amplamente caracterizado como um biomarcador específico para o diagnóstico precoce de CaP conforme descrito no tópico anterior, até recentemente, nada havia sido descrito na literatura sobre a função deste ncRNA, principalmente, sobre a sua atuação na biologia do CaP e na progressão tumoral. Em 2012, nosso grupo utilizou a tecnologia de RNA de interferência para silenciar seletivamente o gene PCA3 em células LNCaP. Empregamos esta abordagem para investigar a função do PCA3 na biologia do CaP. Estes dados mostraram que a interferência do PCA3 com siRNA diminuiu o crescimento e a viabilidade celular, enquanto aumentou a proporção de células na fase subG0 do ciclo celular e o percentual de células com núcleos picnóticos, sugerindo aumento de morte celular por apoptose. Além disso, a expressão dos genes alvo da via do AR apresentou-se significativamente diminuída em células transfectas com siPCA3. Estes dados indicaram que este ncRNA está envolvido no controle da sobrevivência de células de CaP, em parte, através da modulação da via de sinalização do AR. No entanto, ainda não se conhece os mecanismos moleculares precisos através dos quais o PCA3 responde à esta ativação do AR e modula a sobrevivência de células LNCaP. Além disso, estes dados evidenciaram que o PCA3 apresenta um potencial papel modulador na via de sinalização do AR. Considerando sua expressão

específica em tecidos prostáticos, é interessante investigá-lo como potencial ferramenta terapêutica para o CaP.

1.4) Perspectivas de novas ferramentas para tratamento do CaP

1.4.1) RNA de interferência

Atualmente, muitos grupos de pesquisa estão investindo no silenciamento gênico mediado por RNA de interferência (RNAi) para o tratamento de diversas doenças consideradas “intratáveis” pelas drogas terapêuticas tradicionais, tais como o câncer (BARROS e GOLLOB, 2012; ASAI e OKU, 2014). RNAi é um mecanismo celular natural bastante conservado ao longo da evolução considerado essencial para a proteção do genoma contra infecções virais e instabilidades genômicas causada por elementos genéticos, tais como os transposons e elementos repetitivos que produzem dupla fita de RNA intermediário dentro da célula hospedeira. O RNAi é, portanto, considerado um mecanismo de defesa contra expressão gênica aberrante. Como a interferência por RNA permite suprimir a expressão de um dado gene em células de mamífero em condições *in vitro* sem induzir a resposta inespecífica de interferon, então por muito tempo, os pesquisadores empregaram esta tecnologia apenas como uma ferramenta para estudar genética funcional e fenótipos com perda função. Entretanto, na atualidade, a RNAi é a técnica padrão ouro para investigar não apenas a função de genes, mas também para identificar alvos específicos para intervenção terapêutica (SCHERR e EDER, 2007; BARROS e GOLLOB, 2012; ASAI e OKU, 2014).

O processo de interferência por RNA ocorre em várias etapas que podem ser ativadas em diferentes estágios por diferentes RNAs regulatórios: siRNA (*small interfering RNA*), shRNA (*short hairpin RNA*) e miRNA (*micro-RNA*) (BARROS e GOLLOB, 2012; ASAI e OKU, 2014). Em ambos os mecanismos, uma fita dupla de RNA induz o silenciamento gênico pós-transcricional de forma dependente de uma sequência de RNA mensageiro (RNAm) complementar (SCHERR e EDER, 2007). O siRNA é uma dupla fita de RNA sintético com cerca de 21 a 25 nucleotídeos pareados e dois nucleotídeos não pareados em cada extremidade 3'; o shRNA é transcrito pela RNA polimerase III e consiste de uma estrutura em grampo com 19 a 29 pares de bases, sendo que uma das duas fitas é idêntica à sequência alvo de RNAm. Há ainda uma sequência de 9 pares de base em forma de grampo nessa

estrutura de shRNA e dois nucleotídeos livres em uma das extremidades 3'. O miRNA consiste de dupla fita de RNA expresso por promotores de polimerase II, composto por cerca de 21 a 25 nucleotídeos pareados e dois nucleotídeos não pareados em cada extremidade 3', como os siRNAs. Há ainda uma sequência com cerca de 5 a 15 nucleotídeos em forma de grampo (SCHERR e EDER, 2007).

Os siRNAs são duplas fitas de RNA com pareamento perfeito sinteticamente originados e transfectados nas células alvo onde sofrem clivagem e são processados a uma fita simples de RNA. Já as sequências de shRNA são clonadas em cassetes virais e, posteriormente inseridas no genoma da célula hospedeira. Após a integração estável no genoma, as sequências de shRNA são transcritas e, em seguida, são exportadas para o citoplasma pela exportina 5 e, processadas pela RNase Dicer gerando siRNAs funcionais. Enquanto isso, os transcritos primários de miRNA (pri-miRNAs) são processados no núcleo pela enzima RNase III Drosha em pré-miRNAs de 70 a 90 nucleotídeos com pareamento de bases imperfeitos. Após a exportação nuclear para o citoplasma pela ação da exportina-5, os pré-miRNAs são processados pela RNase Dicer gerando miRNAs maduros de 21 a 23 pares de bases (SCHERR e EDER, 2007).

Uma vez processados, shRNA e miRNA, apresentam uma fita simples de RNA denominada fita guia, assim como o siRNA (que não necessita de processamento prévio). Esta fita simples de siRNA denominada guia é incorporada ao complexo citoplasmático denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O RISC é composto por siRNA e diversas proteínas. O complexo RISC é direcionado até o RNAm pela fita guia, devido à sua alta complementariedade ao RNAm e, induz à degradação deste enquanto outra fita de RNA (fita passageira), previamente liberada, é destruída. Tanto o siRNA quanto o shRNA apresentam alta complementariedade com as sequências codificantes alvo e, com isto, induzem a degradação do RNAm. Já os miRNAs geralmente apresentam complementariedade imperfeita com as sequências alvo e, assim, previnem a tradução ou reduzem estabilidade do RNAm acelerando a deadenilação, conforme descrito na Figura 1.7 (SCHERR e EDER, 2007).

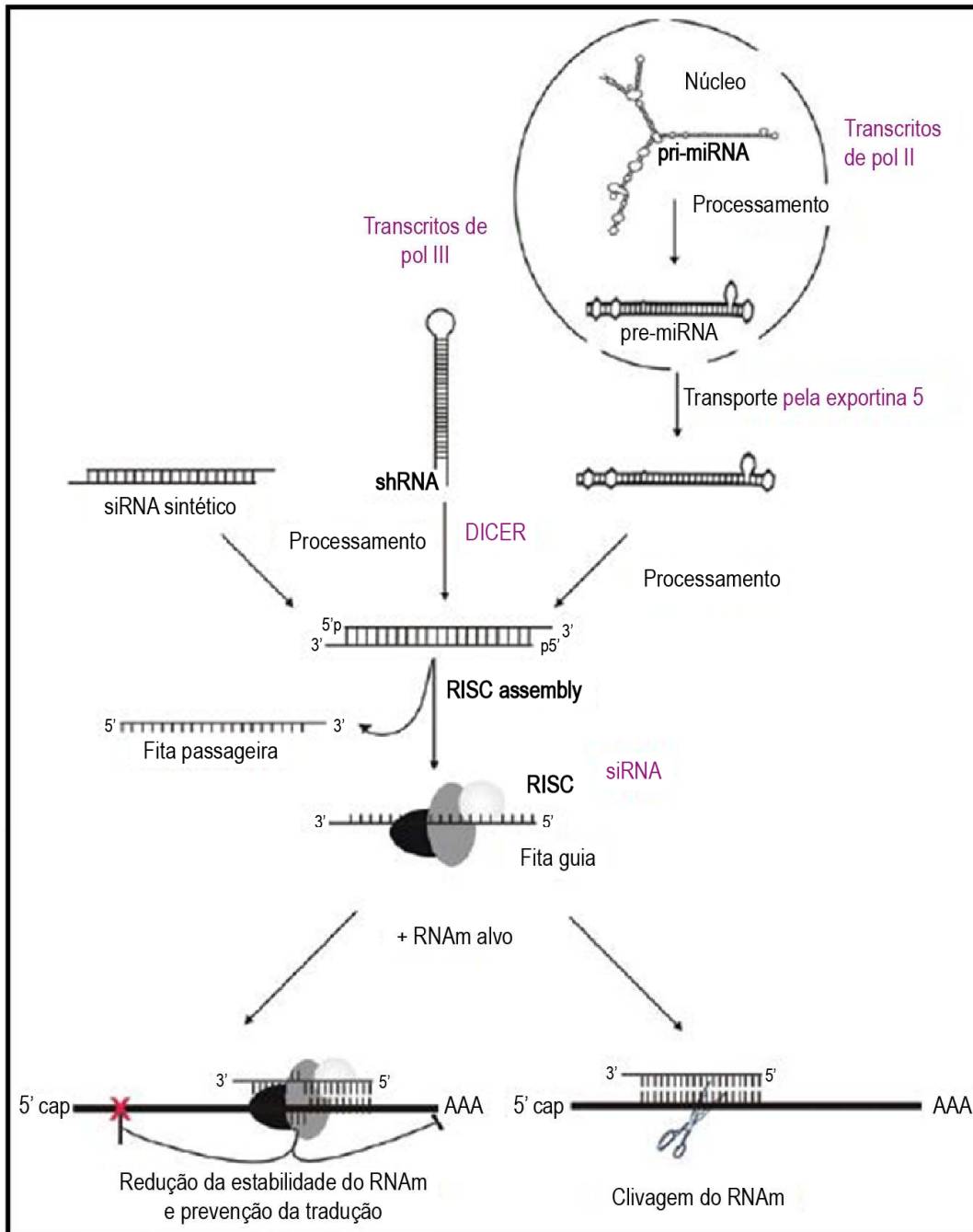


Figura 1.7: Mecanismos de silenciamento gênico mediado por RNAi. Pequenos RNAs regulatórios podem ser introduzidos nas células, através de sequências sintéticas de siRNAs (a esquerda), de shRNAs (meio) ou de pri-miRNAs transcritos endogenamente. Tanto os shRNAs quanto os pré-miRNAs são processados pela Dicer e, em seguida pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). A fita guia de RNA é então incorporada ao RISC e direcionada até o RNAm alvo complementar, resultando na clivagem do RNAm alvo (no caso dos siRNAs e shRNAs) ou na redução da estabilidade do RNAm, seguida de prevenção da tradução (no caso dos miRNA) (modificado de SCHERR e EDER, 2007).

1.4.2) Silenciamento transiente e silenciamento estável

Em células de mamíferos, o silenciamento gênico por siRNA se dá apenas por períodos curtos de tempo (no máximo por uma semana, dependendo da proliferação celular, da concentração de siRNA e da meia vida do alvo) (SCHERR e EDER, 2007). Além disso, a injeção intravenosa de siRNA desprovido de outras moléculas associadas resulta em uma rápida eliminação do organismo, na degradação por RNases, além de estimular a resposta imune em virtude do reconhecimento pelos receptores tipo *toll* (TLRs). Desse modo, há um grande desafio na entrega eficiente das moléculas de siRNA aos tecidos alvo (BARROS e GOLLOB, 2012).

Moléculas de shRNA com expressão baseada em vetores plasmidiais são capazes de produzir o silenciamento estável da expressão gênica, porém com baixa eficiência. A transdução estável e eficiente das células alvo com vetores virais (sejam retrovirais, lentivirais ou adenovirais) carregando cassetes de expressão de shRNA pode produzir o silenciamento estável da expressão gênica. Os shRNAs são expressos a partir de promotores da RNA polimerase III, sendo os mais utilizados os promotores de snRNA (*small nuclear RNA*) H1 e U6 (YU e cols, 2002; SCHERR e EDER, 2007). Os promotores de pol III são adequados para transcrição de shRNA, pois geram altos níveis de transcritos de RNA não codificantes, apresentam alta atividade em todos os tipos de células, apresentam forte capacidade de silenciamento gênico e o tamanho do cassete de expressão completo é pequeno.

1.4.2.1) Vetores Virais

Os retrovírus são amplamente usados como sistemas estáveis de transferência de genes (CHU et al., 1998). Esses vetores são assim denominados, pois possuem a habilidade de transcrever RNA em DNA pela ação da enzima transcriptase reversa. Os retrovírus contêm três domínios codificadores: Gag, Pol e Env. O domínio Gag dá origem às proteínas de matriz, do capsídeo e do núcleo do vírus; o domínio Pol dá origem à protease viral juntamente com a transcriptase reversa e a integrase, enquanto que o domínio Env codifica glicoproteínas do envelope. Os retrovírus são classificados em três grandes grupos: onco-retrovírus, spumavírus e lentivírus (BRENNER e MALECH, 2003). Dentre estes, o lentivírus é atualmente o vetor mais amplamente empregado devido à sua habilidade de transduzir células quiescentes (SILVA e cols., 2006), através dos poros da membrana nuclear intacta

(BRENNER e MALECH, 2003), enquanto o onco-retrovírus só está apto a transduzir células em divisão, quando a membrana nuclear se desintegra. Além disso, o complexo de pré-integração do lentivírus é mais estável que o do onco-retrovírus. Outra vantagem é que sequências relativamente grandes de transgenes podem ser inseridas nos lentivírus (MANJUNATH e cols., 2009). Os sistemas lentivirais de transferência gênica baseados no HIV-1 (vírus da Imunodeficiência humana) são predominantemente utilizados porque a biologia básica de replicação do HIV tem sido extensivamente caracterizada ao longo de muitos anos, permitindo um aperfeiçoamento considerável no desenho do vetor. Esses sistemas são capazes de transduzir células terminalmente diferenciadas e células que não estão sofrendo divisão sendo, portanto, mais eficientes do que os vetores baseados em retrovírus derivado de leucemia murina (MLV). Esta capacidade é devida a várias proteínas virais que estão envolvidas na importação nuclear do complexo de pré-integração (BRENNER e MALECH, 2003). Além dos genes estruturais Gag, Pol e Env, comuns a todos os retrovírus, o HIV contém dois genes regulatórios essenciais para a replicação viral, Tat e Rev, e quatro genes acessórios: Vif, Vpr, Vpu e Nef, que não são cruciais para a replicação viral *in vitro*, mas são críticos para a replicação *in vivo* e patogênese. As proteínas Tat e Rev são estritamente requeridos para a replicação viral; eles regulam os níveis de expressão gênica do HIV a nível transcricional e pós-transcricional, respectivamente. O HIV preferencialmente infecta células que possuem o marcador de superfície CD4, como os macrófagos e os linfócitos T helper (SILVA e cols., 2006). Deste modo, para expandir as possíveis aplicações de vetores HIV na terapia gênica, é necessário usar diferentes construções de envelope (pseudotipagem), permitindo assim, a infecção de diferentes células alvo (BURNS e cols., 1993).

Assim, é possível aplicar vetores lentivirais (HIV) carreando cassetes de expressão de shRNA específicos para o PCA3, produzindo o silenciamento estável da expressão gênica deste ncRNA em células LNCaP para aprofundar a investigação da função do PCA3 na biologia do CaP e da possibilidade de utilizá-lo como possível alvo terapêutico.

Conforme podemos observar, os dados sobre o papel do PCA3 no CaP são bastante limitados. Embora nosso grupo de pesquisa tenha descrito que o PCA3 modula a sobrevivência das células de CaP, pelo menos em parte, pela via do AR, os dados a respeito dos mecanismos moleculares pelos quais este ncRNA modula a sobrevivência destas células ainda não foram descritos. Com isto, se faz necessário

verificar se diversos genes relacionados ao câncer podem estar envolvidos no processo de resposta ao silenciamento do PCA3. Além disso, não há informações acerca do potencial do PCA3 enquanto alvo terapêutico para o CaP, apesar de este ncRNA já ser empregado como biomarcador para o diagnóstico desta neoplasia. Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias de silenciamento estável do PCA3 podem se reverter em estratégias terapêuticas para o CaP.

2) OBJETIVOS

2.1) OBJETIVOS GERAIS

- Identificar os genes que estão envolvidos na modulação da sobrevivência das células de CaP pelo PCA3;
- Promover o silenciamento estável do PCA3, vislumbrando estratégias terapêuticas para o CaP.

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se diversos genes relacionados ao câncer, tais como marcadores do programa EMT, co-reguladores da via do AR e genes com potencial *stemness* podem estar envolvidos no processo de resposta ao silenciamento do PCA3;
- Desenhar sequências de shRNA específicas para o PCA3;
- Construir um vetor lentiviral carreando sequência de shRNA específica para o PCA3 de forma a silenciar estavelmente este ncRNA.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Síntese das sequências *small interfering RNA* (siRNA)

Foram sintetizadas pela IDT uma sequência de siRNA duplex específica para o PCA3 (siPCA3) e uma sequência de siRNA duplex inespecífica *scramble* (siScrbl) que apresenta o mesmo conteúdo “CG” do siPCA3 utilizada como um controle negativo (Tabela 3.1). A sequência de siPCA3 selecionada para este projeto foi a sequência que apresentou melhor eficiência na diminuição da expressão do PCA3 (FERREIRA e cols, 2012).

Esta sequência apresenta homologia com uma sequência localizada no éxon 4 do RNA mensageiro deste gene, conforme a Figura 3.1.

Tabela 3.1: Sequência de siRNA específica para o PCA3 e siRNA *scramble* utilizada neste estudo.

Nome do siRNA	Sequência do siRNA
siPCA3 F	5' CUAGCACACAGCAUGAUCAUUACGG 3'
siScrbl F	5' GCACGCUCCUACGAAUGCUAGUAAA 3'

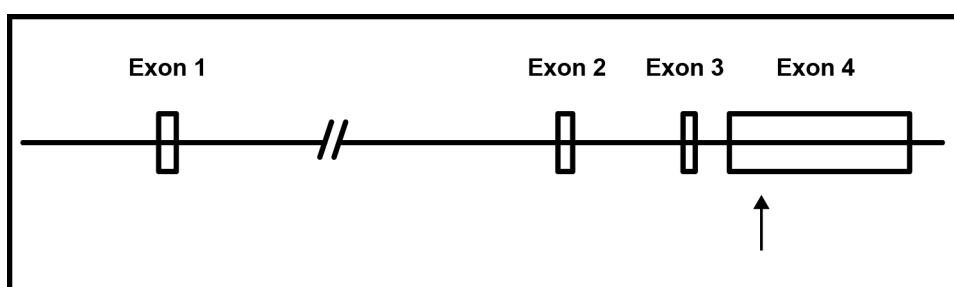


Figura 3.1: Localização do RNA de interferência para o PCA3. O RNA anela na região do éxon 4 (indicada pela seta), que corresponde a uma região comum dos possíveis transcritos provenientes do gene PCA3 (Adaptado da Dissertação de Mestrado de Luciana Bueno Ferreira).

3.2.) Desenho das sequências de *short hairpin* (shRNA)

As sequências codificadoras dos shRNAs foram desenhadas a partir de sequências validadas fornecidas pelo site http://lentiweb.com/cloning_strategies.php (Figura 3.2).

Mlu1 **19nt sense siRNA** **Loop** **19nt anti-sense siRNA** **stop** **Cla1**
CGCGTCCCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**TTCAAGAGAN**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**TTTTTGGAAAT**
AGGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**AAGTTCTCT**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**AAAAACCTTAGC**

Figura 3.2: Desenho base da Sequência de shRNA utilizada na estratégia de clonagem das sequências de shRNA no plasmídeo pLVTHM. As sequências de shRNA são desenhadas com pontas coesivas para ClaI e MluI.

Foram desenhadas duas sequências de shRNA específicas para o PCA3 (shPCA3) a partir das duas sequências de siPCA3 que apresentaram maior eficiência no silenciamento do PCA3 (FERREIRA e cols, 2012). As duas sequências *scramble* (shScrbI) foram desenhadas a partir das duas sequências controle siScrbI que acompanharam este critério de seleção (Tabela 3.2). Conforme Figura 3.2, as sequências de shRNA desenhadas comportam sítios para as enzimas de restrição MluI e ClaI que geram extremidades coesivas. As duas sequências de siPCA3 empregadas no desenho das duas sequências shPCA3 correspondentes também apresentam homologia com sequências localizadas no éxon 4 do RNA mensageiro.

Tabela 3.2: Sequências de shRNA específicas para o PCA3 e shRNA *scramble* utilizadas neste estudo.

Nome do shRNA	Sequência do shRNA
shPCA3 2 F	5'CGCGTCCCCCTAGCACACAGCATGATCATTACGGTTCA AGAGACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGTTTTTGGAAAT 3'
shPCA3 2 R	5'CGATTTCCAAAACTAGCACACAGCATGATCATTACGGT CTCTTGAACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGGGGGA 3'
shPCA3 3 F	5'CGCGTCCCCCACAATATGCATAAATCTAACTCCTTCAA GAGAGGAGTTAGATTTATGCATATTGTGGTTTTTGGAAAT 3'
shPCA3 3 R	5' CGATTTCCAAAAACCACAATATGCATAAATCTAACTCCT CTCTTGAAGGAGTTAGATTTATGCATATTGTGGGGGGA 3'
shScrb1 PCA3 2 F	5'CGCGTCCCCGCACGCTCCTACGAATGCTAGTAAATTCAA GAGATTTACTAGCATTTCGTAGGAGCGTGCTTTTTTGGAAAT 3'
shScrb1 PCA3 2 R	5' CGATTTCCAAAAAGCACGCTCCTACGAATGCTAGTAAA TCTCTTGAATTTACTAGCATTTCGTAGGAGCGTGCGGGGA 3'
shScrb1 PCA3 3 F	5' CGCGTCCCCGACCCATACTTACCTAACAAACTATTTCAA GAGAATAGTTTGTTAGGTAAGTATGGGTCTTTTTTGGAAAT 3'
shScrb1 PCA3 3 R	5' CGATTTCCAAAAAGACCCATACTTACCTAACAAACTATT CTCTTGAATAGTTTGTTAGGTAAGTATGGGTCTGGGGA 3'

Como cada uma destas sequências possui aproximadamente 70 pares de base, a chance de ocorrerem erros durante sua síntese é elevada devido à perda de eficiência de acoplamento das bases durante a síntese dos oligonucleotídeos. Para atenuar este problema, fragmentamos as sequências em quatro oligonucleotídeos, sendo cada uma das fitas acima dividida em duas partes (Senso A/B e Anti-senso A/B). Desta forma, foram sintetizados quatro oligonucleotídeos com cerca de 35 pares de base cada um relativos a cada sequência codificadora de shRNA. Os oligonucleotídeos fragmentados se encontram na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Fragmentos das sequências de shPCA3 e shScrb1.

