



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS AO
GENE *PCA3* E NOVAS PERSPECTIVAS NO CÂNCER DE PRÓSTATA E NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Aluno: Douglas Alexsander Alves

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo / IBTEC-UFU

UBERLÂNDIA – MG

2023



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**



**CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS AO
GENE *PCA3* E NOVAS PERSPECTIVAS NO CÂNCER DE PRÓSTATA E NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Aluno: Douglas Alexsander Alves

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A474
2022 Alves, Douglas Alexsander, 1994-
 Caracterização de mecanismos moleculares associados ao
 gene PCA3 e novas perspectivas no Câncer de Próstata e
 na Doença de Alzheimer [recurso eletrônico] / Douglas
 Alexsander Alves. - 2022.

 Orientador: Thaise Gonçalves de Araújo.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.668>
 Inclui bibliografia.

 1. Genética. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-,
 (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
 graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Nove de janeiro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	08:35h	Hora de encerramento:	13:50
Matrícula do Discente:	11823GBI005				
Nome do Discente:	Douglas Alexsander Alves				
Título do Trabalho:	Caracterização de mecanismos moleculares associados ao gene PCA3 e novas perspectivas no Câncer de Próstata e na Doença de Alzheimer				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Comportamento e controle molecular do lncRNA PCA3 no Câncer de Próstata.				

Aos nove dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e três, às 08:35 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº 06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr^a. Tatiana Martins Tilli, Dr^a. Adriana Freitas Neves, Dr^a. Vivian Alonso Goulart, Dr. Carlos Ueira-Vieira e Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo, orientadora do candidato e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/01/2023, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/01/2023, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/01/2023, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana Martins Tilli, Usuário Externo**, em 09/01/2023, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FREITAS NEVES, Usuário Externo**, em 09/01/2023, às 13:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4111419** e o código CRC **6C96734E**.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**



**CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS AO
GENE *PCA3* E NOVAS PERSPECTIVAS NO CÂNCER DE PRÓSTATA E NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Aluna: Douglas Alexsander Alves

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente/Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thaise Gonçalves de Araújo

Examinadores: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Martins Tilli - Fiocruz

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Freitas Neves - UFCAT

Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart - UFU

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira - UFU

Data da defesa: 09/01/2023

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PPGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Prof^ª. Dr^ª. Thaise Gonçalves de Araújo

“A vida é desprovida de sentido. Você dá sentido a ela. O sentido da vida é aquilo que você atribui a ela. Estar vivo é o sentido.”

- Joseph Campbell

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô José Rosa Alves que infelizmente nos deixou em decorrência do câncer de próstata. E a todas as pessoas que um dia possam se beneficiar de meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à **Universidade Federal de Uberlândia**, por oferecer infraestrutura para a realização desse trabalho.

Meus profundos agradecimentos à minha **orientadora Profª Drª Thaise Gonçalves de Araújo**, que ao longo de mais de uma década vem me orientando, e é diretamente responsável pelo meu desenvolvimento profissional, autonomia científica e pensamento crítico, este último que inclusive sempre rendeu inúmeros debates. Foi uma honra ser seu aluno.

Agradeço ao **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart**, que infelizmente nos deixou como vítima da covid-19, pelo incentivo e confiança depositados e por acreditar sempre na minha competência. Pelos seus serviços enquanto coordenador e por me inspirar a acreditar na importância que qualquer pequeno avanço na ciência tem na vida das pessoas.

Aos Profs. Drs. **Carlos Ueira-Vieira, Matheus de Souza Gomes e Tatiana Tilli** pela colaboração com expertises nas suas respectivas áreas de atuação profissional.

A todos os **colegas e funcionários do Instituto de Biotecnologia** da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC/UFU) pelos serviços prestados e apoio.

Aos meus amigos do programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB) e do Laboratório de Nanobiotecnologia.