Nome do shRNA	Sequência do shRNA
shPCA3 2 F	Fragmento A: 5'CGCGTCCCCCTAGCACACAGCATGATCATTACGGTTCAA 3' Fragmento B: 5'GAGACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGTTTTTGGAAAT 3'
shPCA3 2 R	Fragmento A: 5'CGATTTCCAAAACTAGCACACAGCATGATCATTACGGT CTCTTGAACCG3' Fragmento B: 5' TAATGATCATGCTGTGTGCTAGGGGGA 3'
shPCA3 3 F	Fragmento A: 5'CGCGTCCCCCACAATATGCATAAATCTAACTCCTTCAA 3' Fragmento B: 5'GAGAGGAGTTAGATTTATGCATATTGTGGTTTTTGGAAAT 3'
shPCA3 3 R	Fragmento A: 5' CGATTTCCAAAAACCACAATATGCATAAATCTAACTCCT CTCTTGAAGGA 3' Fragmento B: 5' GTTAGATTTATGCATATTGTGGGGGGA 3'
shScrb1 PCA3 2 F	Fragmento A: 5'CGCGTCCCCGCACGCTCCTACGAATGCTAGTAAATTCA3' Fragmento B: 5'AGAGATTTACTAGCATTTCGTAGGAGCGTGCTTTTTTGGAAAT 3'
shScrb1 PCA3 2 R	Fragmento A: 5' CGATTTCCAAAAAGCACGCTCCTACGAATGCTAGTAAA TCTCTTGAATTT 3' Fragmento B: 5'ACTAGCATTTCGTAGGAGCGTGCGGGGA 3'
shScrb1 PCA3 3 F	Fragmento A: 5' CGCGTCCCCGACCCATACTTACCTAACAACTATTTCAA3' Fragmento B: 5'GAGAATAGTTTGTAGGTAAGTATGGGTCTTTTTGGAAAT 3'
shScrb1 PCA3 3 R	Fragmento A: 5' CGATTTCCAAAAAGACCCATACTTACCTAACAACTATT CTCTTGAATA 3' Fragmento B: 5'GTTTGTAGGTAAGTATGGGTCGGGGA 3'

3.3) Etapas de Preparo e Clonagem dos shRNAs

3.3.1) Anelamento dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram reconstituídos em água de injeção ajustando a concentração para 100 μM . A seguir foram misturados 15 μL dos oligos senso a 100 μM com 15 μL de sua parte complementar do oligo anti-senso a 100 μM (Senso A + Antisenso A; Senso B + Antisenso B) e a esta mistura foram adicionados 15 μL de tampão de anelamento 5x (Tris 50 mM, NaCl 100 mM) e 30 μL de água de injeção.

Esta mistura foi incubada por 1 minuto a 90°C e em seguida por 1 hora a 37°C no termociclador, para que ocorresse o anelamento. Ao final do processo, obtivemos dois pares anelados, já que as sequências foram sintetizadas de maneira a formar protuberâncias complementares, como mencionado anteriormente.

3.3.2) Fosforilação dos oligonucleotídeos

Após o anelamento, cada par de oligonucleotídeos de uma mesma sequência foi misturado de forma equimolar em um mesmo tubo e foram fosforilados através da incubação com a enzima T4 Polynucleotide Kinase (NEB) por 30 minutos a 37°, seguida de sua inativação a 70° por 10 minutos.

3.3.3) Clonagem dos oligos no plasmídeo pLVTHM

O plasmídeo pLVTHM de 11085 pb (Addgene plasmid 12247), que contém o gene repórter da proteína verde fluorescente (GFP) como marca de seleção, foi digerido com a enzima de restrição ClaI (NEB) por 45 minutos a 37°C. A seguir, foi digerido com a enzima MluI (NEB) por 90 minutos a 37°C. Após a reação de digestão, o plasmídeo foi aplicado a um gel de agarose 0,7% e as bandas referentes ao plasmídeo digerido foram sacadas do gel com auxílio de um bisturi e, posteriormente purificadas. Em seguida, o plasmídeo foi desfosforilado com a enzima Antarctic Phosphatase (NEB), de acordo com recomendações do fabricante.

Os oligos dos shRNAs anelados e fosforilados com as pontas coesivas para ClaI e MluI, foram clonados no plasmídeo pLVTHM, o qual permite a clonagem direta de shRNA anelado (WIZNEROWICZ e TRONO, 2003), através da incubação durante a noite a 22°C com T4 DNA ligase (NEB). A reação de ligação foi

suplementada com 10 mM de ATP. O esquema representativo do procedimento de clonagem pode ser observado na Figura 3.3.

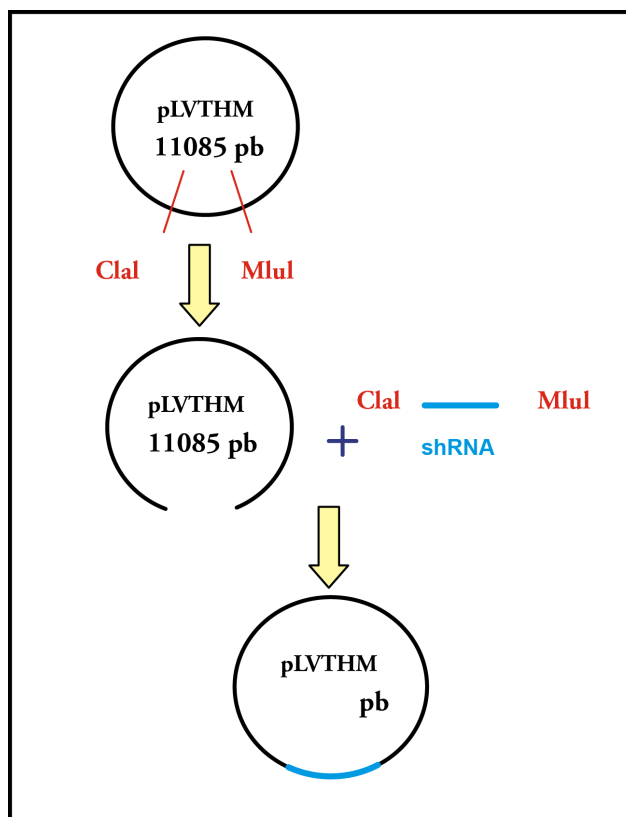


Figura 3.3: Clonagem dos shRNAs no plasmídeo pLVTHM. Os oligos foram desenhados com pontas coesivas para Clal e MluI e foram clonados entre estes sítios no plasmídeo previamente digerido com as enzimas Clal e MluI.

3.3.4) Transformação

Para a transformação, células competentes de *Escherichia coli* XL1 foram submetidas a um choque térmico, ocorrendo a formação de poros na superfície bacteriana, permitindo a entrada do DNA plasmidial na célula. As bactérias competentes foram retiradas do freezer -80°C , onde ficam armazenadas, e foram descongeladas no gelo lentamente. Após o descongelamento, foi adicionado o plasmídeo de interesse às bactérias e as mesmas foram incubadas por 30 minutos no gelo. A seguir, foi realizado o choque térmico a 42°C por 90 segundos, seguido de incubação no gelo por dois minutos. O conteúdo de cada eppendorf contendo as bactérias competentes foi colocado em um tubo do tipo falcon de 15mL e adicionou-se 1mL de LB sem antibiótico. O tubo foi incubado no agitador a 37°C por 1 hora.

Após a incubação, centrifugou-se a 14000 rpm (rotações por minuto) por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido no meio residual. A seguir, o pellet ressuspendido foi plaqueado em placa de Petri contendo LB - ágar com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa úmida a 30°C durante a noite.

3.3.5) Cultura de bactérias para seleção dos clones que possuem o shRNA de interesse

Após a transformação e incubação de 16 horas, somente as células transformadas cresceram no meio com antibiótico. Cinco a dez colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em meio LB Broth Base (Invitrogen) contendo ampicilina (100µg/mL) e deixadas no agitador a 37°C durante a noite, para que houvesse sua replicação.

3.3.6) Extração de DNA plasmidial

Para a triagem de colônias contendo plasmídeos recombinantes, a extração dos plasmídeos foi feita através do protocolo de lise alcalina com a utilização de fenol-clorofórmio conforme Sambrook e cols (2001) ou do *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega). Para a preparação dos plasmídeos para a produção de vetores virais foi utilizado o *kit* de extração plasmidial Qiagen *Plasmid Maxi kit*.

3.3.7) Triagem de colônias

Para as clonagens no plasmídeo pLVTHM, a triagem das colônias foi feita por digestão com as enzimas de restrição XbaI (NEB) e MluI (NEB).

3.3.8) Eletroforese em gel de agarose

Nos géis utilizados para a análise do plasmídeo pLVTHM digerido com ClaI e MluI, foi utilizado o percentual de 0,7% de agarose (Invitrogen) e nos géis utilizados para a análise do plasmídeo pLVTHM após a clonagem dos shRNAs digerido com XbaI e MluI, o percentual utilizado foi de 1,2% de agarose. Para o preparo dos géis,

foi utilizado o tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) com o corante Gel Red (Biotium) de acordo com as recomendações do fabricante, e a corrida foi realizada a 100 volts. Após a corrida os géis foram analisados no Gel DocXR e as bandas obtidas foram comparadas com o padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen) e 100 pb (Invitrogen).

3.8.9) Purificação de DNA de gel de agarose

Todas as purificações foram feitas utilizando o kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4) Avaliação por sequenciamento de DNA das colônias selecionadas após a clonagem

Após a triagem das colônias, os plasmídeos que após clivagem liberaram fragmentos contendo tamanho de acordo com o esperado para o inserto dos shRNAs foram submetidos a reações de sequenciamento de DNA. Estes procedimentos foram realizados na plataforma de sequenciamento da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) com os *primers* H1 e SP6, os quais se anelam no promotor H1 e no promotor SP6 da RNA polimerase, respectivamente. As seqüências dos oligonucleotídeos encontram-se na Tabela 3.4. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®). Para a reação de seqüenciamento, foram adicionados 300ng de DNA plasmidial, 0,5µL de primer a 10µM, 1,0µL de BigDye, 2µL tampão 1X e água para completar o volume final de 10µL.

Tabela 3.4: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na reação de sequenciamento.

Amplificação para Sequenciamento	
Nome do oligonucleotídeo	Sequência
H1 (primer F)	5' TCGCTATGTGTTCTGGGAAA 3'
Sp6 (primer R)	5'ATTTAGGTGACACTATAG 3'

As sequências resultantes das reações de sequenciamento de DNA foram comparadas às sequências esperadas dos plasmídeos contendo o H1 ou o SP6, adicionada do fragmento de shRNA desejado clonado. Para fazer esta comparação, utilizamos a ferramenta de alinhamento de sequências BLAST disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

3.5) Cultivo das Linhagens celulares

A linhagem celular tumoral de próstata proveniente de metastátese de linfonodo – LNCaP – utilizada neste estudo foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC). Esta linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco), L- glutamina (2mM), 100U/ml de penicilina e 100ug/ml de estreptomicina. A LNCaP é uma linhagem celular aderente, que apresenta células individuais e aglomerados frouxamente ligados. Apresenta morfologia epitelial e o seguinte perfil de análise de Repetição de Arranjos Curtos (*STR*, na sila em inglês): Amelogenin: X,Y; CSF1PO: 10,11; D13S317: 10,12; D16S539: 11; D5S818: 11,12; D7S820: 9.1,10.3; THO1: 9; TPOX: 8,9; vWA: 16,18.

A linhagem celular 293T (linhagem celular derivada de HEK293 - célula de rim embrionário humano – que foi modificada para permitir a replicação episomal de plasmídeos) foi utilizada para a geração dos vetores lentivirais. As células 293T foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco), L- glutamina (2mM) e 100U/ml penicilina e 100µg/ml estreptomicina. Ambas as linhagens foram mantidas em uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37C. A 293T é uma linhagem celular aderente, que apresenta morfologia epitelial e o seguinte perfil de análise de Repetição de Arranjos Curtos: Amelogenin: X; CSF1PO: 11, 12; D13S317: 12, 14; D16S539: 9, 13; D5S818: 8, 9; D7S820: 11; THO1: 7, 9.3; TPOX: 11; vWA: 16, 18, 19.

O repique de ambas as células foi realizado três vezes por semana por digestão com tripsina/EDTA.

3.6) Produção de vetores lentivirais

Para a produção de vetores virais derivados do HIV (lentivírus) de segunda geração, 2x10⁶ céls 293T foram plaqueadas em garrafa 75 cm² com meio DMEM.

Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e após 2 horas as células foram transfectadas pelo método de precipitação por fosfato de cálcio (GRAHAM e VAN DER EB, 1973) com 6µg do plasmídeo de envelope VSV-G, 10µg do plasmídeo de empacotamento pCMVdR8.74 e 20µg do plasmídeo de transferência pLVTHM contendo o gene de interesse (shPCA3 2, shPCA3 3, shScrbl 2 PCA3 2 , shScrbl 2 PCA3 3) conforme Figura 3.4. Também foram geradas partículas virais contendo vetores de transferência vazios (pLVTHM vazio), como controle negativo. O mapa do plasmídeo pLVTHM se encontra na Figura 3.5. O meio de cultura das células empacotadoras 293T foi trocado 18 horas após a transfecção e os sobrenadantes contendo o vírus foram recolhidos 48 horas após a transfecção. Estes sobrenadantes foram filtrados em filtros de 0,22µm (Millipore), concentrados por centrifugação (60 minutos a 14000 rpm) e utilizados imediatamente ou armazenados em alíquotas de 1 mL a -80°C.

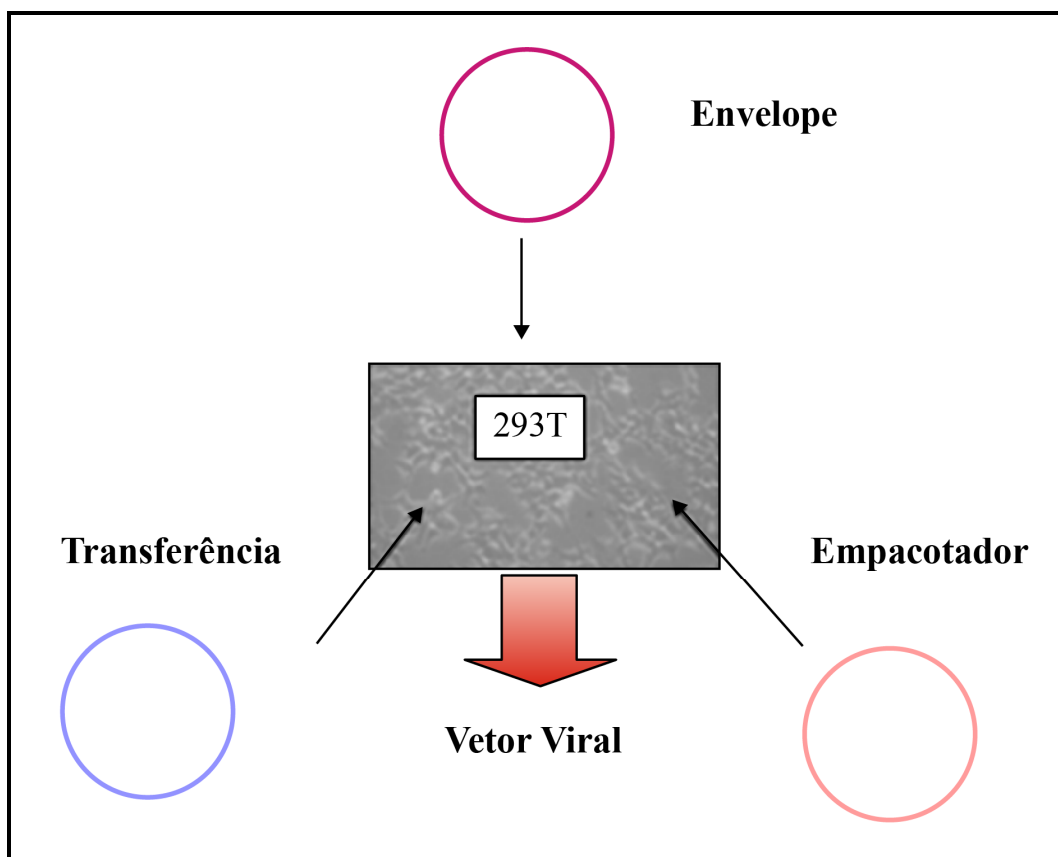
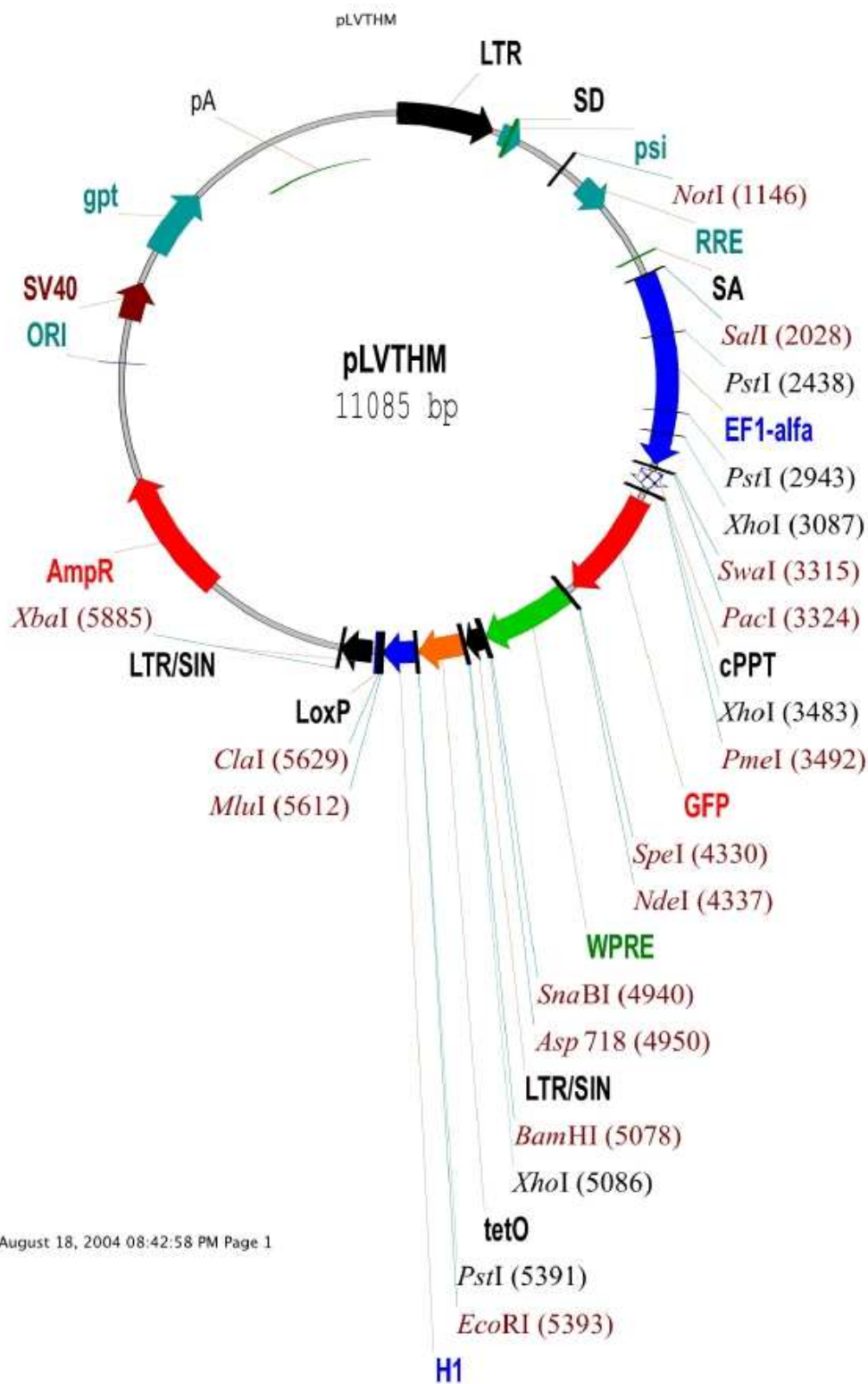


Figura 3.4: Esquema da geração de partículas virais. O plasmídeo empacotador é o pCMVdR8.74; o plasmídeo de envelope é o VSV-G; e o plasmídeo de transferência que contém a sequência de shRNA alvo (shPCA3 2, shPCA3 3, shScrbl 2 PCA3 2 , shScrbl 2 PCA3 3) é o pLVTHM.



v, August 18, 2004 08:42:58 PM Page 1

Figura 3.5: Mapa do plasmídeo pLVTHM. Neste mapa observamos a presença do promotor da RNA polimerase III - H1, dos sítios das enzimas de restrição ClaI e MluI utilizados para a clonagem das seqüências de shRNA, da seqüência que codifica o gene GFP, dentre outras seqüências. (<http://www.addgene.org/static/data/56/59/70b3ca28-af61-11e0-90fe-003048dd6500.jpeg>).

3.7) Titulação dos vetores virais

Para a titulação dos vetores virais, 1×10^6 células 293T foram plaqueadas em cada poço de placas de 6 poços. No dia seguinte, foram coletadas as células de apenas um dos poços para efetuar a contagem do número de células no dia da transdução. As células dos demais poços foram incubadas com diferentes volumes de sobrenadante do vetor viral (diluição seriada). A transdução foi realizada na presença do polication Polibrene ($8 \mu\text{g/ml}$). Além disso, centrifugação de 1800rpm durante 45 minutos foi efetuada. Dois dias após a infecção, as células 293T foram tratadas com Tripsina:EDTA, fixadas em paraformol 4% e analisadas por citometria de fluxo para avaliar o nível de expressão dos transgenes. O título de vetores virais foi calculado utilizando-se a fórmula: $\text{título} = (F \times N)/V$; onde F é a frequência de células positivas, N é o número de células 293T no dia da transdução, e V é o volume em mL de sobrenadante utilizado.

3.8) Transdução das células LNCaP com partículas virais

O número de partículas virais para cada célula alvo (MOI – do inglês *multiplicity of infection*, ou multiplicidade de infecção) foi de 10, baseado no cálculo do título viral para cada vetor. Para as transduções, $2,5 \times 10^5$ células LNCaP foram plaqueadas em cada poço de placas de 6 poços. No dia seguinte, adicionou-se o volume correspondente a 10 partículas virais por célula em cada poço a ser transduzido e foi realizada centrifugação de 1800 rpm por 45 minutos na presença de polibrene na concentração de $8 \mu\text{g/mL}$. As células foram então incubadas em estufa com 5% CO_2 a 37°C e monitoradas ao longo do tempo por microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e contagem das células viáveis com Azul de tripan. Também foi realizado RT-PCR quantitativo em tempo real a partir do RNA destas células transduzidas.

3.9) Avaliação e Monitoramento do percentual de células GFP positivas por Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences) foi utilizado para a titulação dos vetores virais, para avaliação da transdução da linhagem LNCaP e para monitoramento do percentual de células LNCaP GFP positivas ao longo do tempo.

Para isto, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%. As análises foram efetuadas com o software CellQuest (BD Biosciences) ou com o FLOWJO.

3.10) Avaliação da transdução das células LNCaP por microscópio invertido de fluorescência

O microscópio invertido de fluorescência Axio Observer Z1 (Zeiss, Alemanha) foi utilizado para monitorar as células transduzidas com os vetores lentivirais pLVTHM carreadores de shRNA. GFP contido no pLVTHM foi excitada a 489 nm e a fluorescência gerada foi lida a 510 nm. As imagens foram adquiridas com o software AxioVision Rel 4.8. Quando necessário, as fotos obtidas foram utilizadas para monitorar o percentual de células LNCaP GFP positivas ao longo do tempo. Para isto, realizou-se a contagem do número de células totais e do número de células verdes (GFP⁺) com o auxílio do programa Adobe Photoshop.

3.11) Transfecção das células LNCaP com moléculas de siRNA

Para realizar a transfecção com siPCA3 2 e siSCRBL 2,5 x 10⁵ células LNCaP foram plaqueadas em 2 mL de RPMI sem antibiótico e SFB 0,5% por poço em placa de 6 poços. Após 24h, o meio foi trocado (volume final de 1,5 mL). A seguir, realizou-se a transfecção com siPCA3 2 a 60 nM ou siScrbl a 60 nM. Para isto, foram preparadas duas soluções: uma contendo 6 uL de siRNA 20uM (concentração final 60nM) + 244 uL de Optimen e a outra contendo 5 uL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) + 245 uL de Optimen. Após 5 minutos, as soluções contendo siRNA e lipofectamina foram combinadas e mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos conforme orientação do fabricante da Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Estes cálculos são representativos para cada poço a ser transfectado com siPCA3 2 ou siScrbl. Em seguida, 500 µL da mistura foram adicionados em cada poço da placa, chegando a um volume final de 2,0 mL por poço das placas. As células foram então incubadas em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 36 horas. Após este período de incubação, as células foram coletadas para posterior extração de RNA. (FERREIRA e cols, 2012). Após extração de RNA, foi realizado RT-PCR em tempo real quantitativo para análise da expressão relativa de RNAm de PCA3, marcadores EMT, co-reguladores e diversos genes relacionados ao câncer. A expressão de genes com potencial *stemness* foi analisada por RT-PCR qualitativo.

3.12) Extração de RNA Total

O RNA total das células LNCaP transfectadas com siRNA ou transduzidas com vetores lentivirais foi extraído utilizando-se Kit de extração de RNA Total RNeasy (Qiagen). O protocolo de extração consistiu em lisar as células adicionando 350 µL de tampão de lise RLT (Kit RNeasy) e homogeneização com a pipeta/vortex. Em seguida, foram adicionados às amostras 350 µL de etanol 70% seguido de homogeneização das mesmas. As amostras foram então transferidas para as colunas de purificação e centrifugadas por 15 segundos a 10 000rpm. Foram adicionados 700 µL de tampão RW1 nas colunas e as mesmas foram centrifugadas por 15 segundos a 10 000rpm para lavagem. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão RPE às colunas e elas foram centrifugadas por 15 segundos a 10 000rpm para lavagem. Na sequência, 500 µL de tampão de lavagem RPE foram adicionados à coluna para a última lavagem (centrifugação 2 min a 10 000 rpm). Finalmente, as colunas foram transferidas para tubos “eppendorf”. Para eluição dos RNAs, 20 microlitros de água *RNase-free* foram adicionados e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 10 000 rpm. As amostras foram mantidas em freezer - 80°C para conservação dos RNAs. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 V3.2 (nanodrop Technologies, Inc-USA) a 260 nm.

3.13) Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1,0 µg de cada amostra de RNA total, segundo protocolo do kit *Superscript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). As amostras foram tratadas com DNase I Amp Grade (Invitrogen) para degradação de DNA genômico contaminante na preparação de RNA.

3.14) Análise da expressão qualitativa de genes com potencial *STEMNESS* por RT-PCR qualitativo

Para analisar a expressão qualitativa dos genes com potencial *STEMNESS* (OCT-4, Nanog, Sox-2) na linhagem celular LNCaP *wild type* (selvagem) e nas células LNCaP transfectadas com siPCA3, foi utilizado ensaio de RT-PCR. Para tal, foi preparado uma mistura de reação contendo 2 µL de tampão Taq 10X (Amersham); 0,2 µL de Taq polimerase 500 U; 0,4 µL de dNTPs 10 µM; 1µL do

oligonucleotídeo senso a 10 μ M e 1 μ L do oligonucleotídeo anti-senso a 10 μ M ; 0,6 μ L de MgCl₂ 50 mM; 1 μ L de cDNA (1000ng/ μ L) e 13,8 μ l de água destilada estéril para um volume final de 20 μ L. Foi utilizado como controle positivo cDNA sintetizado a partir de RNA total de esferas formadas a partir de linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE). As condições de amplificação dos transcritos OCT-4, Nanog, Sox-2 e GAPDH foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos. Os tamanhos esperados dos produtos são: 125 pb para OCT-4; 121 pb para Nanog, 115 pb para Sox-2 e 124 pb para GAPDH. A sequência dos primers se encontram na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na reação de RT-PCR convencional para avaliar a expressão de genes com potencial STEMNESS.

STEMNESS		
Nome do oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado
OCT4A (VARIANTE1) F	5' AGTCGGGGTGGAGAGCAAC 3'	125pb
OCT4A (VARIANTE1) R	5' GAGCTTTGATGTCCTGGGACTC 3'	
NANOG F	5' GACTGTCTCTCCTCTTCCTTCCTC 3'	121 pb
NANOG R	5' GTCTTCCTTTTTTGGCGACTC 3'	
SOX2 F	5' CTTTCATGGTGTGGTCCCGC 3'	115 pb
SOX2 R	5' CCGTCTCCGACAAAAGTTTCC 3'	
GAPDH F	5'- CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA-3'	124 pb
GAPDH R	5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT- 3'	

3.15) Análise do nível de expressão relativa de RNAm do PCA3, de genes envolvidos no programa de EMT e de co-reguladores do AR por qRT-PCR

Para quantificar a expressão relativa do mRNA do PCA3, dos co-reguladores do AR e dos marcadores da via EMT em resposta à interferência do PCA3 foi realizada reação de RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), através do sistema SYBR Green (SYBRTM Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Para isto, foram realizados dois experimentos independentes de transfecção com siPCA3 e siScrb1, sendo que para cada um foram realizadas triplicatas técnicas de qRT-PCR. Em cada placa de qRT-PCR haviam ainda duplicatas de cada amostra. A mistura da reação de PCR (20 µL) utilizada em cada poço da placa de qRT-PCR continha 10 µL de SYBR Green, 5 µL de cDNA (sintetizado a partir de 1 µg de RNA total tratado com DNase I Amp Grade), 5 µL de uma solução de primers (F+R) a 2µM. O aparelho utilizado para o qRT-PCR foi o CFX96 Real Time System (BIORAD) C1000 Thermal Cycler. Para a padronização das condições do PCR em tempo real foi realizada uma curva de diluição seriada do cDNA da LNCaP wt (1:1 a 1:16 µL) de forma a avaliar a equivalência de eficiência de amplificação do PCA3 e do gene constitutivo 18S. O mesmo foi realizado entre os marcadores de EMT, os co-reguladores e o gene constitutivo β-actina. Em todas as curvas, os valores do coeficiente de determinação (R^2) de todos os transcritos avaliados e dos constitutivos selecionados se encontravam na faixa entre 0,97 e 0,99, mostrando a reprodutibilidade dos ensaios. Além disso, foi calculada a eficiência de cada reação de PCR, através da fórmula $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})} - 1$ e, observou-se que todas as eficiências se encontravam na faixa de 90 a 110%, mostrando eficiência das amplificações. Com isto, foi possível utilizar o método de quantificação relativa denominado de $\Delta\Delta CT$, onde o nível de expressão dos genes alvo foi normalizado com base no gene de referência (seja o 18S ou a β-actina), usando o método $\Delta\Delta CT$. As análises pelo método $\Delta\Delta CT$ foram realizadas no programa Microsoft Office Excell 2007 ou prisma versão 5.0.

3.15.1) Protocolo de qRT-PCR usado para amplificação do PCA3

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do PCA3 estão localizados no exon 4. O 18S foi utilizado como gene constitutivo nestas análises. As sequências dos oligonucleotídeos se encontram na Tabela 3.6. O programa utilizado para

ciclagem consiste de uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos, uma incubação a 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. A massa de cDNA utilizada para amplificação do PCA3 foi de 1000ng.

Tabela 3.6: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR para avaliar a expressão de PCA3 após a interferência com siPCA3.

Sequência de oligonucleotídeos utilizada para avaliar a expressão de PCA3	
Nome do oligonucleotídeo	Sequência
PCA3 F	5' TTCAAAGACCCTTCGTGTTGCTGC 3'
PCA3 R	5' ATCTTGAGATGCTTCCCAGCCTGT 3'
18S F	5' AACCCGTTGAACCCATT 3'
18S R	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'

3.15.2) Protocolo de qRT-PCR utilizado para amplificação dos transcritos marcadores de EMT

A β -actina foi utilizada como controle de gene constitutivo. As sequências dos oligonucleotídeos se encontram na Tabela 3.7. O programa utilizado para ciclagem consiste de uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos, uma incubação a 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. A massa de cDNA utilizada para a amplificação destes transcritos EMT foi 250 ng.

Tabela 3.7: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR para avaliar a expressão de marcadores EMT após a interferência com siPCA3.

Marcadores EMT	
Nome do oligonucleotídeo	Sequência
E-caderina F	5' GAATGACAACAAGCCCGAAT 3'
E-caderina R	5' GACCTCCATCACAGAGGTTCC 3'
Citoqueratina-8 F	5' GCTGACCGACGAGATCAACT 3'
Citoqueratina-8 R	5' CATGGACAGCACCCACAGATG 3'
Citoqueratina-18 F	5' GCGAGAAGGAGACCATGCA 3'
Citoqueratina-18 R	5' GGTGTTCCCGGATTTTGATCT 3'
Claudina-3 F	5' CTGCTCTGCTGCTCGTGTCC 3'
Claudina-3 R	5' TTAGACGTAGTCCTTGCGGTCGTAG3'
Claudina-4 F	5' GGCTGCTTTGCTGCAACTGTC 3'
Claudina-4 R	5' GAGCCGTGGCACCTTACACG 3'
Vimentina F	5' GACAATGCGTCTCTGGCACGTCTT 3'
Vimentina R	5' TCCTCCGCCTCCTGCAGGTTCTT 3'
Twist F	5' CCCAACTCCCAGACACCTC 3'
Twist R	5' CAAAAGAAAGCGCCCAAC 3'
Snail F	5' TTCCAGCAGCCCTACGACCAG 3'
Snail R	5' CTTTCCCACTGTCCTCATC 3'
Slug F	5' TGGTTGCTTCAAGGACACAT 3'
Slug R	5' GTTGCAGTGAGGGCAAGAA 3'
β -actina F	5' TGACCCAGATCATGTTTGAGA 3'
β -actina R	5' ACTCCATGCCAGGAAGGA 3'

3.15.3) Protocolo de qRT-PCR usado para amplificação dos transcritos co-reguladores da via do AR

A β -actina foi o gene constitutivo utilizado como controle. As sequências dos oligonucleotídeos se encontram na Tabela 3.8. O programa utilizado para ciclagem consiste de uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos, uma incubação a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C por 40 segundos. A massa de cDNA utilizada para a amplificação destes transcritos co-reguladores da via do AR foi 250 ng.

Tabela 3.8: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR para avaliar a expressão de co-reguladores da via do AR após a interferência com siPCA3.

Co-reguladores	
Nome do oligonucleotídeo	Sequência
ARA70 F	5'ACAATTACTCTGCGCCAGACCA 3'
ARA70 R	5'GCTGAACTAGCATGAGCCATCAA3'
ARA54 F	5'AGAGATGGAAAGTAAGGAGTG 3'
ARA54 R	5'GACGGAAGATTAGGGAAAAAC 3'
EBP1 F	5'AGCGACCAGGATTATATTCTCAAG 3'
EBP1 R	5'ATAACATCTGCTTTCCTCCCTG 3'
Ciclina D1 F	5'TCTACACCGACAACCTCCATCCG 3'
Ciclina D1 R	5'TCTGGCATTGTTGGAGAGGAAGTG 3'
Smad 3 F	5'CCCCAGCACATAATAACTTGG 3'
Smad 3 R	5'AGGAGATGGAGCACCCAGAAG 3'
Smad 4 F	5'TTGCTTCCACTTGAATGCTG 3'
Smad 4 R	5'CTTCAAAGGGGACACCAAAA 3'

Após o programa de ciclagem para a amplificação de todos os transcritos citados no item 3.15, foi realizada uma curva de dissociação (*melting curve*) para verificar se havia um pico único, mostrando que o produto amplificado correspondia ao produto específico de interesse. Essa curva consiste de um incremento de temperatura de 0,5°C a cada 0,5 segundos variando de 60°C a 90°C.

3.16) Análise do nível de expressão relativa de RNAm de 84 genes relacionados ao Câncer por PCR ARRAY

Para quantificar a expressão relativa do mRNA de diversos genes relacionados ao em células LNCaP transfectadas com siPCA3 ou siScrb1 foi realizada um *PCR Array* (The Human Cancer Pathway Finder SuperArray; PAHS-033A; Qiagen). Este *array* possibilita avaliar 84 genes que relacionados a seis vias biológicas envolvidas na transformação e na tumorigênese (controle de ciclo celular e reparo de danos ao DNA; apoptose e senescência celular; moléculas de transdução de sinal e fatores de transcrição; adesão; angiogênese; invasão e metástase). Além desses, a placa do PCR Array continha 5 genes endógenos (β 2 microglobulina, hipoxantina, proteína ribossomal L13a, GAPDH e β -actina) usados para normalizar o nível de expressão. O arranjo conta ainda com controles positivos, controles da transcrição reversa e controles de contaminação por DNA genômico. A reação de qRT-PCR foi realizada através do SYBR Green qPCR Mastermix. Para isto, foram realizados dois experimentos independentes de transfecção com siPCA3 e siScrb1. Para cada um, foram preparadas duas placas de *PCR Array*: uma para o cDNA de células LNCaP transfectadas com siPCA3 e outra para o cDNA de células LNCaP transfectadas com siScrb1. As reações de qRT-PCR foram corridas no equipamento CFX96 Real Time System cycler (BIORAD, Hercules, CA) C1000 Thermal Cycler. O programa utilizado para ciclagem consiste de uma incubação por 10 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C for 1 minute. Após as corridas, os dados foram analisados usando a planilha de cálculo da Qiagen disponível na internet: <http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php> que emprega o método $\Delta\Delta CT$. Nas análises, foi realizada a comparação da expressão gênica de células transfectadas com siPCA3 em relação ao controle de células transfectadas com siScrb1. Somente os genes cujo nível de expressão relativa de RNAm se apresentou maior que 2 ou menor que -2, considerando $P < 0.05$, foram destacados em gráficos e considerados para estudo.

3.17) Contagem do número de células viáveis por Azul de Tripán

As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa as células foram ressuspendidas em 10 mL de PBS 1x e uma alíquota de 10 μ L foi homogeneizada com 10 μ L de azul de tripan 0,4%. As células foram colocadas na câmara de Neubauer e observadas no microscópio óptico. As células viáveis foram contadas e foi realizado o seguinte cálculo: concentração de células viáveis (Cv) presentes na suspensão celular $C = nv \times 10^4 \times 2$, sendo que C (concentração) é o número de células existentes em 1 mililitro de suspensão celular, e nv é a média do número total de células viáveis observado nos quatro quadrantes da câmara de contagem.

3.18) Marcação das células LNCaP interferidas com Vimentina-Cy3

Para realizar a marcação das células transfectadas com siPCA3 ou siScrb1 com Vimentina-Cy3, inicialmente realizou-se a esterilização das lamínulas em microondas por 3 ciclos de 8 minutos. Em seguida, dentro do fluxo laminar, as lamínulas foram expostas ao UV por 30 minutos (15 minutos cada lado da lamínula) e, então colocadas dentro de placa de 24 poços com o auxílio de pinça estéril. Adicionou-se 1 mL de meio RPMI com 10% SFB em cada poço contendo a lamínula e, a seguir, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 1 hora. Depois do período de incubação, as lamínulas foram lavadas com meio RPMI sem SFB e 1,5x10⁵ células LNCaP wt foram plaqueadas em meio RPMI 0,5% SFB sem antibiótico. Após 24h, estas células foram transfectadas com siPCA3 e siScrb1, conforme item 3.11. Após 36h, iniciou-se o procedimento de marcação com vimentina-Cy3. Nesta fase, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS pH 7.0 e fixadas por 10 minutos em temperatura ambiente com 4% paraformaldeído em PBS/CM pH8.0. Foram lavadas 2x com PBS/ CM pH 8.0 por 5 minutos. Após as células terem sido fixadas, elas foram permeabilizadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 0,2% BSA + 0,1% Triton x-100 em PBS/CM pH 8.0. As lamínulas foram lavadas 3x com PBS/ CM pH 8.0 por 5 minutos e bloqueadas por 15 minutos em temperatura ambiente com 50 mM de NH₄Cl em PBS/CM pH 8.0. A seguir, incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo Vimentina-Cy3 (Sigma) (diluição 1:300), diluído em 0,2% BSA + 0,1% Triton em PBS/CM pH 8.0. Depois lavou-se 5x com PBS/CM pH 8.0 por 5 minutos. Foi gotejada uma gota (5 μ L) de n-propil-galacto em cada lâmina para conservar a

fluorescência do anticorpo. Cada duas lamínulas foram colocadas em uma lâmina. Foram realizadas duplicatas de poços com células transfectadas com siPCA3 e duplicatas de poços com células transfectadas com siScrbl. As lamínulas nas lâminas foram seladas com esmalte e guardadas a temperatura ambiente para posteriormente serem observadas no microscópio confocal. Foram realizados dois experimentos independentes.

3.19) Análise da expressão de vimentina por microscopia confocal

O microscópio confocal FV10i (Olympus, Japão) foi utilizado para visualizar a marcação com o anticorpo vimentina-Cy3 36h horas após a transfecção com siPCA3 e siScrbl. Cy3 foi excitado a 547 nm e captado a 567 nm. O software utilizado para adquirir as imagens é denominado FV10-ASW. Além de adquirir as imagens, através deste software foi possível realizar a marcação de diversos campos e solicitar a média da intensidade de fluorescência (pixel) de cada um. A seguir, o próprio software nos fornece uma média de todas as médias de fluorescência. Ao final, foram reunidas as médias de todas as fotos tiradas de cada lamínula para se chegar ao resultado de intensidade de fluorescência das células transfectadas por siPCA3 e por siScrbl.

3.20) Análises Estatísticas

Os dados das análises do nível de expressão relativa dos marcadores EMT e dos co-reguladores foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para avaliar a significância estatística destes ensaios, foi utilizado intervalo de confiança de 95% através do Microsoft Excell 2007 e prisma 5.0.

No gráfico de análise da expressão de vimentina, foi realizado teste da mediana no programa SPSS.

No PCR ARRAY foi utilizado Test T Student e $p < 0.05$ através da planilha de cálculo do Microsoft Excell 2007 disponibilizado pela Qiagen no site <http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>.

4) RESULTADOS

4.1) O nível de expressão do PCA3 encontra-se diminuído após o silenciamento transiente com siRNA.

O silenciamento por meio de interferência de RNA empregando moléculas de siRNA foi escolhido a fim de diminuir os níveis de expressão relativa do RNAno PCA3, uma vez que nosso grupo já havia estabelecido este protocolo (FERREIRA e cols, 2012). Após a inibição transiente do PCA3 com siRNA, foram realizados ensaios de qRT-PCR para analisar o nível de expressão relativa do PCA3. Foi observado que este transcrito apresentou expressão reduzida em 1,44 vezes nas amostras de células interferidas com siPCA3, quando comparado com células controle transfectadas com siScrb1 (controle) (Figura 4.1). Este resultado é representativo de dois experimentos independentes, cada um com triplicatas técnicas (n=6), realizados para avaliação do nível de expressão do PCA3, sendo observada uma redução na expressão num intervalo de 1,14 até 4,21 vezes, em amostras de células interferidas com siPCA3 em relação ao controle. Diante deste resultado, foi investigada a expressão de genes co-reguladores da via do AR, genes com potencial *stemness*, marcadores do programa de EMT e diversos genes relacionados às principais vias de sinalização do câncer, conforme descrito a seguir.

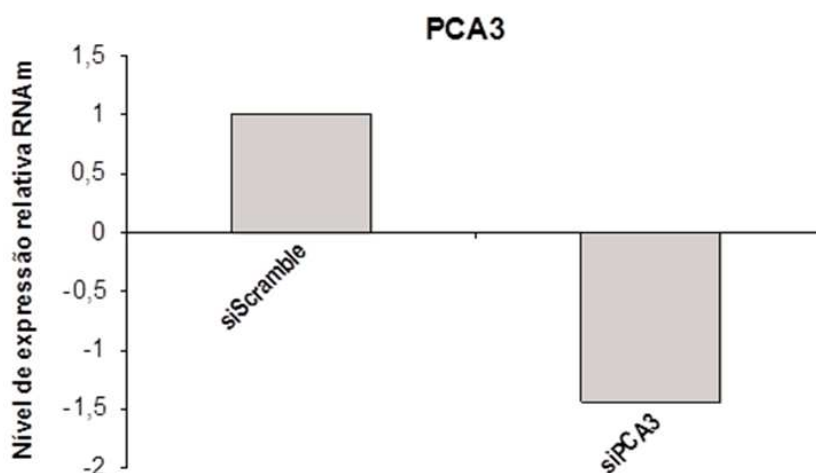


Figura 4.1: Nível de expressão relativa de mRNA do PCA3 em células LNCaP 36h após a interferência com siRNA. Este resultado é representativo de dois experimentos independentes da avaliação do nível de expressão do PCA3 36h após a interferência com siPCA3, cada um com triplicatas técnicas (n=6).

4.2) O silenciamento do PCA3 promove desregulação da expressão de co-reguladores da via do AR.

Dados prévios de nosso grupo de pesquisa mostram que, ao realizar a interferência transiente do PCA3 em células LNCaP, observa-se uma diminuição na expressão dos genes de resposta da via do AR (FERREIRA e cols, 2012). Como parte das possíveis hipóteses que possam explicar a diminuição da expressão dos genes alvo da via do AR, postulamos que este ncRNA pode estar envolvido na modulação da expressão de co-reguladores desta via. Isso porque o AR pode recrutar proteínas capazes de aumentar (co-ativadores) ou reduzir (co-repressores) sua transativação. Com o objetivo de investigar o papel do PCA3 na modulação da expressão de transcritos codificadores de alguns co-reguladores representativos da via do AR foram realizados ensaios de qRT-PCR após a inibição da expressão do PCA3 para avaliar a expressão dos co-ativadores ARA 54 e ARA 70 e dos co-repressores SMAD 3, SMAD 4, EBP1 e Ciclina D1 do AR. Na análise do nível de expressão relativa destes transcritos, foi observado um aumento significativo na expressão de ARA 54 e ARA 70 nas células LNCaP transfectadas com siPCA3 em comparação às células controle transfectadas com siScrb1 (IC 95%). A expressão de EBP1 e SMAD 3 também apresentou aumento nestas mesmas amostras, porém não atingindo significado estatístico (IC 95%). Já os transcritos ciclina D1 e SMAD4 apresentaram expressão diminuída, porém sem significância estatística (IC 95%), conforme apresentado na Figura 4.2. Em conjunto, estes dados indicam que a desregulação nos níveis de expressão dos co-reguladores do AR após o silenciamento do PCA3 pode estar modulando negativamente a expressão dos genes alvo desta via.