Aos meus amigos, **Jéssica Brito, Isabella Castro, Sara Teixeira e Lara Vecchi**. Obrigada pela convivência, pelas risadas, pelo aprendizado e por tornarem o ambiente laboratorial enriquecedor e agradável! Em especial à **Natássia Caroline e Tamiris Sabrina** pelos grandes ensinamentos profissionais e pessoais, pelas conversas e apoio científico e emocional.

À **Letícia Godinho**, pelo companheirismo, carinho, incentivo e ajuda nos momentos de dificuldade. Pela capacidade de me fazer lembrar das coisas que realmente importam e não me deixar ficar “doido” nesta reta final.

A **todos** que colaboraram conosco e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Nanobiotecnologia e Laboratório de Genética e Biotecnologia do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia - Minas Gerais, Brasil), com o apoio das seguintes Agências de Fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	01
CAPÍTULO I. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
1.1 CANCER DE PROSTATA.....	04
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	18
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> COMO ORGANISMO MODELO.....	24
Referências.....	27
CAPÍTULO II. Artigo Científico 1- ARHGAP21-mediated regulation of PCA3 in prostate cancer cells.....	42
Abstract.....	47
Introduction.....	48
Materials and Methods.....	49
<i>Patient samples and nucleic acids extraction.....</i>	49
<i>PCA3 detection and promoter region amplification.....</i>	49
<i>Phage Display.....</i>	50
<i>Viral DNA extraction and sequencing.....</i>	50
<i>Identification of selected peptides.....</i>	51
<i>Cell culture.....</i>	51
<i>RNA extraction and qPCR assays.....</i>	51
<i>Chromatin Immunoprecipitation (Chip).....</i>	52
<i>Gene silencing.....</i>	53
<i>Western blot analysis.....</i>	54
<i>Phage PCA3p1 purification and Bead ELISA.....</i>	54
<i>Phage-MTT.....</i>	55
<i>Modulatory effects of PCA3p1 phage in LNCaP cells.....</i>	55
<i>In silico predictions.....</i>	55
<i>Statistical analysis.....</i>	56
Results.....	56
<i>PCA3 screening for promoter amplification.....</i>	56
<i>Selection of the PCA3 promoter binding peptides by Phage Display technology.....</i>	57
<i>ARHGAP21 regulates PCA3 transcripts.....</i>	58

<i>Effects of PCA3p1 on PCa cells.....</i>	61
<i>Molecular Docking and structural alignment simulations</i>	64
Discussion.....	66
References.....	68
CAPÍTULO III. Artigo Científico 2- Programmed cell death 7 (PDCD7) e suas implicações no câncer de próstata.....	73
Resumo.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1. TCGA e GEO.....	76
2.2. Análises de miRNA	77
2.3 Cultivo celular.....	78
2.4 Silenciamento gênico, extração de RNA total e transcrição reversa.....	78
2.5 qPCR e qPCR array.....	79
2.6 Síntese de peptídeo mimético e imunoenensaio.....	80
2.7 Ensaio de citotoxicidade.....	80
2.8 Análises estatísticas.....	81
3. RESULTADOS.....	81
4. DISCUSSÃO.....	91
CONCLUSÃO.....	94
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	95
REFERENCIAS.....	96
CAPÍTULO IV. Artigo Científico 3- Câncer de Próstata e Alzheimer: uma ponte molecular entre as duas doenças.....	102
Resumo.....	103
1. INTRODUÇÃO.....	104
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1 Ensaio em linhagens celulares prostáticas.....	106
2.1.1 Cultivo Celular.....	106
2.1.2 Citotoxicidade.....	107

2.1.3 Quantificação de transcritos.....	107
2.2 Ensaios em <i>Drosophila melanogaster</i>.....	108
2.2.1 Moscas AD-Like.....	108
2.2.2 Tratamentos.....	108
2.2.3 Ensaio de sobrevivência.....	109
2.2.4 Ensaio de geotaxia negativa iterativa rápida	109
(RING).....	
2.2.5 Análises histopatológicas.....	110
2.2.6 Ortólogos e ensaios de qPCR.....	110
2.3 Análises estatísticas	111
3. RESULTADOS.....	111
4. DISCUSSÃO.....	121
CONCLUSÃO.....	124
REFERENCIAS.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS