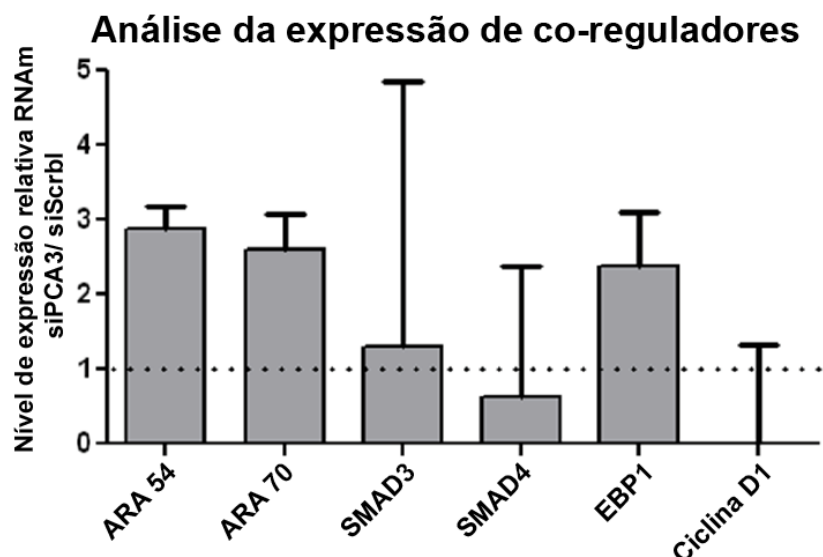


Figura 4.2: Perfil de expressão gênica de co-reguladores da via do AR 36h após o silenciamento transiente do PCA3 em células LNCaP. O gráfico apresenta o nível de expressão de RNAm em células interferidas com siPCA3 em relação às células transfectadas com siScrb1. Os dados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, cada um com triplicatas técnicas (n=6), sendo representados como média \pm desvpad (n=6). Para avaliar a significância estatística destes ensaios, foi utilizado intervalo de confiança de 95%.

4.3) O PCA3 pode modular a sobrevivência das células LNCaP através de moléculas de transdução de sinal e de fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral.

Com o objetivo de investigar os mecanismos regulatórios que possam estar modulando o papel do ncRNA PCA3 na sobrevivência das células de CaP, realizamos ensaios de *PCR Array (The Human Cancer Pathway Finder SuperArray)*. Neste ensaio, avaliamos a expressão de 84 genes relacionados às principais vias de sinalização do câncer: controle de ciclo celular e reparo de danos ao DNA; apoptose e senescência celular; moléculas de transdução de sinal e fatores de transcrição; adesão; angiogênese; invasão e metástase. Dentre os genes investigados, 16 apresentaram nível de expressão relativa de RNAm pelo menos duas vezes aumentado ou diminuído em células LNCaP transfectadas com siPCA3 em relação às células transfectadas com siscrb1. Os genes que apresentaram aumento de expressão em células interferidas para o PCA3 foram: BAD, COL18A1, ERBB2, ITGB1, JUN, MTA2, MTSS1, PIK3R1, TNFRSF25 e VEGFA. Por outro lado, os genes que apresentaram diminuição de expressão foram: BRCA1, FOS, IFNB1,

MAP2K1, PLAUR e TERT, conforme ilustrado na Tabela 4.1. As funções atribuídas a cada um destes genes também foi descrita nesta tabela. Os genes que apresentaram nível de expressão relativa de RNAm alterado em células LNCaP interferidas para o PCA3 representam cerca de 20% do total de genes estudados (Figura 4.3A). Além disso, é possível observar que 5 dos 16 genes com expressão relativa de RNAm alterada são moléculas de transdução de sinal ou fatores de transcrição (ERBB2, FOS, JUN, MAP2K1 e PIK3RI). Isso representa um percentual de 31,25% do total de genes com expressão significativamente alterada conforme apresentado na Figura 4.3B. Observamos ainda que 18,75% dos genes diferencialmente expressos estão envolvidos na angiogênese. Outros 18,75% são relacionados à apoptose e à senescência celular, enquanto 12,50% deles apresentam função de adesão. Outros 12,50% estão envolvidos em processos de invasão e metástase e 6,25% estão relacionados à processos de reparo de DNA (Figura 4.3 B). Estes resultados indicam que a diminuição no nível de expressão do ncRNA PCA3 por RNAi envolve moléculas chaves de transdução de sinal ou fatores de transcrição que podem modular a sobrevivência das células de câncer de próstata.

Tabela 4.1: Função de cada um dos 16 genes cuja expressão relativa de RNAm se encontra alterada. Células em azul apresentam aumento no nível de expressão relativa de RNAm; células em vermelho apresentam diminuição no nível de expressão relativa de RNAm. Todos os genes que constam da tabela apresentam valores significativos de $2^{(-\Delta\text{Ct})}$ ($p < 0.05$).

Gene	Função	Nível de expressão relativa de RNAm
MAP2K1	Molécula de Transdução de Sinal e Fator de Transcrição	-4,5
ERBB2	Molécula de Transdução de Sinal e Fator de Transcrição	3,63
TERT	Apoptose e Senescência celular	-3,55
MTSS1	Adesão	3,08
PIK3R1	Molécula de Transdução de Sinal e Fator de Transcrição	2,99
BRCA1	Reparo de DNA	-2,78
MTA2	Invasão e metástase	2,77
FOS	Molécula de Transdução de Sinal e Fator de Transcrição	-2,72
IFNB1	Angiogênese	-2,48
COL18A1	Angiogênese	2,46
JUN	Molécula de Transdução de Sinal e Fator de Transcrição	2,32
VEGFA	Angiogênese	2,24
PLAUR	Invasão e metástase	-2,23
BAD	Apoptose e Senescência celular	2,21
ITGB1	Adesão	2,09
TNFRSF25	Apoptose e Senescência celular	1,97

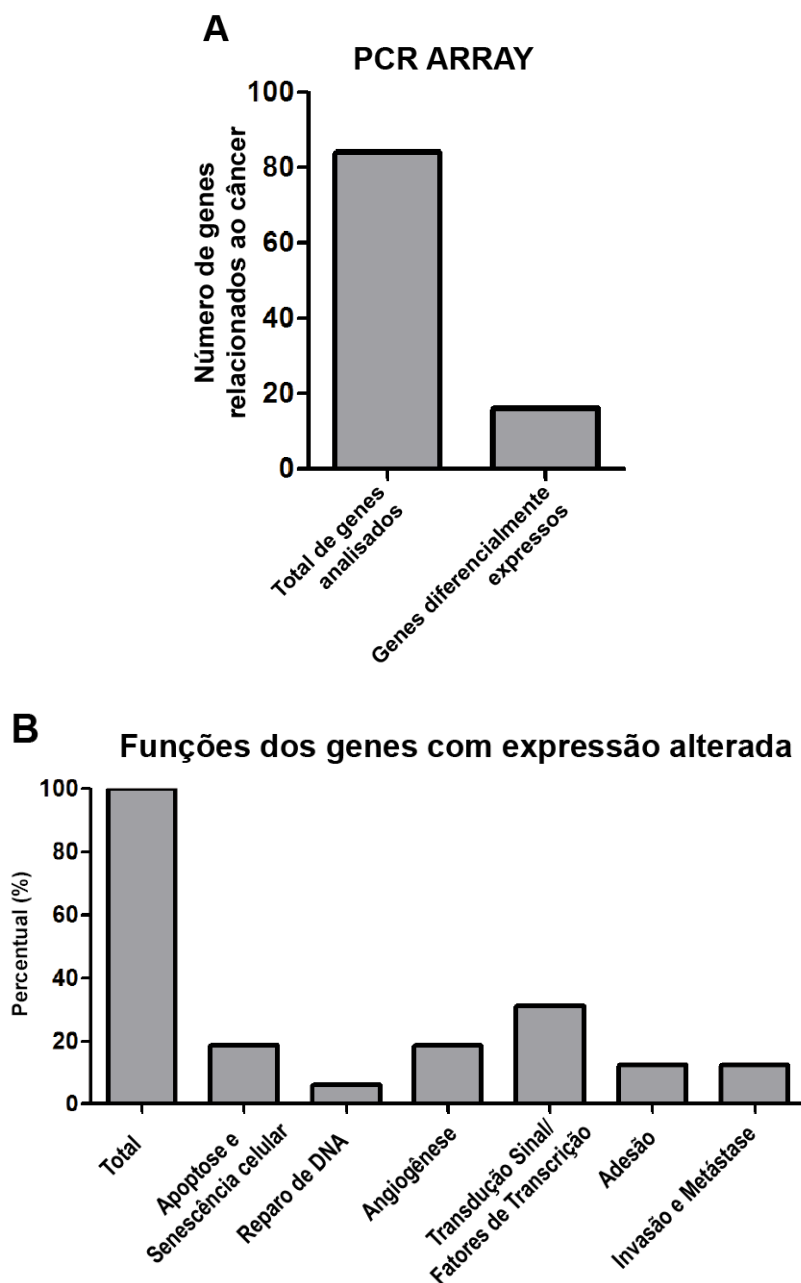
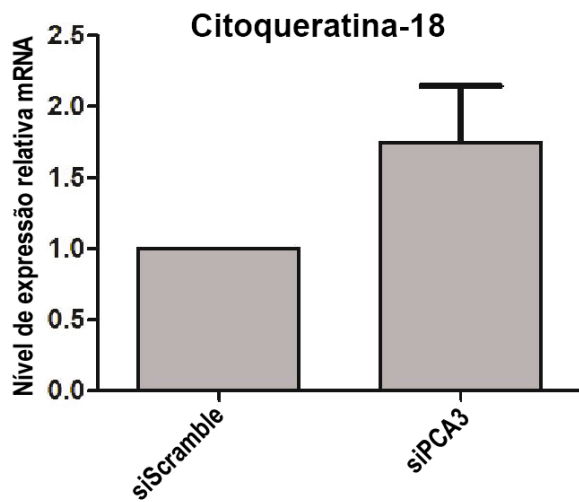
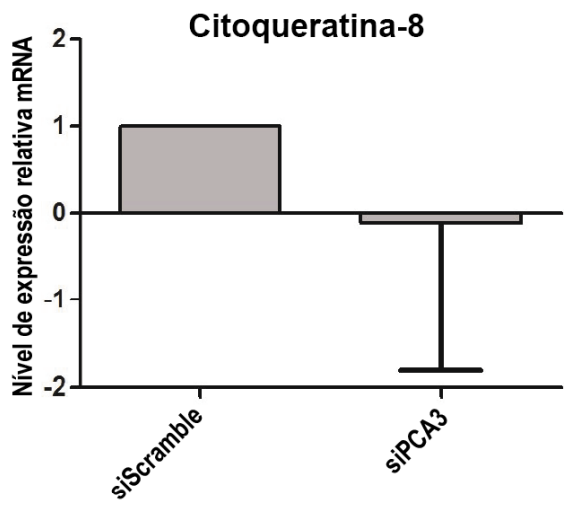
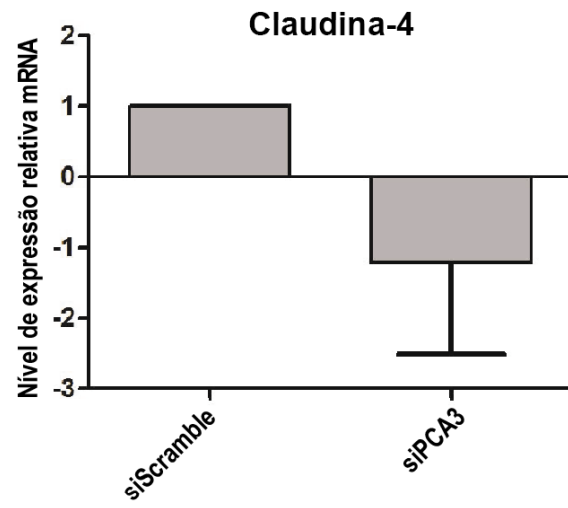
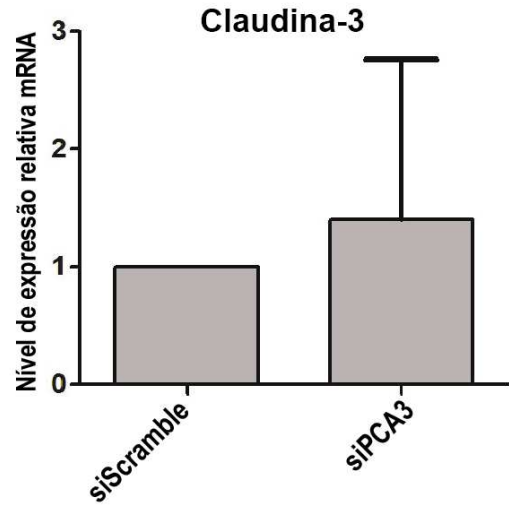
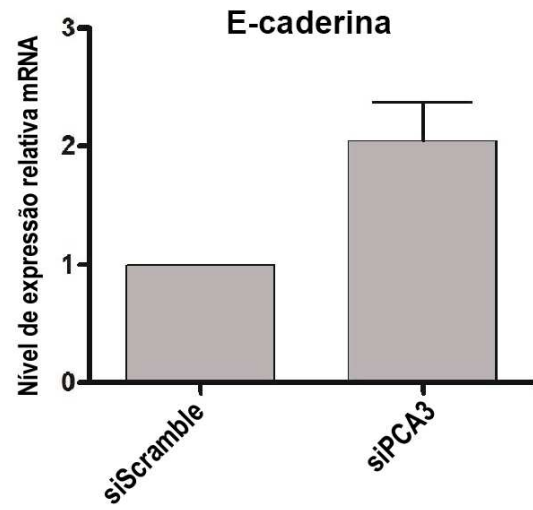


Figura 4.3: Análise do impacto da interferência do PCA3 nas principais vias de sinalização do câncer por PCR ARRAY. A) Percentual de genes com expressão significativamente alterada após o silenciamento do PCA3 por siRNA. B) Distribuição dos genes com expressão significativamente alterada após o silenciamento do PCA3 nas seis vias de sinalização do câncer estudadas. Os dados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. Para avaliar a significância estatística destes ensaios, foi utilizado intervalo de confiança de 95%, $p < 0.05$.

4.4) Alguns marcadores do programa EMT podem estar envolvidos na modulação da sobrevivência das células de CaP regulada pelo PCA3

Para melhor compreender através de quais mecanismos moleculares o PCA3 modula a sobrevivência da linhagem celular LNCaP, também investigamos o perfil de expressão de transcritos codificadores de genes envolvidos no clássico programa EMT em células LNCaP com expressão diminuída do PCA3. Decidimos investigar marcadores deste programa, visto que já foi descrito na literatura que EMT é um evento capaz de modular o crescimento e a sobrevivência das células tumorais (SABBAH e cols, 2008). Sendo assim, nós hipotetizamos que a diminuição da sobrevivência celular observada após a diminuição da expressão do PCA3 poderia ter alguma relação com a reversão do programa EMT clássico. Decidimos então avaliar a expressão de transcritos codificadores de marcadores epiteliais do programa de EMT, tais como E-caderina, Claudina-3 e 4 e as Citoqueratinas-8 e 18 (Figura 4.4A), além de alguns marcadores mesenquimais como Vimentina, Snail, Twist e Slug (Figuras 4.4B) em células cuja expressão do PCA3 apresentou-se diminuída após a interferência por siRNA. Observamos aumento na expressão de E-caderina, Claudina-3, Citoqueratina-18, Snail, Twist e Slug e diminuição na expressão de Claudina-4, Citoqueratina-8 e Vimentina (Figuras 4.4 A e 4.4B respectivamente). Em conjunto, estes resultados indicam que houve uma reversão parcial do programa EMT, em que algumas características mesenquimais são retidas junto com características epiteliais adquiridas, ao invés de uma reversão total da EMT clássica, durante a qual as células perdem as características mesenquimais e retêm as epiteliais. Isto significa que o perfil de expressão observado para marcadores epiteliais e mesenquimais do clássico programa de EMT não parece mediar a sobrevivência das células LNCaP após a diminuição da expressão do PCA3. Apesar disso, alguns marcadores deste programa podem individualmente estar envolvidos na modulação da sobrevivência das células de CaP após o silenciamento do PCA3.

A



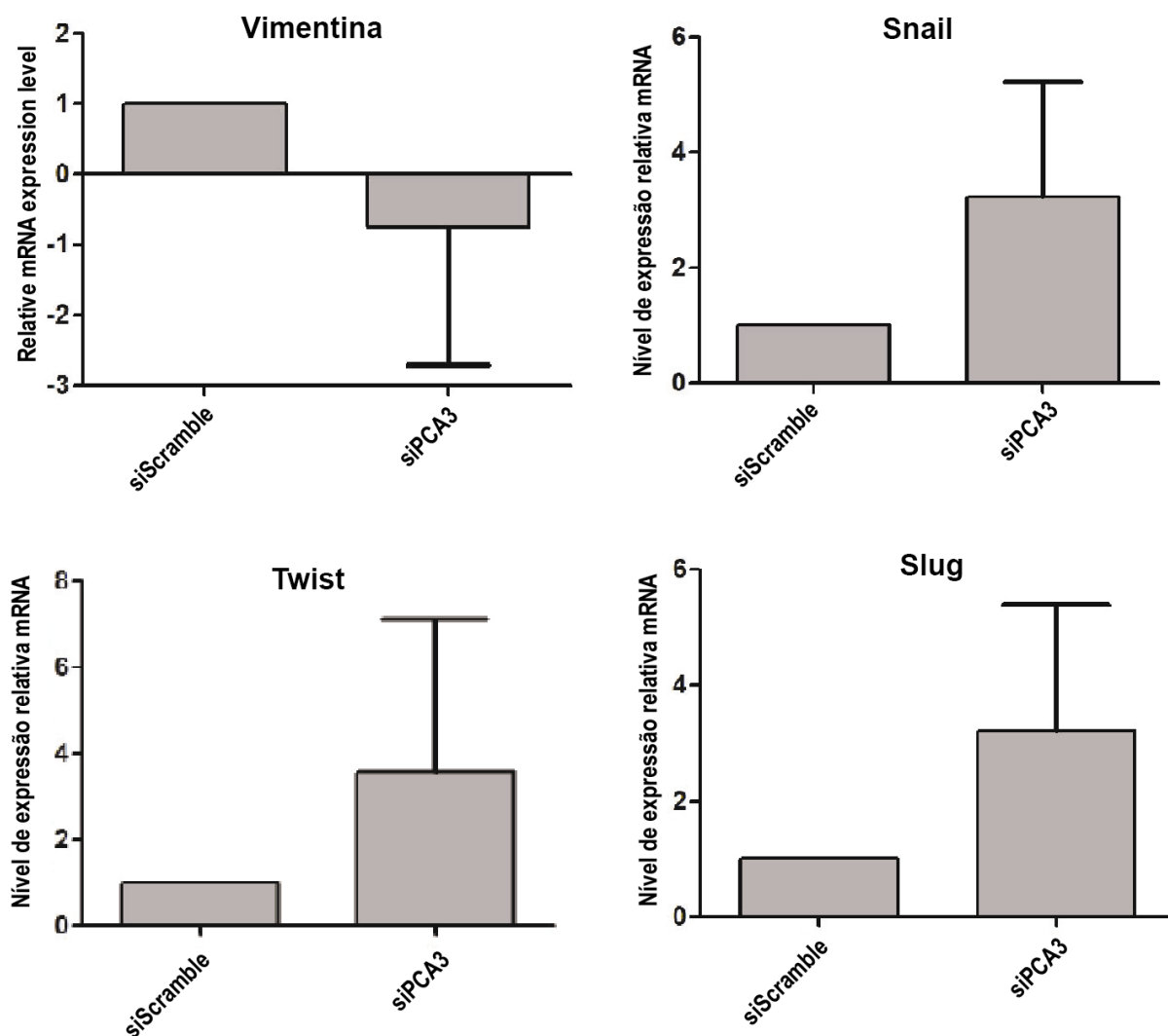
B

Figura 4.4: Perfil de expressão de genes marcadores (A) epiteliais e (B) mesenquimais do programa de EMT 36h após a interferência de células LNCaP com siPCA3 em relação às células transfectadas com siScrbl. Os dados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, cada um com triplicatas técnicas (n=6), sendo representados como média \pm desvpad (n=6). Para avaliar a significância estatística destes ensaios, foi utilizado intervalo de confiança de 95%.

Uma vez que a avaliação do nível de expressão dos transcritos que codificam marcadores do programa de EMT em células transfectadas com siPCA3 sugeriu reversão parcial deste programa, selecionamos um destes marcadores (no caso, a vimentina) para avaliar a expressão da proteína de forma a validar estes resultados. A seguir, as lâminas marcadas com anticorpo vimentina-CY3 foram visualizadas em microscópio confocal (Figura 4.5 A, B, C, D, E, F, G, H) e observou-se expressão similar da proteína vimentina, tanto em células transfectadas com siPCA3 quanto

naquelas transfectadas com siScrbl (Figura 4.5 D e H). Ao analisar a média das médias das intensidades de fluorescência e ao aplicar o teste estatístico das medianas, observou-se que não há diferença significativa entre as medianas representadas no gráfico da Figura 4.5 I. Este resultado mostra que, após a transfecção das células LNCaP com siPCA3, observamos uma diminuição na expressão da vimentina a nível de transcrito, porém não observamos alteração na expressão a nível de proteína. Dessa forma, para concluirmos o envolvimento de marcadores EMT na modulação da sobrevivência celular após a transfecção das células com siPCA3, é necessário investigar a expressão proteica de outros marcadores da EMT previamente analisados por qRT-PCR.