A β	Beta-amiloide
ADAR	Adenosina Deaminase Dependente de RNA1
AD-Like	<i>D. melanogaster</i> com fenótipo de Alzheimer
AICD	Domínio intracelular de APP
ApoE4	Apolipoprotein E4
APP	Proteína precursora de amiloide
AR	Androgen Receptor
ARHGAP21	Proteína ativadora de Rho GTPase 21
BACE1	β -secretase
BMCC1	BCH motif-containing molecule at the carboxyl terminal region 1)/PRUNE2
C83	Fragmento C-terminal de 83 aminoácidos associado à membrana
C99	Fragmento C-terminal de 99 aminoácidos associado à membrana
CaP	Câncer de Próstata
CCL11	C-C Motif Chemokine Ligand 11
cDNA	DNA complementar
CPZ	Clorpromazina
CRPC	Câncer de próstata resistente a castração
DA	Doença de Alzheimer
DD3	<i>Differential Display 3</i>
dsRNA	RNA fita dupla
GAL	Galantamina
GAL4/UAS	Sistema de expressão galantamina4/ upstream activating sequence
GEO	Gene Expression Omnibus
GFP	Green fluorescent protein
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
ISUP	Sociedade Internacional de Patologia Urológica
LAP2 α	Lamin-associated polypeptide 2 alpha
LHRH	hormônio liberador do hormônio luteinizante

LncRNA	Long non-coding RNA
UTR	Ultrassonografia Transretal
mCRPC	CRPC metastático
MRI	Ressonância magnética multiparamétrica
NMDA	N-methyl d-aspartate
<i>PCA3</i>	Prostate câncer associated 3
<i>PDCD7</i>	Programmed Cell Death 7
PET	Tomografia de emissão de pósitrons
<i>PRKD3</i>	<i>Protein kinase D3</i>
<i>PRUNE2</i>	<i>Prune homolog 2</i>
PSA	Antígeno Prostático Específico
<i>PSEN1</i>	<i>Presenilin 1</i>
<i>PSEN2</i>	<i>Presenilin 2</i>
RNA	Ácido ribonucleico
sAPP α	Proteína solúvel precursora de amiloide alfa
SNC	Sistema nervoso central
SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein 1
Tau	Proteína associada a microtúbulos
TCGA	The Cancer Genome Atlas
t-CRPC	Câncer de prostata resistente à terapia e à castração
TMPRSS2- ERG	Fusão gênica de protease serina transmembranar 2- ETS transcription factor ERG
TPA	Terapia de privação androgênica
UAS	Upstream Activating Sequence

APRESENTAÇÃO

Com o aumento da longevidade da população como um todo, doenças associadas a idade tem se tornado cada vez mais incidentes, levando a grandes prejuízos na qualidade de vida dos pacientes, dentre essas doenças damos enfoque nesta tese ao câncer de próstata (CaP) e à Doença de Alzheimer (DA), pela possibilidade de compartilhamento de vias moleculares associadas a etiologia dessas doenças.

O CaP é uma doença de grande prevalência mundial, com altos índices de mortalidade, falta de terapia e marcadores específicos para cada estágio tumoral, o que representa uma dificuldade de tratamentos assertivos para cada prognóstico e estadiamento. Além disso, apesar dos grandes avanços no entendimento desta neoplasia, muitas lacunas de conhecimento ainda precisam ser preenchidas.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela presença de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares, inflamação, dano oxidativo, perda de sinapses e morte seletiva de neurônios. Apesar de que a inibição da expressão de BACE1 (beta-secretase) tem sido considerada um alvo terapêutico para sua prevenção e tratamento, a etiologia do desenvolvimento da DA ainda permanece um mistério.

Nesse contexto o gene biomarcador *PCA3* amplamente estudado e utilizado como diagnóstico em CaP, é o ponto inicial de todas as hipóteses desenvolvidas nesta tese, e se mostra regulado por um possível fator de transcrição chamado ARHGAP21, onde avaliamos as implicações desse gene na via androgênica e na modulação de *PCA3*. Além disso, os genes correlatos ao *PCA3*, *PRUNE2* e *ARHGAP21* se mostram como um fator importante na etiologia da DA.

Outro gene associado ao *PCA3* é o *PDCD7* (*Programmed cell death 7*), com prováveis implicações no câncer de próstata, é pela primeira vez descrita nesta tese, como marcador prognóstico e possível alvo terapêutico para o CaP.

Portanto, esta tese é voltada para a descrição de mecanismos moleculares até então não explorados, associados ao *PCA3*, tanto em CaP quanto em DA.

No Capítulo I dessa pesquisa, elaboramos uma fundamentação teórica em que descrevemos o CaP e a DA, suas fisiopatologias, os tratamentos

medicamentosos existentes e os principais alvos terapêuticos. Ressaltamos a complexidade e abrangência das funções do *PCA3*, o uso da *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudo de doenças neurodegenerativas, além de conhecimentos prévios para melhor entendimento do trabalho realizado nesta tese.

No Capítulo II, apresentamos o primeiro artigo científico, já no formato de envio a publicação, submetido à revista *Molecular and Cellular Biochemistry*, em que avaliamos os efeitos de *ARHGAP21* como um fator de transcrição na regulação de *PCA3*, seus efeitos na proliferação e progressão do CaP, bem como o mapeamento dos epítomos associados a interação com *PCA3* por meio de modelagem molecular. De modo que tais conhecimentos oferecem um novo alvo molecular para intervenção terapêutica e ferramenta de estudo para compreender mais os mecanismos intrínsecos da expressão e controle de *PCA3*.

No Capítulo III, apresentamos o segundo artigo científico que caracteriza e descreve pela primeira vez os efeitos de *PDCD7* no CaP e sua possível utilização como biomarcador tumoral, marcador prognóstico, juntamente com a descrição de vias tumorais afetadas pelo silenciamento desse gene e o seu papel na comunicação e função via miRNAs, bem como o potencial uso de microRNAs no diagnóstico e terapêutica do CaP. Além dos efeitos na via androgênica associada ao *PCA3*. Levantando os olhares para um entendimento cada vez mais elaborado da complexa gênese e progressão tumoral.

No Capítulo IV, apresentamos o terceiro e o último artigo que extrapola a influência de componentes da via de *PCA3*, como *ARHGAP21* e *PRUNE2* em doenças neurodegenerativas como a DA, além do poder modulatório da Clorpromazina (CPZ) sobre os mesmos, deste modo, traçando um paralelo entre as etiologias do CaP e DA, e abrindo espaço para grandes avanços em ambas as doenças. Além de sugerir o reposicionamento de CPZ e novos estudos como droga antitumoral e na terapêutica da DA.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CANCER DE PROSTATA

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que tendem a se dividir rapidamente e invadir tecidos adjacentes, ou mesmo órgãos distantes, por meio de um processo chamado metástase. Em geral, são classificados conforme seu tecido de origem sendo denominados carcinomas quando originados a partir de células epiteliais, ou sarcomas, quando acometem tecidos conjuntivos (INCA, 2022b).

Molecularmente, o câncer é uma doença de natureza genética, em que mutações, herdadas ou adquiridas, são responsáveis por seu surgimento e progressão. Destacam-se, recombinações, inserções e/ou deleções de nucleotídeos. Além disso, mudanças no padrão transcricional como amplificação de oncogenes e supressão de supressores de tumores estão diretamente ligadas à tumorigênese (Mendiratta et al., 2021; Rodriguez-Calero et al., 2022; Smid et al., 2022; Sugimura & Ushijima, 2000). Por conseguinte, as células são capazes de se replicar ilimitadamente, evadir à apoptose, invadir tecidos, metastatizar, sustentar a angiogênese e se tornarem autossuficiente em fatores de crescimento (Das et al., 2020; Oliveira et al., 2021).