Análise da expressão da proteína vimentina

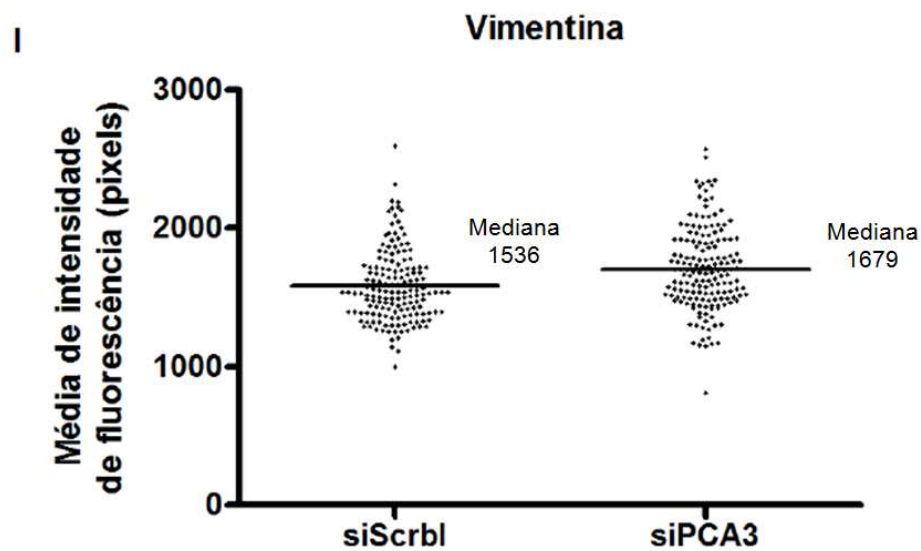
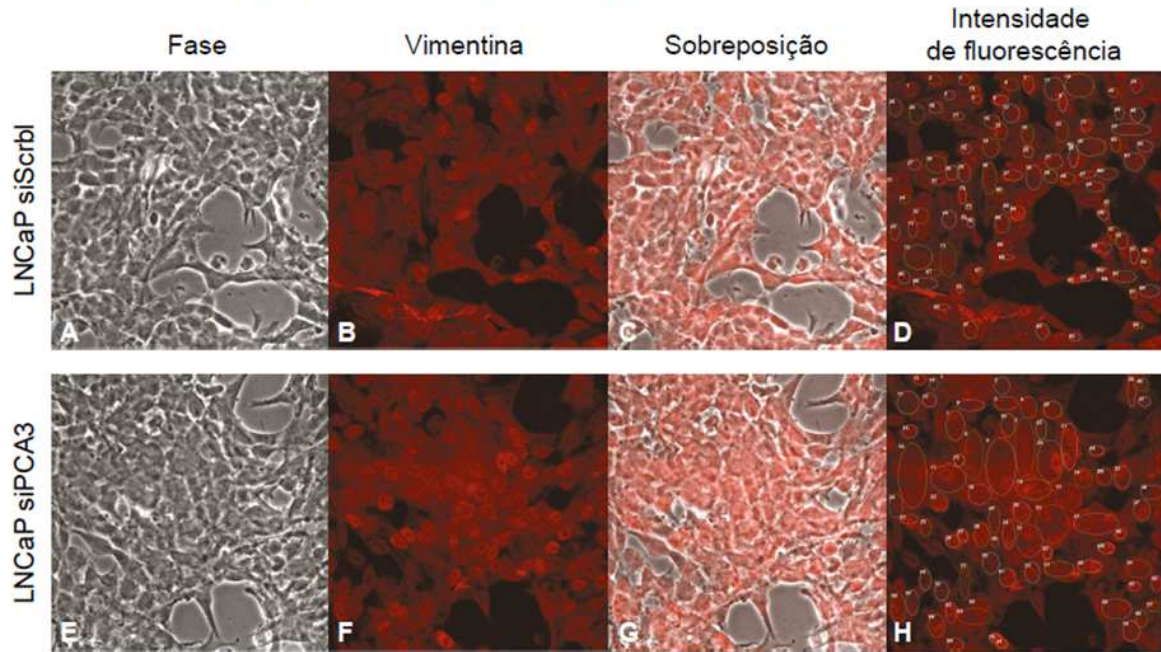


Figura 4.5: Expressão da vimentina 36h após interferência das células LNCaP com siPCA3 em comparação às células transfectadas com siScrbl. Após a interferência das células LNCaP com siPCA3 ou siScrbl, foi realizada marcação com o anticorpo vimentina Cy3 e as células foram visualizadas por microscopia confocal. A e E) Visualização das células na luz visível; B e F) Visualização das células marcadas com anticorpo na luz fluorescente; C e G) Sobreposição das imagens da luz visível com as da luz fluorescente; D e H) Marcação de diversos campos para obter a média da intensidade de fluorescência (pixel) de cada um. I) Análise da expressão da vimentina através das médias de fluorescência. A partir do gráfico, foi realizado o teste da mediana entre a amostra de células interferidas para o PCA3 e

o controle de células transfectadas com siScrbl. Para avaliar a significância estatística destes ensaios, foi utilizado intervalo de confiança de 95%, $p < 0.05$. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

4.5) Expressão de genes com o perfil *STEMNESS* após o silenciamento do PCA3 em células LNCaP.

Células que passam pelo programa de EMT compartilham muitas características das células tronco tumorais (potencial *stemness*) (KONG D. e cols, 2010). Com o objetivo de avaliar a relação do programa de EMT e do PCA3 com a modulação da sobrevivência de células LNCaP, após a diminuição da expressão deste RNAnc, decidimos verificar se haveria reversão do potencial de células tronco após diminuição da expressão do PCA3, assim como foi observada reversão, ainda que parcial, do programa de EMT. Dessa forma, decidimos avaliar a expressão por RT-PCR qualitativo de genes com potencial *stemness* Sox 2, Nanog e Oct 4 em células cuja expressão do PCA3 apresentou-se diminuída após a interferência por siRNA. Não foi observada expressão de Nanog, Oct 4 e Sox 2 em células LNCaP wt ou LNCaP interferidas para o PCA3. O controle positivo de esferoides apresentou a banda referente a todos os produtos de amplificação esperados Nanog (121 pb), Oct 4 (125 pb), Sox 2 (115 pb) e GAPDH (124pb), conforme Figura 4.6. Estes resultados indicam que o ncRNA PCA3 não induz alteração na expressão de genes típicos de *STEMNESS* em células LNCaP wt e interferidas para o PCA3, apesar de termos observado uma reversão parcial na expressão de alguns marcadores do EMT.

Análise do potencial stemness

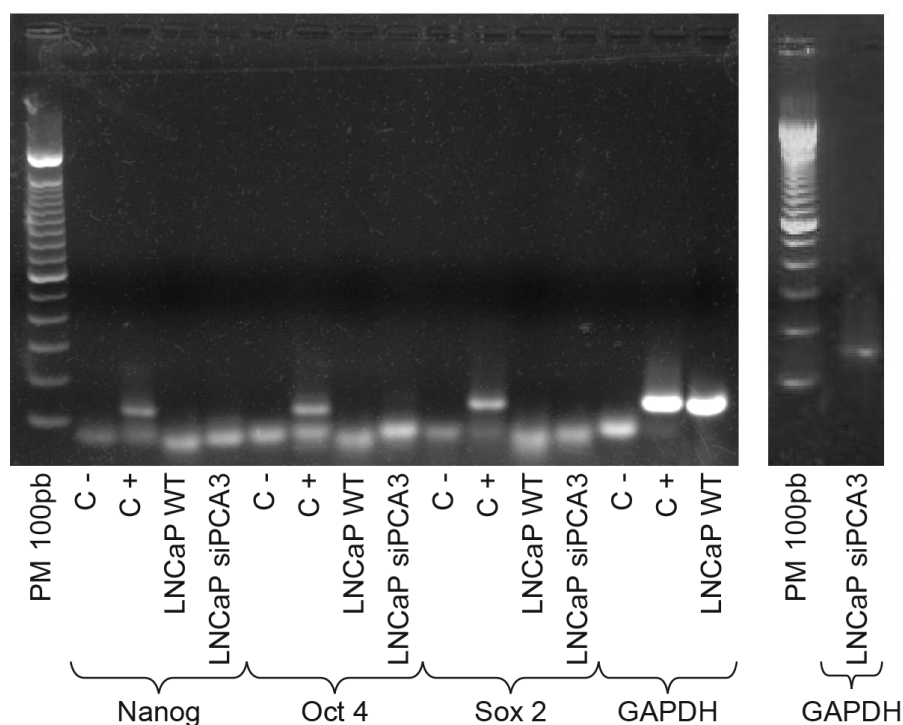


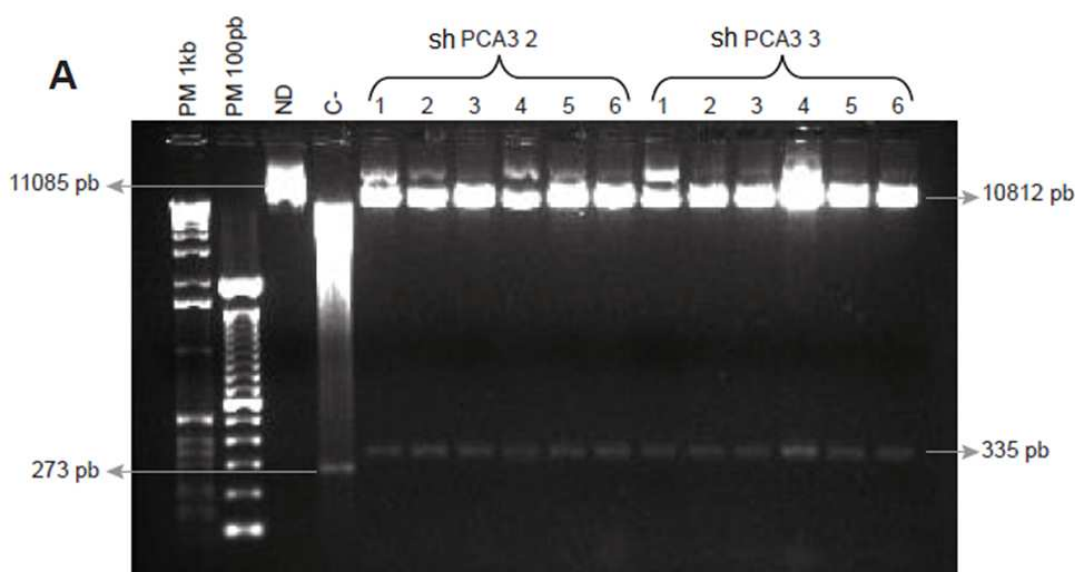
Figura 4.6: Perfil de expressão de genes responsáveis pelo potencial STEMNESS (NANOG, Oct 4 e SOX 2) 36h após o silenciamento do PCA3. Gel de agarose 2,0% Linhas 1 e 17: Peso Molecular de 100 pb; Linhas 2, 6, 10 e 14: Controle Negativo; Linhas 3, 7, 11 e 15: Controle positivo de esferas formadas a partir de linhagens de carcinoma epidermóide de esôfago. Linhas 4, 8, 12 e 16: LNCaP selvagem (*Wild type*); Linha 5, 9, 13 e 18: LNCaP interferida para o PCA3. Os tamanhos esperados dos produtos eram: 125 pb para OCT-4; 121 pb para Nanog, 115 pb para Sox-2 e 124 pb para GAPDH. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

4.6) Construção de vetores lentivirais para expressão estável do shRNA específico para o PCA3.

Os dados apresentados até o presente momento se referem a condições experimentais em que utilizamos moléculas de siRNAs para induzir interferência do ncRNA PCA3. Uma vez que a diminuição da expressão transitória do PCA3 induz significativa diminuição da sobrevivência de células de CaP (FERREIRA e cols, 2012), decidimos elaborar estratégias de silenciamento estável do PCA3, vislumbrando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para negativamente

modular a sobrevivência de células de CaP. Assim, construímos plasmídeos de transferência a serem utilizados na produção de vetores virais, capazes de possibilitar a expressão estável de moléculas de shRNAs específicas para o PCA3 e do gene repórter da proteína verde fluorescente GFP. Realizamos primeiramente a clonagem de sequências codificadoras de shRNAs (shPCA3 2, shPCA3 3, shScrbIPCA3 2 e shScrbIPCA3) no plasmídeo lentiviral pLVTHM e verificamos a clonagem através de eletroforese, conforme Figuras 4.7 A e 4.8 A. Os clones recombinantes geraram produtos de clivagem contendo 335 pb, correspondente ao tamanho das sequências codificadoras dos shRNAs (shPCA3 2 e shPCA3 3) ou *scramble* (shScrbI PCA3 2 e shScrbI PCA3 3), além da banda de 10812 pb referente ao *backbone* do vetor. Desta forma, isolamos o clone de número 3 como recombinante contendo inserto de shPCA3 2 e o clone de número 5 contendo inserto de shPCA3 3, conforme Figura 4.7 A. Além disso, isolamos o clone de número 5 como recombinante de shScrbI PCA3 2 e o clone de número 1 como recombinante de shScrbI PCA3 3, conforme Figura 4.8 A.

Para confirmar a clonagem das sequências de shRNA desejadas no plasmídeo pLVTHM, foram sequenciados os plasmídeos contendo os fragmentos de DNA de tamanho de acordo com as sequências clonadas de shRNAs. As sequências geradas após sequenciamento de DNA dos clones recombinantes identificados pelo padrão de clivagem com enzimas de restrição foram analisadas para identificação dos insertos de shRNAs clonados, conforme Figuras 4.7 B-C e 4.8 B-C. Através da análise das sequências de DNA geradas a partir dos clones recombinantes foi possível confirmar que todas as sequências codificadoras dos shRNAs desejadas foram clonadas no plasmídeo pLVTHM.



B

shPCA3 2 - Sequenciamento usando iniciador H1

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 522 ACGTGAAATGTCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCC 581
          |||
Sbjct 5 ACGTGAAATGTCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCC 64

Query 582 TAGCACACAGCATGATCATTACGGTTCAAGAGACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGTT 641
          |||
Sbjct 65 TAGCACACAGCATGATCATTACGGTTCAAGAGACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGTT 124

Query 642 TTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTA 701
          |||
Sbjct 125 TTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTA 184
```

shPCA3 2 - Sequenciamento usando iniciador SP6

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 550 TTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCCTAGCACACAGCATGATCATTACGGTTCA 609
          |||
Sbjct 354 TTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCCTAGCACACAGCATGATCATTACGGTTCA 295

Query 610 AGAGACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGTTTTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAA 669
          |||
Sbjct 294 AGAGACCGTAATGATCATGCTGTGTGCTAGTTTTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAA 235
```

C

shPCA3 3 - Sequenciamento usando iniciador H1

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 526 GAAATGTCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCCACA 585
          |||
Sbjct 1 GAAATGTCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACGCGTCCCCCACA 60

Query 586 ATATGCATAAAATCTAACTCCTTCAAGAGAGGAGTTAGATTTATGCATATTTGTGGTTTTTTG 645
          |||
Sbjct 61 ATATGCATAAAATCTAACTCCTTCAAGAGAGGAGTTAGATTTATGCATATTTGTGGTTTTTTG 120

Query 646 GAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCT 705
          |||
Sbjct 121 GAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCT 180
```

shPCA3 3 - Sequenciamento usando iniciador SP6

Query: Sequência prevista

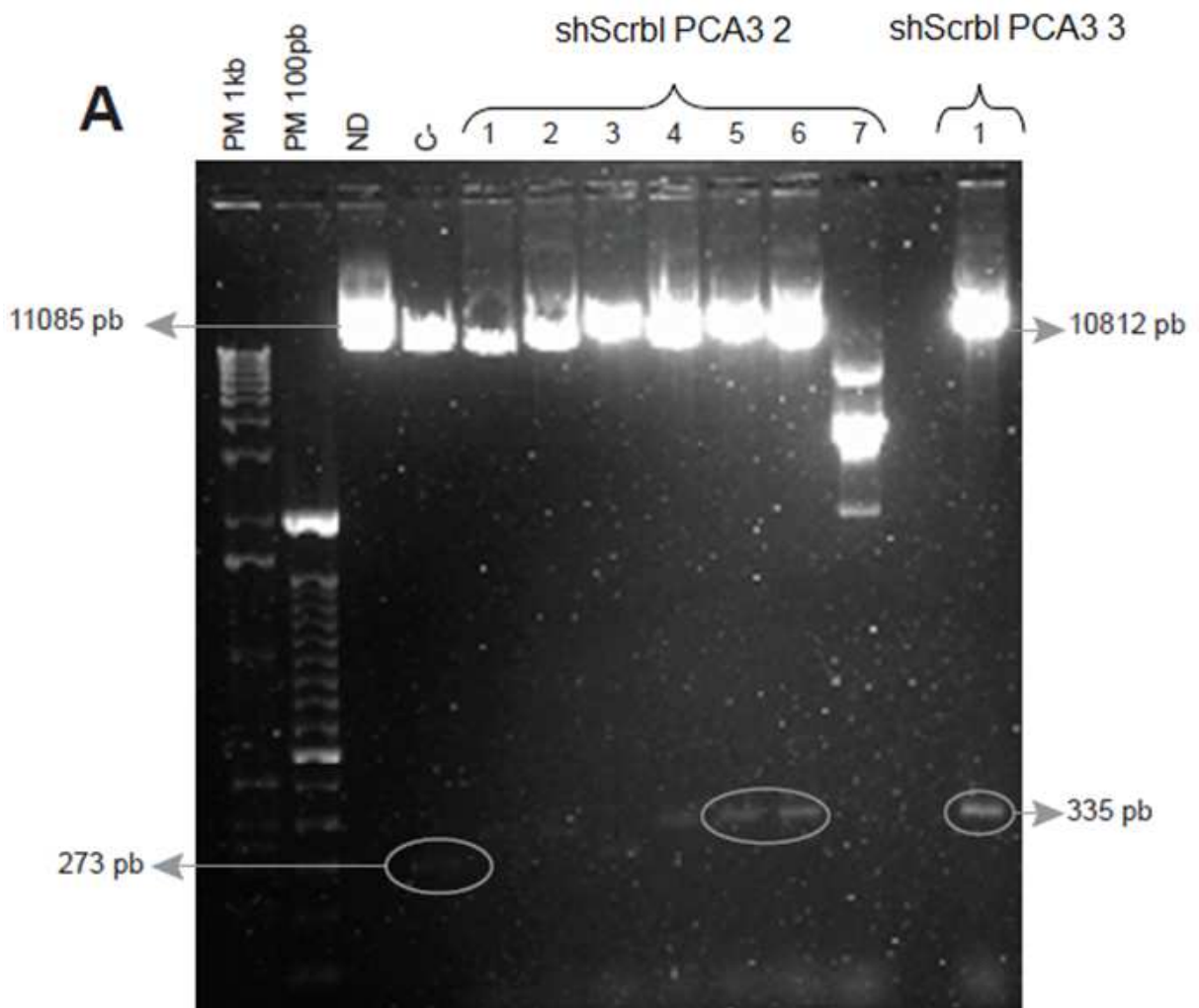
Subject: Sequência analisada

```
Query 560 TGTATGAGACCACGCGTCCCCCACAATATGCATAAAATCTAACTCCTTCAAGAGAGGAGT 619
          |||
Sbjct 360 TGTATGAGACCACGCGTCCCCCACAATATGCATAAAATCTAACTCCTTCAAGAGAGGAGT 301

Query 620 TAGATTTATGCATATTTGTGGTTTTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTA 679
          |||
Sbjct 300 TAGATTTATGCATATTTGTGGTTTTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTA 241
```

Figura 4.7: Clonagem das sequências shPCA3 2 e shPCA3 3 no vetor plasmidial pLVTHM. A) Análise por eletroforese. Gel de agarose mostrando a clonagem das sequências shPCA3 2 e shPCA3 3 no plasmídeo pLVTHM. Linha 1: Marcador de Peso Molecular (PM) de 1kb; linha 2: Marcador de PM de 100pb; linha

3: plasmídeo pLVTHM não digerido (11085 pb); linha 4: controle negativo – plasmídeo pLVTHM sem o inserto desejado digerido com XbaI e MluI (10812pb e 273 pb); linhas 5 a 10: um fragmento referente ao *backbone* do pLVTHM (10812pb) e outro referente ao inserto clonado – shPCA3 2(335 pb); linhas 11 a 16: um fragmento referente ao *backbone* do pLVTHM (10812pb) e outro referente ao inserto clonado – shPCA3 3 (335 pb); B) e C) Análise por sequenciamento do plasmídeo pLVTHM contendo a banda esperada através da ferramenta de alinhamento de seqüências BLAST. *Query* corresponde à seqüência prevista e *Subject* corresponde à seqüência obtida e analisada pelo sequenciamento. As seqüências destacadas em amarelo correspondem às seqüências codificadoras de shRNA específicas para o PCA3 clonadas no vetor pLVTHM.



B

shScrbl PCA3 2 - Sequenciamento usando iniciador H1

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 768 AATGTC TTTGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGCGTCCCCGCACGCT 827
          |||
Sbjct 4 AATGTC TTTGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGCGTCCCCGCACGCT 62

Query 828 CCTACGAATGCTAGTAAATCAAGAGATTACTAGCATTCGTAGGAGCGTGC TTTTGGAA 887
          |||
Sbjct 63 CCTACGAATGCTAGTAAATCAAGAGATTACTAGCATTCGTAGGAGCGTGC TTTTGGAA 122

Query 888 AATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCTGC 947
          |||
Sbjct 123 AATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCTGC 182
```

shScrbl PCA3 2 - Sequenciamento usando iniciador SP6

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 755 ACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGC 814
          |||
Sbjct 403 ACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGC 344

Query 815 GTCCCCGCACGCTCCTACGAATGCTAGTAAATCAAGAGATTTACTAGCATTCGTAGGAG 874
          |||
Sbjct 343 GTCCCCGCACGCTCCTACGAATGCTAGTAAATCAAGAGATTTACTAGCATTCGTAGGAG 284

Query 875 CGTGCTTTTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATAC 934
          |||
Sbjct 283 CGTGCTTTTTGGAAATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATAC 224
```

C

shScrbl PCA3 3 - Sequenciamento usando iniciador H1

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 769 ATGTC TTTGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGCGTCCCCGACCCATA 828
          |||
Sbjct 7 ATGTC TTTGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGCGTCCCCGACCCATA 65

Query 829 CTTACCTAACAACTATTTCAAGAGAATAGTTTGT TAGGTAAGTATGGGTCTTTTGGAA 888
          |||
Sbjct 66 CTTACCTAACAACTATTTCAAGAGAATAGTTTGT TAGGTAAGTATGGGTCTTTTGGAA 125

Query 889 ATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCTGC 948
          |||
Sbjct 126 ATCGATACCGTCGCATGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCTGC 185
```

shScrbl PCA3 3 - Sequenciamento usando iniciador SP6

Query: Sequência prevista

Subject: Sequência analisada

```
Query 776 TGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGCGTCCCCGACCCATACTTACCT 835
          |||
Sbjct 393 TGGATT TGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CGCGTCCCCGACCCATACTTACCT 334

Query 836 AACAACTATTTCAAGAGAATAGTTTGT TAGGTAAGTATGGGTCTTTTGGAAATCGATA 895
          |||
Sbjct 333 AACAACTATTTCAAGAGAATAGTTTGT TAGGTAAGTATGGGTCTTTTGGAAATCGATA 274
```

Figura 4.8: Clonagem das sequências shScrambled PCA3 2 e shScrambled PCA3 3 no vetor plasmidial pLVTHM. A) Análise por eletroforese. Gel de agarose mostrando a clonagem das sequências shScrbl PCA3 2 e shScrbl PCA3 3 no

plasmídeo pLVTHM. Linha 1: Marcador de PM de 1kb; linha 2: Marcador PM de 100pb; linha 3: plasmídeo pLVTHM não digerido (11085 pb); linha 4: controle negativo – plasmídeo pLVTHM sem o inserto desejado digerido com XbaI e MluI (10812pb e 273 pb); linhas 9 e 10: um fragmento referente ao *backbone* do pLVTHM (10812pb) e outro referente ao inserto clonado – shScrbl PCA3 2 (335 pb); linha 13: um fragmento referente ao *backbone* do pLVTHM (10812pb) e outro referente ao inserto clonado – shScrbl PCA3 3 (335 pb); B) Análise por sequenciamento do plasmídeo pLVTHM contendo a banda esperada através da ferramenta de alinhamento de sequências BLAST. *Query* corresponde à sequência prevista e *Subject* corresponde à sequência obtida e analisada pelo sequenciamento. As sequências destacadas em amarelo correspondem às sequências codificadoras de shRNA scramble clonadas no vetor pLVTHM.