O Adenocarcinoma prostático é o tumor da próstata mais frequentemente diagnosticado em homens, representando 95% dos casos de Câncer de Próstata (CaP) (Netto et al., 2022; Oncocenter, 2022). Possui origem epitelial e acomete a glândula prostática. Esta é um órgão acessório localizado abaixo da bexiga e no entorno da uretra, cuja principal função é secretar o fluido prostático, o qual auxilia na composição do sêmen, mantendo a viabilidade do espermatozoide (Verze et al., 2016).

A próstata pode ser dividida em cinco regiões anatômicas: a zona central, de transição, periférica, periuretral e fibromuscular (**Figura 1a**). A zona central circunda os ductos ejaculatórios e localiza-se abaixo da bexiga. A zona de transição circunda a uretra proximal aos ductos ejaculatórios. A zona periférica, constituinte da maior fração prostática e onde se origina a maioria dos tumores prostáticos, localiza-se nas porções apical, posterior e lateral (Rebello et al., 2021; Verze et al., 2016). Internamente, cercando a uretra e entre as zonas centrais e periféricas, se encontra a zona periuretral (Amin et al., 2010). A zona fibromuscular cobre a zona de

transição e distalmente a uretra sendo descrita como uma “bainha” muscular não-glandular que recobre a zona anterior, formando a borda anterolateral da próstata (Selman, 2011).

Histologicamente, a glândula prostática é composta por dois compartimentos principais, o epitélio e o estroma (**Figura 1b**). O epitélio é formado por duas camadas histologicamente distintas. A primeira, luminal secretora, contém células responsáveis pela produção do antígeno prostático específico (PSA), fosfatase ácida prostática e calicreína-2 humana, que são secretadas como parte do fluido seminal. Essa camada de células é sustentada por uma segunda camada basal de células epiteliais cúbicas e por células neuroendócrinas (Thorek et al., 2013).

A lâmina basal divide o epitélio do estroma, sendo composta por células endoteliais e músculo liso (**Figura1b**). Já no estroma são encontrados fibroblastos, células nervosas e endoteliais, cuja principal função é garantir o microambiente adequado para o compartimento epitelial. O estroma desempenha um papel importante na sinalização homeostática e durante processos de regeneração (Nieto et al., 2014; Verze et al., 2016).