4.7) Testagem da linhagem celular a ser utilizada nos experimentos *in vitro* de silenciamento estável do PCA3

Com o objetivo de verificar se a linhagem celular LNCaP poderia ser empregada como modelo celular nos experimentos de silenciamento estável do PCA3, realizou-se um experimento piloto para verificar a eficiência da transdução lentiviral nesta linhagem celular. Para tanto, células LNCaP foram transduzidas com vetores virais contendo o plasmídeo de transferência EF1a-CD20. Este plasmídeo expressa o antígeno e membrana CD20. Como controle negativo do ensaio de transdução foram utilizadas células LNCaP selvagens. As células LNCaP selvagens ou transduzidas com o plasmídeo EF1a-CD20 foram marcadas com anticorpos anti CD20 e fixadas em paraformaldeído. O percentual de células LNCaP CD20+ foi avaliado por citometria de fluxo. Foi observado que 98,83% das células LNCaP transduzidas com o vetor lentiviral contendo a sequência para expressão do CD20 foram marcadas com o anticorpo anti-CD20, enquanto apenas 2,49% das células LNCaP selvagens não transduzidas foram marcadas com este mesmo anticorpo, apresentando marcação inespecífica (Figura 4.9). Estes resultados indicaram que a linhagem celular LNCaP poderia ser utilizada nos experimentos *in vitro* de silenciamento estável do PCA3, por ser de fácil transdução.

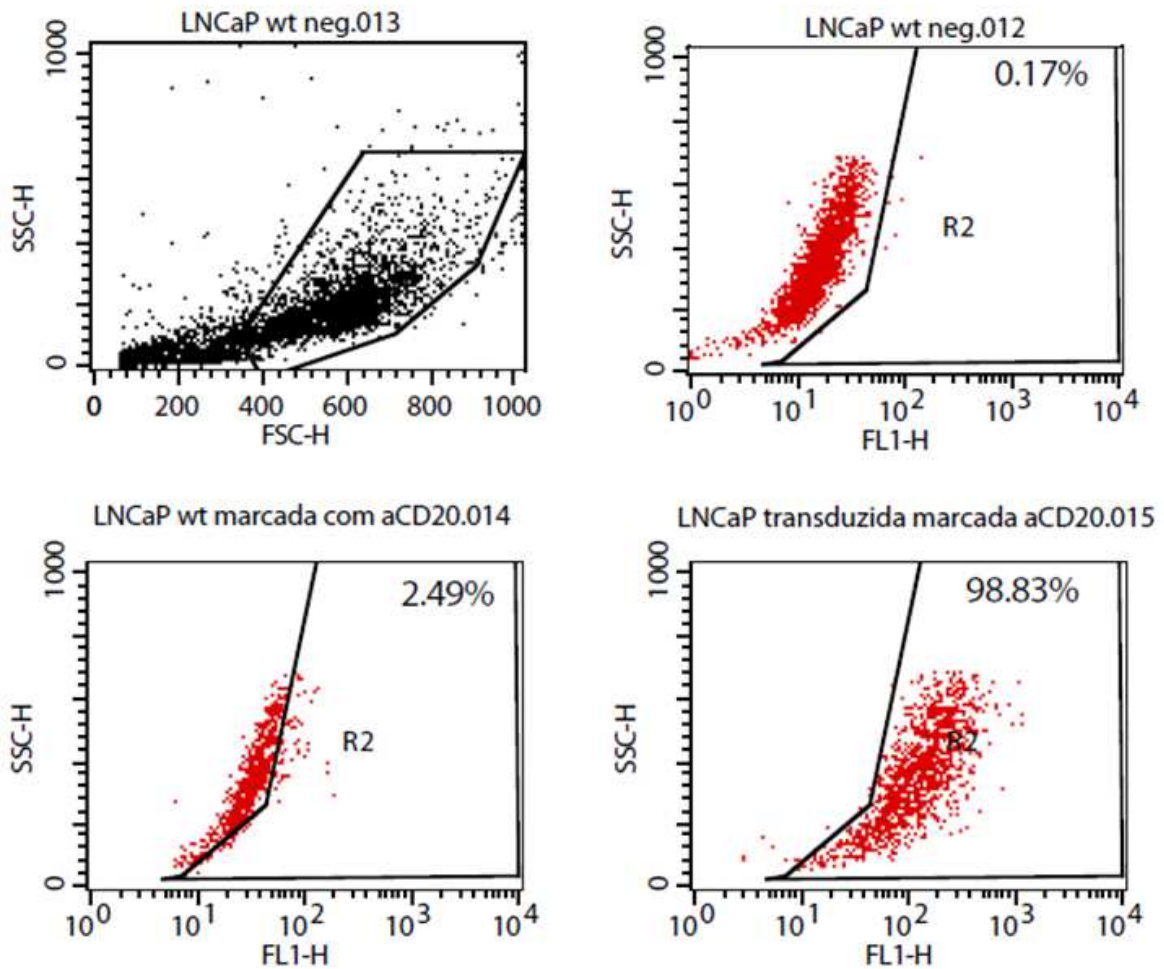


Figura 4.9: Análise da eficiência de transdução de células LNCaP com vetor viral por citometria de fluxo. Células LNCaP foram transduzidas com vetores virais contendo o plasmídeo de transferência EF1a-CD20, foram marcadas com anticorpos anti CD20 e foram analisadas por citometria de fluxo. O percentual de células LNCaP transduzidas com o vetor viral contendo a sequência CD20 foi de 98,83% SSC: Side Scatter (granulosidade e complexidade interna celular); FSC: Forward Scatter (tamanho celular); FL1: fluorescência empregando filtro FL1; LNCaP wt neg.013: células LNCaP selvagens negativas – marcação do campo das células que serão avaliadas (*gate*); LNCaP wt neg.012: células LNCaP selvagens (negativas); LNCaP wt marcada com aCD20.014: células LNCaP selvagens marcadas com anticorpo anti-CD20 (verifica a ligação não específica do anticorpo anti-CD20); LNCaP transduzida marcada aCD20.015: células LNCaP transduzidas com vetores virais carregando sequência para expressão de CD20 foram marcadas com anticorpo anti-CD20.

4.8) Desenvolvimento de uma estratégia de silenciamento estável do ncRNA PCA3

Para promover silenciamento estável do ncRNA PCA3, foram geradas partículas lentivirais carreando sequências shRNA específicas para o PCA3 ou shRNA *scramble* (utilizadas como controle), fusionadas à sequência do gene repórter GFP. Além disso, também foram geradas partículas lentivirais com ausência de sequência alvo clonada no vetor de transferência, a fim de atuarem como controles negativos. Em seguida, células LNCaP foram transduzidas com estas partículas, as quais passaram a expressar o shRNA e a proteína GFP. As células transduzidas com estas construções lentivirais foram monitoradas durante 116 dias por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (Figuras 4.10, 4.11 e 4.12). A Figura 4.10 apresenta imagens das células LNCaP (aumento de 10x) três dias após transdução com vetores virais carreando a sequência shPCA3 3 fusionadas à GFP. A Figura 4.10 apresenta respectivamente imagens geradas após registro com luz visível, com incidência de luz fluorescente (GFP) e após uma sobreposição das imagens geradas com luz visível e luz fluorescente. O percentual de células LNCaP GFP positivas 3 dias após a transdução foi gerado partir da análise das imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Para isto, realizou-se a contagem do número de células totais e do número de células GFP⁺ em cinco campos diferentes, com o auxílio do programa de visualização e edição de imagens Adobe Photoshop, conforme Figura 4.11. Nesta Figura, por exemplo, foram contadas 1310 células totais, sendo que 974 destas eram células GFP⁺ (no total dos cinco campos), como resultado de transdução com partículas virais carreando a sequência shPCA3 3. Isso equivale a 74,4% de células GFP⁺ transduzidas com esta sequência. Nesta análise, obteve-se um percentual de 64,8% células GFP⁺ transduzidas com as partículas virais vazias (controle); 68,9% de células GFP⁺ transduzidas com as partículas virais carreando a sequência shPCA3 2; 82% de células GFP⁺ transduzidas com as partículas virais carreando shScrb1 PCA3 2 e, 80% de células GFP⁺ transduzidas com as partículas virais carreando shScrb1 PCA3 3 (Figura 4.11). Estes dados indicam que as células LNCaP transduzidas com estes distintos vetores apresentaram percentual satisfatório de transdução viral. A Figura 4.12 apresenta gráficos representativos obtidos a partir da leitura dos percentuais da frequência das células LNCaP GFP⁺, 82 dias após a transdução. Observamos um percentual de 0% de células GFP⁺ não transduzidas com vetores virais (LNCaP selvagem);

Observamos 58,6% de células GFP+ transduzidas com as partículas virais carreando o vetor vazio; 58,7% de células GFP+ transduzidas com as partículas virais carreando shScrb1 PCA3 2; 68,6% de células GFP+ transduzidas com as partículas virais carreando shScrb1 PCA3 3; 79,9% de células GFP+ transduzidas com as partículas virais carreando shPCA3 2 e 18,3% de células GFP+ transduzidas com as partículas virais carreando shPCA3 3.

Na Figura 4.13, observamos o monitoramento da frequência de células GFP+ durante 116 dias. Até o terceiro dia após a transdução, a frequência de células GFP+ foi analisada por microscopia de fluorescência e a partir do décimo oitavo dia, a frequência foi analisada por citometria de fluxo. Observamos uma diminuição de 66,4% no percentual de células GFP+ transduzidas com o vetor lentiviral carreando a sequência shPCA3 3. O controle de células transduzidas com o vetor lentiviral carreando a sequência scramble shScrb1 PCA3 3 apresentou redução de 8,6% no percentual de células GFP+, enquanto as células transduzidas com o vetor lentiviral sem inserto clonado apresentou redução de inferior a 1%. Já as células transduzidas com o vetor carreando a sequência shPCA3 2 apresentou diminuição de 6,2% de células GFP+ enquanto a sua sequência *scramble* promoveu diminuição de cerca de 27,8%. Esses resultados sugerem que o silenciamento estável do ncRNA PCA3 foi alcançado através de partículas lentivirais carreando a sequência de shRNA PCA3 3.

Transdução celular com vetor lentiviral

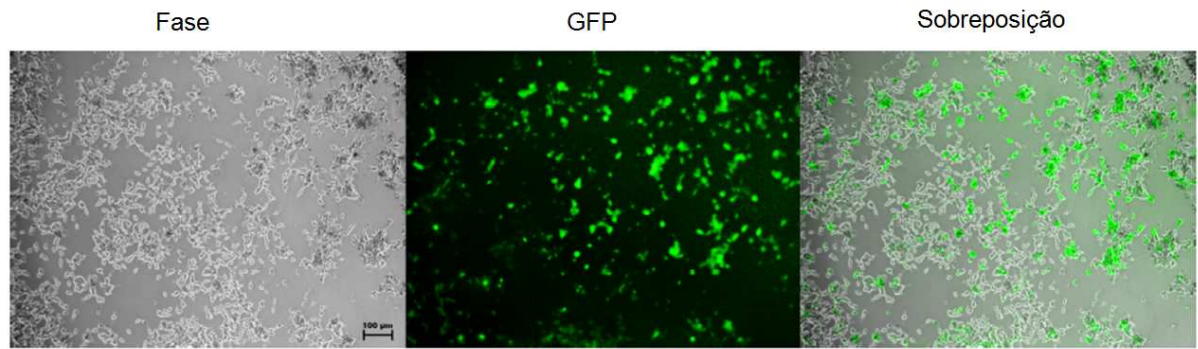


Figura 4.10: Monitoramento por microscopia de fluorescência da transdução de células LNCaP com vetores virais carregando sequências de shRNA específicas para o PCA3. A fotografia foi obtida 72h após a transdução das células LNCaP com vetores virais carregando a sequência shPCA3 3. Células em verde são as células transduzidas com vetores virais carregando a sequência shPCA3 3 e células em cinza são células não transduzidas.

Contagem do número de células LNCaP GFP+

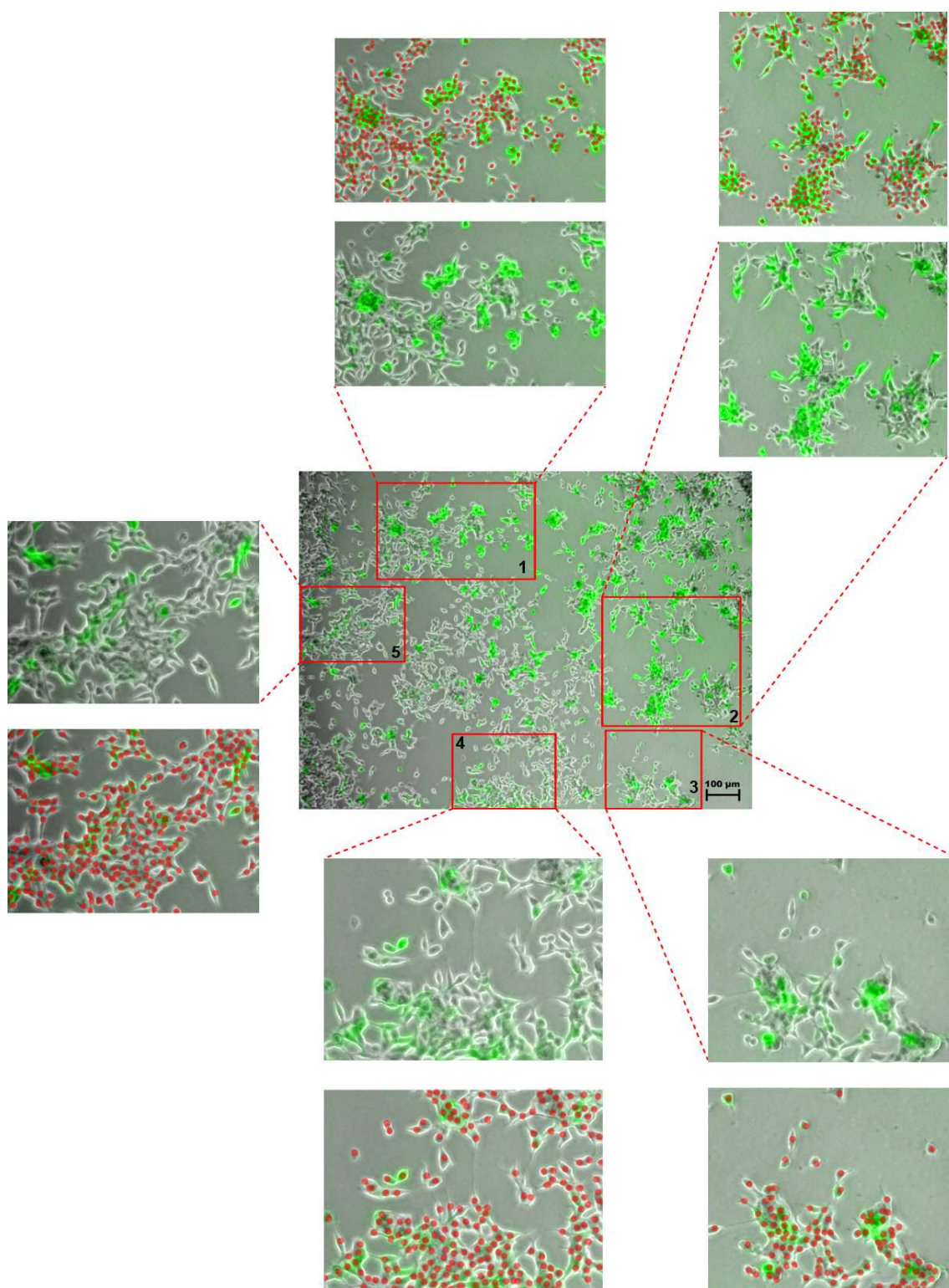
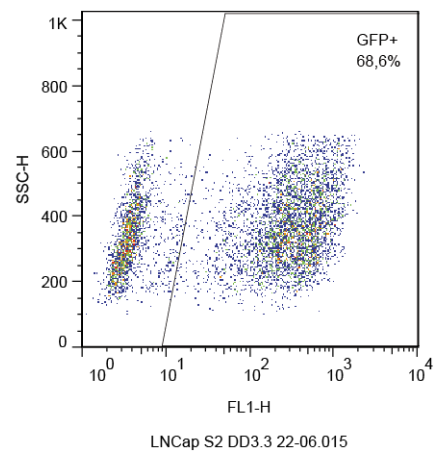
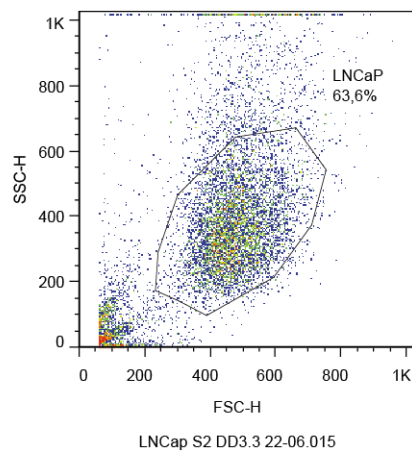
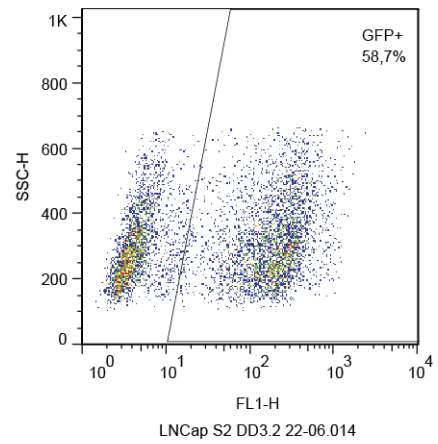
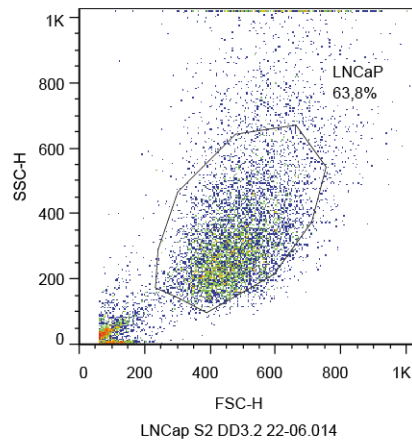
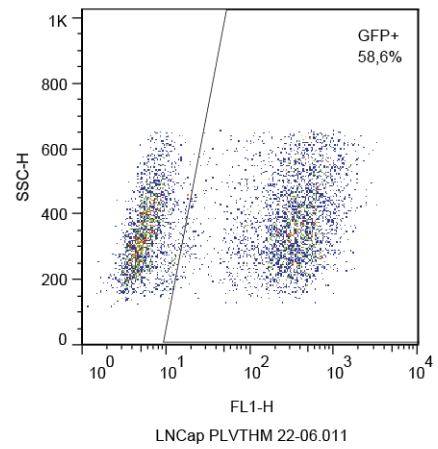
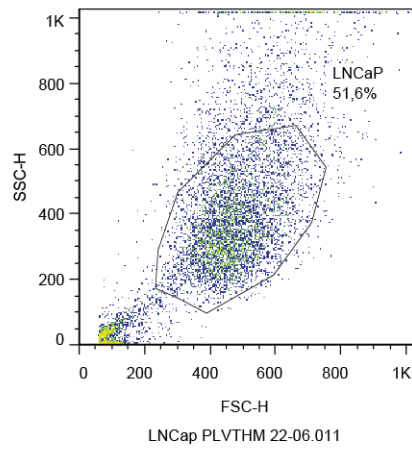
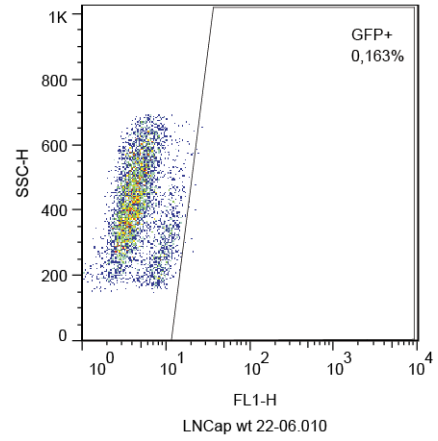
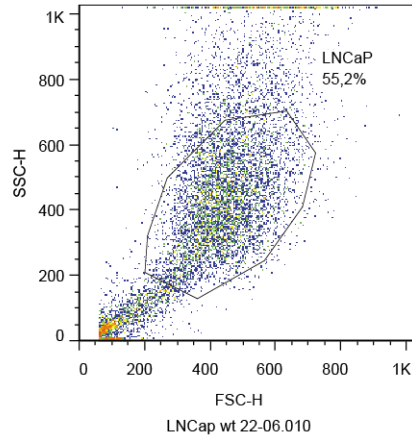


Figura 4.11: Monitoramento por microscopia de fluorescência da transdução de células LNCaP com vetores virais carregando sequências de shRNA específicas para o PCA3. Foi realizada a contagem do número de células LNCaP totais (vermelho) e do número de células transduzidas com vetores virais carregando a sequência shPCA3 3 (verdes) em cinco campos diferentes, com o auxílio do programa Adobe Photoshop.

Percentual de células LNCaP GFP+



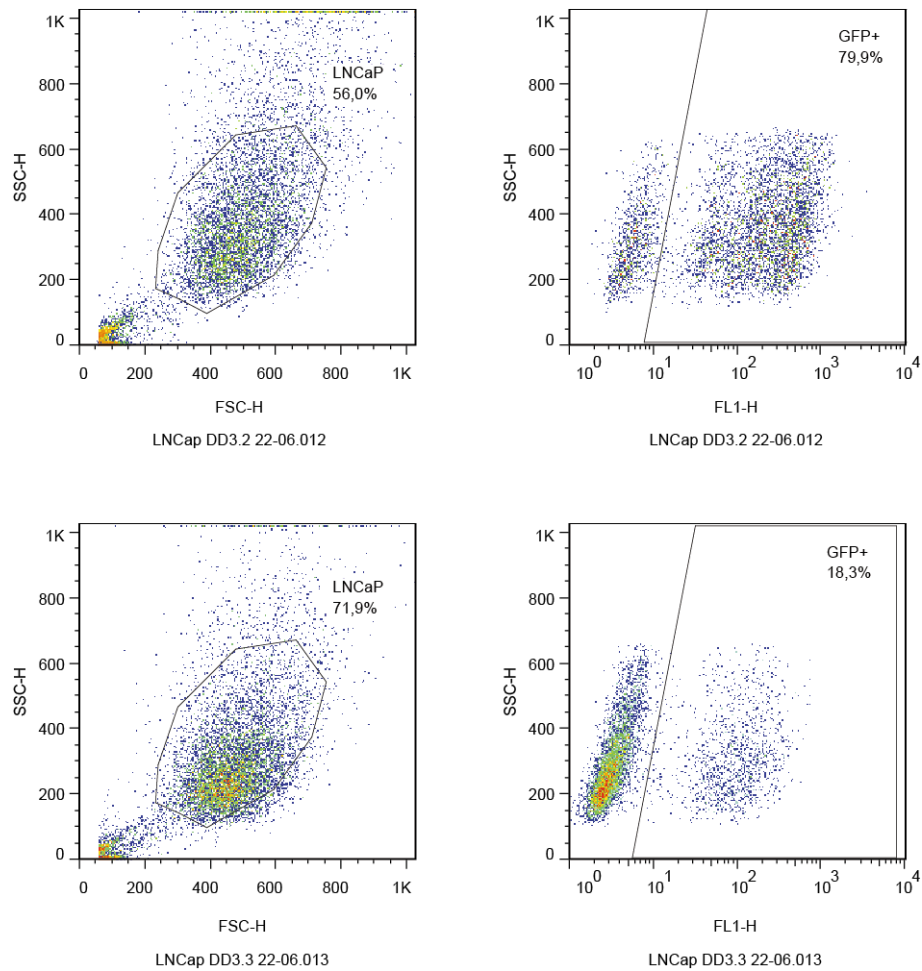


Figura 4.12: Avaliação por citometria de fluxo da transdução de células LNCaP com vetores virais carreando sequências de shRNA específicas para o PCA3 e sequências de shRNA *scramble*. Gráficos *dotplots* obtidos por citometria de fluxo a partir da leitura da frequência das células LNCaP GFP+ 82 dias após a transdução.

Análise do % de células GFP+

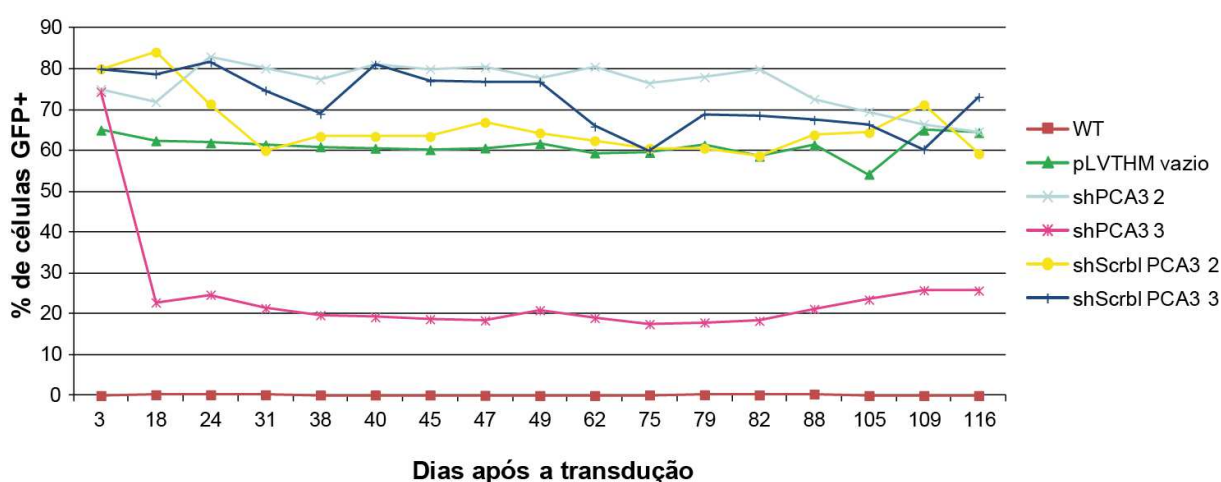


Figura 4.13: Monitoramento das células LNCaP GFP positivas ao longo do tempo por citometria de fluxo após a transdução com vetores virais carreando sequências de shRNA específicas para o PCA3. Como controles, utilizamos células LNCaP não transduzidas (LNCaP wt), células LNCaP transduzidas com vetores virais (pLVTHM) vazios e, células LNCaP transduzidas com vetores virais carreando sequências de shRNA *scramble*.

4.9) Estudos *in vitro* a partir do silenciamento estável do PCA3

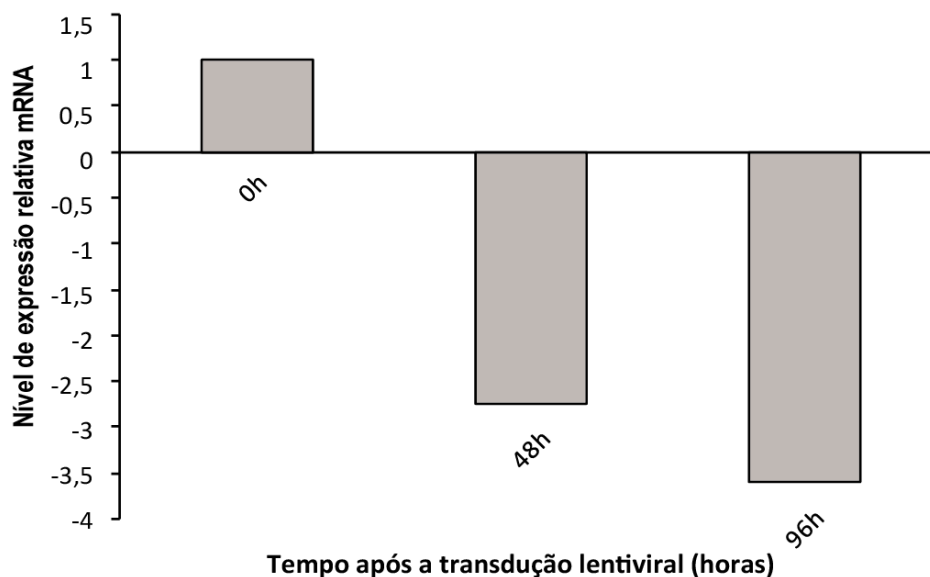
Em seguida, realizamos experimentos apenas com células transduzidas com a sequência shPCA3 3 e as LNCaP selvagens não transduzidas. Foram projetados ensaios com o objetivo de observar: o nível de expressão relativa de RNAm do PCA3 por qRT-PCR (Figura 4.14A) e o número de células viáveis analisadas por Azul de Tripán (Figura 4.14B).

A Figura 4.14A mostra que houve uma diminuição de 2,74 e de 3,61 vezes no nível de expressão relativa do RNAm PCA3 em células LNCaP transduzidas com as partículas virais carreando a sequência shPCA3 em 48h e 96h, respectivamente, após a transdução viral. A Figura 4.14B mostra que, ao longo do tempo, houve uma diminuição de cerca de 90% do número de células viáveis 144h após a transdução com partículas virais contendo a sequência shPCA3 3, quando se compara com o número de células viáveis no controle de células não transduzidas com vetores virais. Esses resultados corroboram os dados do silenciamento transiente com siRNA, evidenciando uma diminuição no número de células viáveis após o

silenciamento estável da expressão do PCA3. Estes resultados reforçam ainda os dados anteriores de que o silenciamento do PCA3 em células LNCaP induz diminuição da sobrevivência destas células.

A

Análise da expressão do PCA3



B

Análise do número de células viáveis

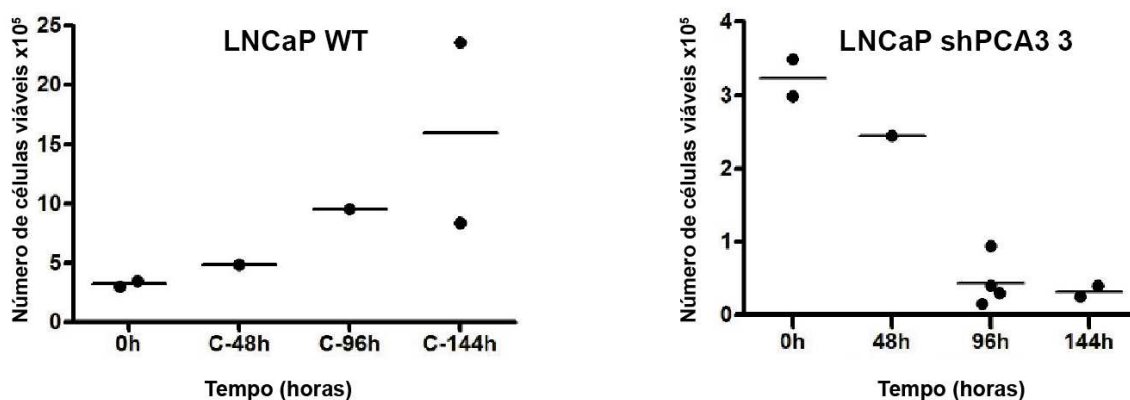


Figura 4.14: Estudos *in vitro* realizados logo após o silenciamento estável do PCA3. A) Análise do nível de expressão relativa de RNAm do PCA3 por qRT-PCR 48h e 96h após a transdução com vetores lentivirais carregando sequências de shPCA3 3 em relação ao controle de células não transduzidas . B) Contagem do número de células viáveis por Azul de tripan 0h 48h 96h e 144h após a transdução com vetores lentivirais carregando sequências de shPCA3 em relação ao controle de células não transduzidas. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

5) DISCUSSÃO

O presente trabalho consiste na primeira identificação dos genes que estão envolvidos na modulação da sobrevivência das células de CaP pelo PCA3. Este estudo demonstrou que a interferência do PCA3 promoveu uma desregulação na expressão de co-reguladores da via do AR, além de impactar na expressão de diversos genes ligados a distintas vias essenciais na progressão tumoral. Outrossim, observamos que a maioria dos genes que apresentou expressão alterada em resposta à interferência do PCA3 corresponde a moléculas de transdução de sinal ou fatores de transcrição, sugerindo ser este ncRNA um importante modulador transcricional. Além disso, após o silenciamento do PCA3, também observamos reversão na expressão de alguns marcadores do programa de EMT, indicando que diante da diminuição da sobrevivência celular induzida por esta estratégia, houve uma reversão parcial deste programa. Até o presente momento, ainda não foram elucidados os mecanismos de ação do PCA3, embora este ncRNA esteja sendo empregado como importante biomarcador em testes diagnósticos para o CaP (PAL e cols, 2013; QIU e cols, 2013), o que aumenta a relevância dos dados aqui descritos. No presente estudo desenvolvemos ainda uma estratégia de silenciamento estável do PCA3, em que houve redução estável de cerca de 60% de células LNCaP GFP⁺ transduzidas com shPCA3, além de importante redução no número de células viáveis, sugerindo que o PCA3 pode ser empregado como um potencial alvo terapêutico para o CaP.

Nosso estudo sugere que este ncRNA pode estar controlando a expressão dos genes alvo do AR através da modulação da expressão de co-reguladores desta via, uma vez que o seu silenciamento leva à uma desregulação da expressão dos co-reguladores investigados e uma diminuição na expressão dos genes alvo do AR, conforme demonstrado por FERREIRA e cols. em 2012. Embora FERREIRA e cols. em 2012 tenham demonstrado diminuição na expressão de genes alvo do AR, o nosso estudo demonstrou aumento na expressão de alguns co-ativadores após o silenciamento do PCA3. Dados similares foram descritos por LASCHAK e cols. em 2011 em que a superexpressão de dois co-repressores, NCoR e SMRT, não reprimiu a expressão gênica dependente do AR em linhagens de células de CaP. Ao invés disto, ativou a expressão de genes alvo do AR. Em nosso estudo, também observamos que o aumento da expressão de co-ativadores do AR, ARA 70 e ARA 54, após o silenciamento do PCA3, não foi capaz de induzir aumento na atividade

transcricional do AR. Ao contrário, está vinculada a uma diminuição na expressão dos genes alvo do AR, tais como o PSA. Estes achados provavelmente se devem a algum comprometimento da interação destes co-ativadores com o AR nas linhagens de CaP, quando o PCA3 se encontra silenciado. Isto sugere que o PCA3 atue modulando a interação entre estes co-ativadores e o AR, de forma a estimular a expressão de genes alvos da via do AR que atuem na sobrevivência das células de CaP. No entanto, o papel da interação AR-ARA70 na progressão do CaP permanece desconhecida (CHMELAR e cols, 2006). Outros relatos de RNAs não codificantes modulando a via de sinalização do AR através de seus co-reguladores já foram descritos na literatura, tal como o miR-125b que quando aumentado na célula de CaP leva a uma diminuição do co-repressor do AR, NCOR2, proporcionando um aumento nos níveis de expressão dos genes alvo desta via (YANG e cols, 2012).

Em nosso modelo experimental não foi possível confirmar se há, de fato, um comprometimento na interação dos co-reguladores com o AR, visto que através do qRT-PCR podemos avaliar apenas a expressão dos transcritos, não sendo possível investigar a expressão proteica, nem tampouco a interação entre proteínas, sendo portanto, uma das limitações deste estudo. Para isto, é necessário realizar ensaios que verifiquem se a interação entre as proteínas co-reguladoras da via do AR e a proteína do receptor de androgênio se encontra alterada quando o PCA3 é silenciado, utilizando, por exemplo, sistemas de duplo híbridos (LASCHAK e cols, 2011). Tal abordagem poderá esclarecer ainda mais os mecanismos moleculares pelos quais o PCA3 controla a sobrevivência das células de CaP, assim como descritos para outros ncRNAs, tais como o miR-31, que regula a sobrevivência e a progressão do CaP (LIN e cols 2012). Na condição de silenciamento do RNanc PCA3, além do aumento na expressão dos co-ativadores supracitados, observamos a diminuição na expressão de dois co-repressores, SMAD4 e ciclina D1. No entanto, nesta mesma condição experimental, nosso grupo demonstrou que há a diminuição da atividade transcricional do AR quando este ncRNA é interferido (FERREIRA e cols, 2012). Com isto, podemos sugerir que apesar de estes co-repressores estarem com sua expressão diminuída quando o PCA3 é silenciado, os co-repressores SMAD3 e EBP1 estão conseguindo interagir com o AR, desencadeando a diminuição da atividade transcricional deste receptor e diminuindo a sobrevivência das células de CaP.

Nossos estudos também sugerem que o ncRNA PCA3 assume um papel regulador na transcrição gênica, sendo capaz de modular a expressão de diversas

vias de sinalização relacionadas ao câncer, de modo especial moléculas de transdução de sinal, fatores de transcrição, co-reguladores do AR e marcadores do programa EMT, conforme observado na Figura 5.1. Estes resultados sugerem uma possível função regulatória para o PCA3, ainda não descrita na literatura para este ncRNA, porém já relatada para outros ncRNAs, tais com o HOTAIR, que é superexpresso em diversos tumores, estando relacionado com a formação de metástases e exercendo função regulatória através de modificações epigenéticas (QIU e cols, 2013). Outros ncRNAs tais como o PRNCR1 e o PCGEM1 também têm sido descritos por atuarem na regulação transcricional de genes alvo do AR e proliferação em células de CaP (YANG e cols, 2013; SCHMITT e CHANG, 2013). Vale ressaltar que este papel regulatório do PCA3 sobre genes de diversas vias do câncer, reforça a complexidade das redes de regulação gênica. Na Figura 5.1 apresentamos um esquema que resume as diferentes interações reportadas para este ncRNA. De forma similar, os ncRNA PlncRNA-1 e PCAT-1 estão envolvidos na sobrevivência das células de CaP (CUI e cols, 2012 ; QIU e cols, 2013).

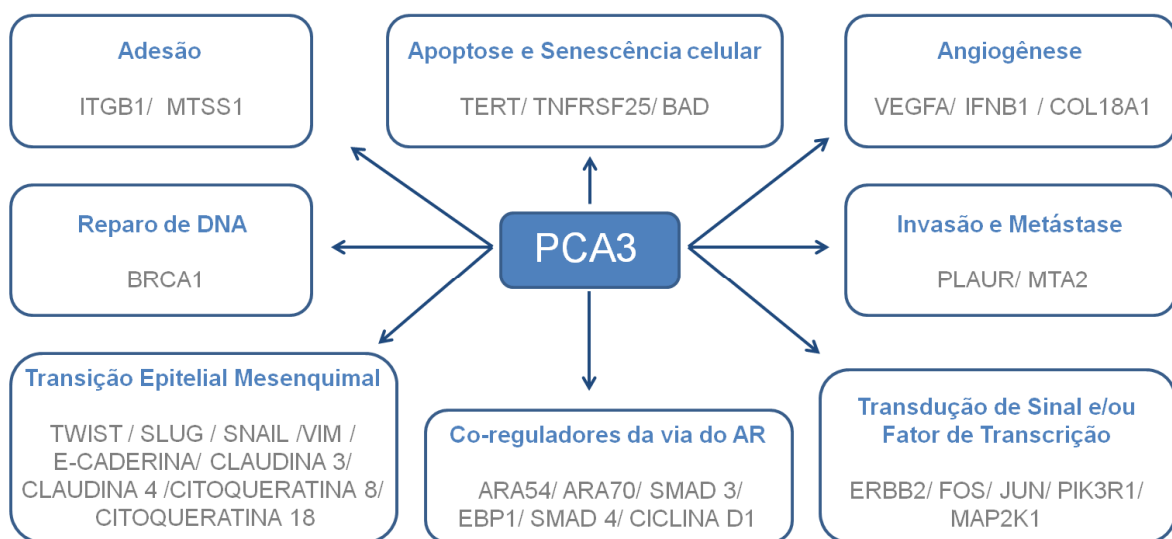


Figura 5.1: Sugestão do papel do PCA3 na modulação da transcrição gênica de diversas vias de sinalização relacionadas ao câncer. O silenciamento deste ncRNA é capaz de alterar a expressão gênica de diversos genes essenciais para a tumorigênese e a progressão do CaP, tais como os co-reguladores da via do AR, moléculas de transdução de sinal, fatores de transcrição e marcadores da EMT.

Também observamos que, após o silenciamento do PCA3, houve um aumento na expressão de alguns marcadores epiteliais e uma diminuição na expressão de alguns marcadores mesenquimais, sugerindo que houve uma reversão no programa de EMT, ainda que reversão parcial. Conforme descrito por ROXANIS em 2013 para células de câncer de mama, é possível observar uma forma parcial de EMT no estabelecimento do fenótipo invasivo, mantendo a diversidade morfológica e fenotípica. Ao contrário do programa de EMT observado durante o desenvolvimento embrionário, onde as características epiteliais sofrem uma transformação para um fenótipo mesenquimal de forma coordenada, o programa de EMT observado durante a tumorigênese ocorre em um contexto de alterações genéticas e influência do microambiente tumoral. Desta forma, nem sempre o perfil de expressão de marcadores EMT segue o padrão clássico. É possível observar metástases de diversos tumores exibindo uma expressão diminuída de vimentina, apesar de este ser um marcador mesenquimal, expresso em metástases (MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Também é possível observar metástases de CaP com expressão aumentada de E-caderina em relação ao tumor primário (CHAO e cols, 2012). Do mesmo modo que já foi descrita a forma parcial do programa de EMT clássico, também já foi descrita a forma parcial da MET, ou seja, uma reversão parcial de EMT (MErT, do inglês *Mesenchymal to Epithelial Reverting Transition*). A MErT é caracterizada pela persistência de alguns marcadores mesenquimais e pela re-repressão apenas de alguns marcadores epiteliais (CHAO e cols, 2012). Esta é uma possível explicação para processo similar à MErT observada em nosso estudo: Snail, Twist e Slug permaneceram com expressão aumentada, apesar do aumento da expressão dos marcadores epiteliais E-caderina, citoqueratina 18 e claudina 3, após o silenciamento do PCA3. Como a diminuição da expressão de E-caderina é um dos principais marcos de EMT (LUO e cols, 2013), podemos considerar que o aumento da expressão deste marcador após o silenciamento do PCA3 apresenta fenótipo semelhante à MET. Com isto, podemos sugerir que a re-expressão de E-caderina após o silenciamento do PCA3 é uma das razões pelas quais observamos diminuição no número de células viáveis e da sobrevivência celular, visto que algumas das características de invasão e metástase foram alteradas, após o silenciamento do PCA3. Em conjunto, estes dados sugerem que o PCA3 é capaz de modular o programa EMT, pelo menos de forma parcial. Outros ncRNAs em células de CaP, tais como os microRNAs da família miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 e miR-429) e miR-205, atuam na ativação do programa EMT

(POLYAK e WEINBERG, 2009). Do mesmo modo, o ncRNA HOTAIR, quando superexpresso, também atua na EMT, aumentando a invasão e a formação de metástases em células de câncer de pulmão. Adicionalmente, o ncRNA MALAT1 está envolvido nos processos de migração e metástase de câncer de pulmão de não pequenas células (QIU e cols, 2013).

Nossos dados sugerem também que pode haver uma atuação indireta do PCA3 na interação entre a via do AR e o programa de EMT, uma vez que o nível de expressão de E-caderina aumentou quando o PCA3 foi silenciado, em paralelo à expressão diminuída do AR, nesta mesma condição experimental (FERREIRA e cols, 2012). Em conjunto, estas observações podem explicar a ocorrência de uma reversão, ainda que parcial, da EMT, visto que outros estudos já demonstraram que a EMT pode estar envolvida em uma troca funcional com componentes do eixo de sinalização androgênico, principalmente o AR (ZHU e KYPRINANOU, 2010; MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Estes resultados são consistentes com dados da literatura que mostram que o AR ativado promove a ativação de EMT através da supressão da expressão de E-caderina em células de câncer de mama (LIU e cols, 2008; MATUSZAK e KYPRIANOU, 2011). Por sua vez, a diminuição da expressão de E-caderina é um dos principais marcos de EMT (LUO e cols, 2013), demonstrando a forte interação entre EMT e a via do AR na progressão do CaP.

Sabe-se que quando o PCA3 é silenciado, ocorre uma diminuição na expressão do AR (FERREIRA e cols 2012) que, por sua vez, promove o desenvolvimento de um fenótipo típico de células tronco em células de CaP (SCHOEDER e cols, 2014). Dessa forma, investigamos também neste estudo a expressão de genes com potencial *stemness*, em células LNCaP interferidas para o PCA3. Embora tenhamos observado uma reverção parcial de EMT, não foi observada a expressão de genes com potencial *stemness* em células LNCaP (tanto as interferidas para o PCA3 quanto as selvagens), apesar de a expressão de Nanog, Oct 4 e Sox 2 ter sido descrita em células LNCaP (AMINI e cols, 2014). Este resultado sugere que este ncRNA não induz a expressão de genes marcadores de células tronco nas condições testadas. Porém é necessário realizar ensaios de formação de colônias e de formação de esferas, após a interferência do PCA3 para confirmar se o PCA3 está ou não envolvido na modulação da expressão dos fatores de transcrição característicos de células tronco.

Em paralelo aos estudos relativos à tentativa de melhor compreensão dos mecanismos de ação do PCA3 na sobrevivência de células de CaP, também

construímos um vetor lentiviral carreando sequência de shRNA específica para o PCA3, com o intuito de silenciar estavelmente este ncRNA. O desenvolvimento desta estratégia de silenciamento do PCA3 proporcionou uma importante redução no número de células viáveis, levando à perda de cerca de 60% de células LNCaP GFP⁺ transduzidas com shPCA3. Estes resultados corroboram os dados anteriores de nosso grupo, em que foi realizado o silenciamento transiente do PCA3 por meio de siRNA, tendo sido observada uma redução da sobrevivência e da viabilidade celular (FERREIRA e cols, 2012). Estes dados sugerem a potencial aplicação do PCA3 como alvo terapêutico para o CaP, de modo especial o CPRC, para o qual existem apenas tratamentos paliativos.. Alguns trabalhos mostram que o silenciamento estável do AR induz a diminuição de PSA sérico para níveis abaixo dos níveis de castração e um significativo retardamento no crescimento do tumor (CHENG e cols 2006; SNOEK e cols, 2009). Além disso, um atraso na progressão do CaP primário para o CPRC também já foi descrito após o silenciamento estável do AR (CHENG e cols 2006), assim como a regressão do tumor (SNOEK e cols, 2009). No entanto, no CPRC, as células de CaP podem ou não continuar dependendo do androgênio e/ou da função do AR para o seu crescimento e sobrevivência, visto que os mecanismos de sinalização desta via se encontram alterados (AHMED e LI, 2013). Conforme descrito por FELDMAN e FELDMAN em 2001, existem vias alternativas desenvolvidas pelas células de CaP para sobreviverem após a castração, tais como: a via da hipersensibilidade; a via promíscua; a via alternativa; a via de escape e a via de células tronco. Além dos mecanismos de resistência ao tratamento hormonal, a síntese *de novo* de androgênio pelas células de CaP desempenha um papel crucial para o fracasso desta estratégia de tratamento. Inclusive sobre estas vias estão sendo atualmente empregadas drogas capazes de inibir a síntese de androgênio, tais como a abiraterona (SADAR, 2012), entretanto, estes tratamentos inevitavelmente também fracassam. Com isto, é necessário investigar outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento do CaP refratário à terapia hormonal para desenvolver e implementar novas terapias alvo específicas. Neste sentido, o silenciamento estável do PCA3 poderia consistir em uma ferramenta adicional para o tratamento de pacientes com CRPC. Esta abordagem resultaria na inibição da expressão dos genes alvo desta via, garantindo uma maior eficiência dos efeitos desta estratégia em diminuir a sobrevivência de células de CaP, evitando os mecanismos alternativos de sobrevivência. Além disso, o PCA3 é especificamente expresso na próstata,

superexpresso em tumores prostáticos (BUSSEMAKERS e cols, 1999), desempenha papel modulador sobre a sobrevivência das células de CaP (FERREIRA e cols, 2012) e, ainda demonstra ter um importante papel na regulação da transcrição de genes relacionados a diversas vias do câncer. O conjunto destes dados indica a potencial aplicação do PCA3 como alvo de estratégias terapêuticas para o CaP.

6) CONCLUSÃO

Concluimos com este trabalho que o PCA3 modula a sobrevivência de células de CaP, através de sua ação regulatória na transcrição gênica, de modo especial, na regulação da expressão de co-reguladores do AR, marcadores EMT e moléculas de transdução de sinal e fatores de transcrição. Assim, o PCA3 é capaz de atuar em diversas vias de sinalização relacionadas ao câncer. Além disso, podemos concluir que o PCA3 pode ser silenciado de forma estável, o que pode se reverter em futuras estratégias terapêuticas para o CaP, especialmente o CPRC, para o qual poucas opções de tratamento eficientes são atualmente disponíveis.

7) PERSPECTIVAS

A continuidade deste projeto inclui a realização de ensaios de sistemas mamíferos duplo híbrido para verificar a interação entre as proteínas co-reguladoras da via do AR e a proteína do receptor de androgênio, quando o PCA3 é silenciado. Além disso, é necessário validar a expressão de todos os marcadores do programa EMT cujos transcritos foram estudados no presente trabalho através da análise da expressão protéica. Outra perspectiva é a realização de experimentos *in vivo* para validação do uso deste ncRNA como potencial alvo terapêutico. Para isto, sugerimos o emprego de sistemas de vetor lentiviral indutíveis por doxiciclina.

8) REFERÊNCIAS

AGOULNIK, Irina U.; WEIGEL, Nancy L. **Coactivator selective regulation of androgen receptor activity.** *Steroids*, Amsterdã, v.74, n.8, p. 669-674, mar. 2009.

AMINI, Sabrieh *e cols.* **The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines.** *Anatomy & Cell Biology*, v. 47, p. 1-11, jan. 2014.

AHMED, Muhammed; LI, Long-Cheng. **Adaptation and clonal selection models of castration-resistant prostate cancer: current perspective.** *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, Carlton South, v.20, n.4, p. 362-371, abr. 2013.

ASAI, Tomohiro; OKU, Naoto. **Nanoparticles for Cancer Therapy Systemic Delivery of Small RNA Using Lipid Nanoparticles.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tóquio, v.37, n.2, p.201-205, fev. 2014.

BARBAROTTO, Elisa; SCHMITTGEN, Thomas D.; CALIN, George. **MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile.** *International journal of cancer*, Nova Iorque, v. 122, n.5, p.969-977, mar. 2008.

BARROS, Scott A.; GOLLOB, Jared A. **Safety profile of RNAi nanomedicines.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdã, v.64, n.15, p.1730-1737, dez. 2012.

BERGLUND, Ryan K. *e cols.* **Radical prostatectomy as primary treatment modality for locally advanced prostate cancer: a prospective analysis.** *Urology*, Nova Iorque, v. 67, n. 6, p. 1253-1256, jun. 2006.

BRENNER, Sebastian; MALECH, Harry L. **Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Nijmegen, v. 1640, n.1, p. 1-24, abr. 2003.

BUDENDORF, L. *e cols.* **Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1.589 patients.** Human Pathology, Filadélfia, v. 31, n. 5, p. 578-583, maio, 2000.

BURD, Craig J.; MOREY, Lisa M.; KNUDSEN, Karen E. **Androgen receptor corepressors and prostate cancer.** Endocrine-Related Cancer, Bristol, v. 13, n. 4, p. 979-994, dez. 2006.

BURNS, J. C. *e cols.* **Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 17, p. 8033-8037, set. 1993.

BUSSEMAKERS, Mario . J. G. *e cols.* **DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer.** Cancer Research, Baltimore, v. 59, n. 23, p. 5975-5979, dez. 1999.

CHAO, Yvonne *e cols.* **Partial mesenchymal to epithelial reverting transition in breast and prostate cancer metastases.** Cancer Microenvironment, v. 5, n. 1, p. 19-28, abr. 2012.

CHENG, Helen *e cols.* **Short hairpin RNA knockdown of the androgen receptor attenuates ligand-independent activation and delays tumor progression.** Cancer Research, Baltimore, v. 66, n. 21, p. 10613-10620, nov. 2006.

CHMELAR, Renée *e cols.* **Androgen receptor co-regulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer.** International Journal of Cancer, Nova Iorque, v.120, n. 4, p. 719-733, fev. 2006.

CHU, P. *e cols.* **Retrovirus-mediated gene transfer into human hematopoietic stem cells.** Journal of Molecular Medicine, Berlin, v. 76, n. 3-4, p. 184-192, mar. 1998.

CLARKE, Raymond A. *e cols.* **New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression.** *PloS one*, v. 2009, n. 3, p. e4995, mar. 2009.

COSTA, Fabrício F. Non-coding RNAs: Meet thy masters. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Nova Jersey, v. 32, n. 7, p. 599-608, jul. 2010.

CRAWFORD, E. David *e cols.* **The utility of prostate-specific antigen in the management of advanced prostate cancer.** *British Journal of Urology International*, Oxford, v. 112, n. 5, p. 548-460, set. 2013.

CUI, Zilian *e cols.* **The prostate cancer-up-regulated long noncoding RNA PlncRNA-1 modulates apoptosis and proliferation through reciprocal regulation of androgen receptor.** *Urologic Oncology*, Filadélfia, v. 31, n. 7, p. 1117-1123, out. 2013.

CULIG, Zoran *e cols.* **Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer.** *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford, v. 92, n. 4, p. 265-271, nov. 2004.

D'AMICO, A.V. *e cols.* **Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer.** *JAMA*, Chicago, v. 280, n. 11, p. 969–974, set. 1998.

FAN, Jun Kai *e cols.* **Targeting Gene-ViroTherapy for prostate cancer by DD3-driven oncolytic virus-harboring interleukin-24 gene.** *International Journal of Cancer*, Nova Iorque, v. 127, n. 3, p. 707-717, ago. 2010.

FELDMAN, Brian J.; FELDMAN, David. **Androgen-independent prostate cancer.** *Nature Reviews – Cancer*, Londres, v. 1, p. 34-45, out. 2001.

FERREIRA, Luciana Bueno. **Estudo Funcional do DD3 no Câncer de Próstata e sua Interação com a Via do Receptor de Androgênio.** 2011. Dissertação

(Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2001.

FERREIRA, Luciana Bueno e cols. **PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling.** BMC Cancer, Londres, v. 12, n. 1, p. 507, nov. 2012.

GALANI, Angeliki e cols. **Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects.** Hormones, Atenas, v. 7, n. 3, p. 217-229, jul-set. 2008.

GLEASON, D.F.; MELLINGER, G.T. **Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging.** Journal of Urology, Baltimore, v. 111, n. 1, p. 58-64, jan.1974.

GOLIAS, C. e cols. **Amplification and co-regulators of androgen receptor gene in prostate cancer.** Experimental Oncology, Kiev, v. 31, n. 1, p. 3-8, mar. 2009.

GRÖNBERG, Henrik. **Prostate cancer epidemiology.**The Lancet, Londres, v. 361, p. 859-864, mar. 2003.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011.

HEEMERS, Hannelore V.; TINDALL, Donald J. **Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex.** Endocrine Reviews, Chevy Chase, v. 28, n. 7, p. 778-808, dez. 2007.

HEIDENREICH, Axel e cols. **EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localized disease.** European Urology, Amsterdã, v. 59, n. 1, p. 61-71, jan. 2011.

HUGHES, C. e cols. **Molecular pathology of prostate cancer.**Journal of Clinical Pathology, Londres, v. 58, n. 7, p. 673-684, jul. 2005.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil.** - INCA, Rio de Janeiro, 2014.

KAWALEC, Paweł *e cols.* **Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. A systematic review and meta-analysis.** Archives of Medical Science : AMS, Polônia, v. 8, n. 5, p. 767-775, nov. 2012.

KLECKA, J. *e cols.* **Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis.** Anticancer Research, Atenas, v. 30, n. 2, p. 665-670, fev. 2010.

KOK, Jacques B. De *e cols.* **DD3 PCA3, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors.** Cancer Research, Baltimore, v. 62, p. 2695-2698, maio, 2002.

KRAL, Milan *e cols.* **Genetic determinants of prostate cancer: a review.** BiomedicalPapers, Olomouc, v. 155, n. 1, p. 3-10, mar. 2011.

KUMAR, Ravi J.; BARQAWI, Al Baha; CRAWFORD, E. David. **Epidemiology of prostate cancer.**US Oncology Review, v. 1, n. 1, p. 1-6, jan. 2004.

KUMAR-SINHA, Chandan; TOMLINS, Scott A.; CHINNAIYAN, Arul M. **Recurrent gene fusions in prostate cancer.** Nature Reviews – Cancer, Londres, v. 8, n. 7, p. 497-511, jul. 2008.

LASCHAK, Martin *e cols.* **Inability of NCoR/SMRT to repress androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cell lines.** International Journal of Molecular Medicine, Atenas, v. 28, n. 4, p. 645-651, out. 2011.

LI, Long-Cheng; CARROLL, Peter R; DAHIYA, Rajvir. **Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment.** Journal of the National Cancer Institute, Cary, v. 97, n. 2, p. 103-115, jan. 2005.

LI, Long-Cheng; OKINO, Steven T; DAHIYA, Rajvir. **DNA methylation in prostate cancer.** Biochimicaet Biophysica Acta, Amsterdã, v. 1704, n. 2, p. 87-102, set. 2004.

LIN, Pei-Chun *e cols.* **Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression.** *Cancer Research*, Baltimore, v. 73, n. 3, p. 1232-1344, fev. 2012.

LIU, Jane Jijun; ZHANG, Jingsong. **Sequencing systemic therapies in metastatic castration-resistant prostate cancer.** *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, Tampa, v. 20, n. 3, p. 181-187, jul. 2013.

LIU, Yan-Nian *e cols.* **Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 28, n. 23, p. 7096-7108, dez. 2008.

LUO, Weiren *e cols.* **Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma.** *PloSone*, v. 8, n. 2, p. e56324, fev. 2013.

MALUF, F. C.; SMALETZ, O.; HERCHENHORN, D. **Castration-resistant prostate cancer: systemic therapy in 2012.** *Clinics*, São Paulo, v. 67, n. 4, p. 389-394, abr. 2012.

MANJUNATH, N. *e cols.* **Lentiviral delivery of short hairpin RNAs.** *Advanced drug delivery reviews*, v. 61, n. 9, p. 732-745, jul. 2009.

MATTICK, J. S. **Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity.** *EMBO reports*, Londres, v. 2, n. 11, p. 986-991, nov. 2001.

MATUSZAK, Emily A.; KYPRIANOU, Natasha. **Androgen regulation of epithelial-mesenchymal transition in prostate tumorigenesis.** *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, Londres, v. 6, n. 3, p. 469-482, maio, 2011.

MICALIZZI, Douglas S.; FARABAUGH, Susan M.; FORD, Heide L. **Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression.** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 15, n. 2, p. 117-134, jun. 2010.

MIYOSHI, Yasuhidee *cols.* **Expression of AR associated protein 55 (ARA55) and androgen receptor in prostate cancer.** The Prostate, Nova Jersey, v. 56, n. 4, p. 280-286, set. 2003.

MORRIS, K. V. **siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code.** Cellular and Molecular Life Sciences, Birkhauser, v. 62, n. 24, p. 3057-3066, dez. 2005.

MOSQUERA, Juan-Miguel *e cols.* **Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States.** Clinical Cancer Research, Nova Jersey, v. 15, n. 14, p. 4706-4711, jul. 2009.

MOTTET, Nicolas *e cols.* **EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer.** European Urology, Amsterdã, v. 59, n. 4, p. 572-583, jan. 2011.

PAL, Raj P. *e cols.* **Defining prostate cancer risk before prostate biopsy.** Urologic Oncology, Filadélfia, v. 31, n. 8, p. 1408-1418, nov. 2013.

POLYAK, Kornelia; WEINBERG, Robert A. **Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits.** Nature Reviews – Cancer, Londres, v. 9, n. 4, p. 265-273, abr. 2009.

POWELL, Isaac J. **Epidemiology and pathophysiology of prostate cancer in African-American men.** The Journal of Urology, Nova Iorque, v. 177, n. 2, p. 444-449, fev. 2007.

QIAN, J. Q.; WOLLAN P.; BOSTWICK D. G. **The extent and multicentricity of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma.** Human Pathology, Filadélfia, v. 28, n. 2, p. 143-148, fev. 1997.

QIU, Man-Tang *e cols.* **Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research.** Tumour biology, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 613-620, abr. 2013.

RAHMAN, Mujib; MIYAMOTO, Hiroshi; CHANG, Chawnshang. **Androgen Receptor Coregulators in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications.** *ClinicalCancerResearch*, Filadélfia, v. 10, n. 7, p. 2208-2219, abr. 2004.

ROXANIS, I. **Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer.** *Journal of Clinical Pathology*, Londres, v. 66, n. 6, p. 517-521, jun. 2013.

SABBAH, Michèle *e cols.* **Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers.** *Drug resistance updates*, Filadélfia, v. 11, n. 4-5, p. 123-151, ago-out. 2008.

SADAR, Marianne D. **Advances in small molecule inhibitors of androgen receptor for the treatment of advanced prostate cancer.** *World Journal of Urology*, Berlim, v. 30, n. 3, p. 311-318, jun. 2012.

SANTER, Frédéric R. *e cols.* **Inhibition of the acetyltransferases p300 and CBP reveals a targetable function for p300 in the survival and invasion pathways of prostate cancer cell lines.** *Molecular Cancer Therapeutics*, Filadélfia, v. 10, n. 9, p. 1644-1655, jun. 2011.

SCHALKEN, Jack A.; HESSELS, Daphne; VERHAEGH, Gerald. **New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3PCA3), a highly prostate cancer-specific gene.** *Urology*, Nova Iorque, v. 62, n. 5, p. 34-43, nov. 2003.

SCHERR, Michaela; EDER, Matthias. **Gene Silencing by Small Regulatory RNAs in Mammalian Cells.** *Cell Cycle*, Georgetown, v. 6, n. 4, p. 444-449, fev. 2007.

SCHMITT, Adam M.; CHANG, Howard Y. **Long RNAs wire up cancer growth.** *Nature*, Londres, v. 500, n. 7464, p. 6-7, ago. 2013.

SCHROEDER, Anne *e cols.* **Loss of androgen receptor expression promotes a stem-like cell phenotype in prostate cancer through STAT3 signaling.** *Cancer Research*, Baltimore, v. 74, n.4, p. 1227-1237, fev. 2013.

SIEGEL, Rebecca *e cols.* **Cancer Statistics, 2014.** *CA Cancer J Clin*, Nova Jérsei, V. 64, n. 1, p.9-29, jan-fev. 2014.

SMITH, Jeffrey R. *e cols.* **Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search.** *Science*, Washington, v. 274, n. 5291, p. 1371-1374, nov. 1996.

SNOEK, Robert *e cols.* **In vivo knockdown of the androgen receptor results in growth inhibition and regression of well-established, castration-resistant prostate tumors.** *Clinical Cancer Research*, Denville, v. 15, n. 1, p. 39-47, jan. 2009.

SUTCLIFFE, Siobhan; COLDITZ, Graham A. **Prostate cancer: is it time to expand the research focus to early-life exposures?** *Nature Reviews - Cancer*, Londres, v. 13, n. 3, p. 208-218, mar. 2013.

TEFEKLI, Ahmet; TUNC, Murat. **Future prospects in the diagnosis and management of localized prostate cancer.** *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1-9, set.2013.

THIERY, Jean Paul *e cols.* **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell*, Cambridge, v. 139, n. 5, p. 871-890, nov. 2009.

THIERY, Jean Paul. **Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, n. 6, p. 740-746, dez. 2003.

UNGEFROREN, Hendrike *cols.* **Interaction of tumor cells with the microenvironment.** *Cell Communication and Signaling*, v.9, n.18, p. 1-8, set. 2011.

VERHAEGH, G. W. *e cols.* **Isolation and characterization of the promoter of the human prostate cancer-specific DD3 gene.** *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 275, n. 48, p. 37496-37503, abr. 2000.

VERNON, Ann E.; LABONNE, Carole. **Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions.** *Current Biology*, Cambridge, v. 14, n. 17, p. R721-R721, set. 2004.

WANG, Siwen; TRAN, Elizabeth J. **Unexpected functions of lncRNAs in gene regulation.** *Communicative & Integrative Biology*, v. 6, n. 6, p. e27610, nov.-dez. 2013.

WEINBERG, Robert A. **A Biologia do Câncer. Capítulo 14 – Expandindo-se: Invasão e Metástase.** 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 864 p.588-619.

WIJNGAART, Dennis J. *e cols.* **Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdã, v. 352, n. 1-2, p. 57-69, abr. 2012.

WIZNEROWICZ, Maciej; TRONO, Didier. **Conditional Suppression of Cellular Genes: Lentivirus Vector-Mediated Drug-Inducible RNA Interference.** *Journal of Virology*, Washington, v. 77, n. 16, p. 8957-8961, ago. 2003.

YANG, Jing *e cols.* **Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis.** *Cell*, Cambridge, v. 117, n. 7, p. 927-939, jun. 2004.

YANG, Liuqing *e cols.* **LncRNA-Dependent Mechanisms of Androgen Receptor-regulated Gene Activation Programs.** *Nature*, Londres, v. 500, n. 7464, p. 598-602, ago. 2013.

YANG, Xiaoping *e cols.* **miR-125b Regulation of Androgen Receptor Signaling Via Modulation of the Receptor Complex Co-Repressor NCOR2.** *BioResearch*, Nova Iorque, v. 1, n. 2, p. 55-62, abr. 2012.

YAZGAN, Oya; KREBS, Jocelyn E. **Noncoding but nonexpendable: transcriptional regulation by large noncoding RNA in eukaryotes.** *Biochemistry and Cell Biology*, Ottawa, v. 85, n. 4, p. 484-496, ago. 2007.

YU, Jenn-Yah; DERUITER, Stacy L.; TURNER, David L. **RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 9, p. 6047-6052, mar. 2002.

ZHANG, Yuexing e cols. **Repression of androgen receptor mediated transcription by the ErbB-3 binding protein, Ebp1.** *Oncogene*, Hampshire, v. 21, n. 36, p. 5609-5618, ago. 2002.

ZHU, Meng-Lei; KYPRIANOU, Natasha. **Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells.** *The FASEB Journal*, v. 24, n. 3, p. 769-777, mar. 2010.

Instituto Nacional de Câncer José Alencas Gomes da Silva. Sintomas do Câncer de Próstata. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/sintomas> Acessado em 21 fev 2014.

Estratégias de Clonagem no vetor pLVTHM. Disponível em http://lentiweb.com/cloning_strategies.php Acessado em fev 2011.

Análise por sequenciamento do plasmídeo pLVTHM contendo o fragmento clonado, empregando a ferramenta de alinhamento de sequências BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Acessado em ago 2012.

Mapa do plasmídeo pLVTHM, 18 ago 2004. Disponível em: <http://www.addgene.org/static/data/56/59/70b3ca28-af61-11e0-90fe-003048dd6500.jpeg> Acessado em fev 2011.

Análise dos resultados do PCR ARRAY empregando a planilha de cálculo da Qiagen. Disponível em: <http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>
Acessado em jun 2013.

International agency for Research on Cancer (IARC). Estimativa de Incidência e Mortalidade para homens com Câncer de Próstata no Brasil em 2012. Disponível em:
http://globocan.iarc.fr/old/bar_pop.asp?selection=24076&title=Brazil&sex=1&statistic=0&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&orientation=1&submit=%C2%A0Execute Acesso em 21 fev. 2014.

International agency for Research on Cancer (IARC). Estimativa de Incidência e Mortalidade para homens com Câncer de Próstata no Mundo em 2012. Disponível em:
http://globocan.iarc.fr/old/bar_pop.asp?selection=224900&title=World&sex=1&statistic=0&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&orientation=1&submit=%C2%A0Execute Acesso em 21 fev. 2014.