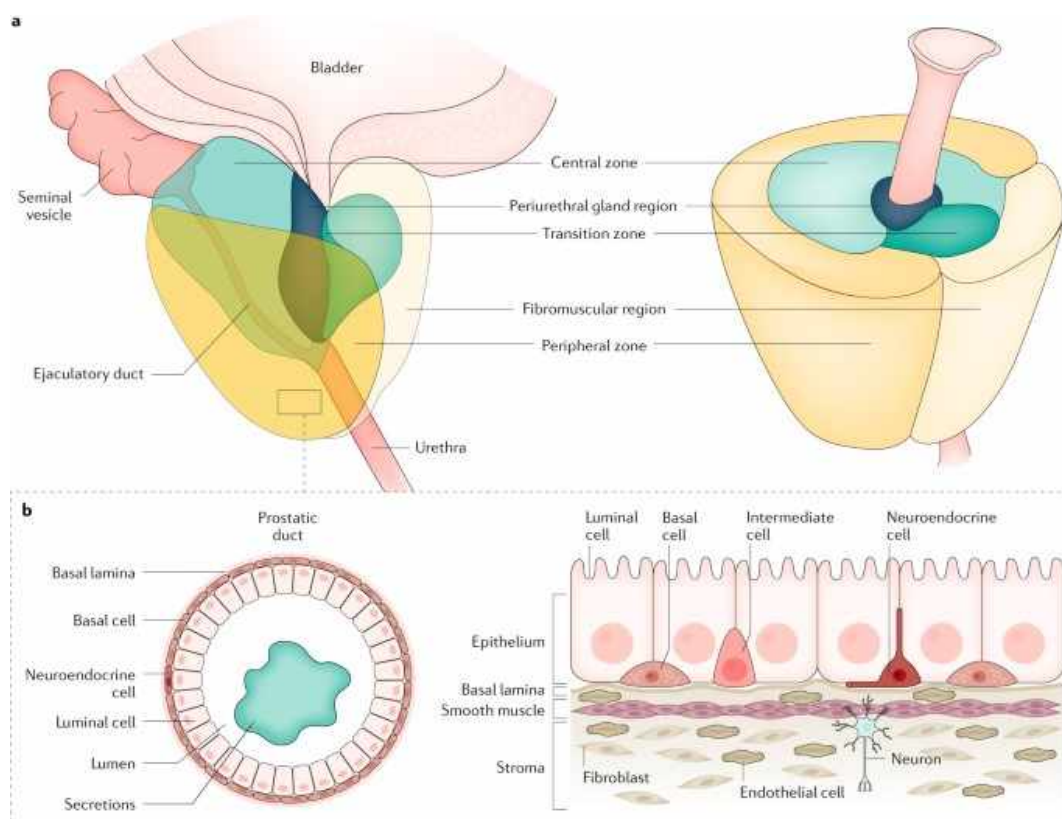


Figura 1: Anatomia e estrutura histológica da próstata humana. **(a)** Próstata humana dividida em cinco regiões anatômicas: zona central, região periuretral, zona de transição, zona periférica e fibromuscular. **(b)** Ductos e ácinos prostáticos contendo, principalmente células musculares lisas, fibroblastos, células endoteliais e neuroendócrinas separados em epitélio e estroma pela lâmina basal. Fonte: (Verze et al., 2016).

O CaP é a segunda neoplasia maligna mais incidente em homens, após o câncer de pulmão. Em termos globais, é responsável por mais de 1,2 milhões de novos casos, com estimativas crescentes. Apesar da mortalidade ter decrescido com o avanço das tecnologias de diagnóstico e tratamento, mais de 350.000 óbitos foram registrados como relacionadas ao CaP em 2018 (Bray et al., 2018; Rebello et al., 2021; Wong et al., 2016). No Brasil, estima-se que essa doença seja responsável por cerca de 30% de todos os tumores incidentes no sexo masculino, com cerca de 71.730 novos casos e 15.841 mortes no ano de 2020 (INCA, 2022; INCA, 2022a).

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CaP, a idade é o principal, uma vez que mais de 85% dos indivíduos diagnosticados são maiores de 60 anos. Consequentemente, países e regiões com maior expectativa de vida tendem a apresentar maiores números de incidência (Bray et al., 2018; Rebello et al., 2021). A hereditariedade também é importante, sendo que a chance de desenvolver a doença aumenta 2,2 vezes quando um parente de 1º grau (pai ou irmão) já foi diagnosticado. Esse valor aumenta para 4,9 vezes e 10,9 vezes, quando dois ou três parentes de primeiro grau, respectivamente, são acometidos pela doença (Srougi et al., 2008). Outros fatores de risco incluem tabagismo, obesidade e hábitos alimentares (Huncharek et al., 2010; Salem et al., 2011).

Com um início silencioso, nos estágios iniciais, o CaP não apresenta sintomas ou sinais definidos. Quando localmente avançado, a lesão comprime a uretra e/ou invade o esfíncter. Contudo, estas também são evidências do aumento do volume prostático devido à hiperplasia prostática benigna (HPB). Portanto, ambas alterações são responsáveis por dificuldade e incontinência mictúria, fluxo urinário fraco e desconforto ao urinar (Hamilton & Sharp, 2004). Nesse contexto, a detecção

do CaP exige estratégias combinadas, incluindo métodos bioquímicos, clínicos, de imagem e histológicos. São empregados a dosagem do PSA, o exame de toque retal, a ultrassonografia transretal (UTR), a ressonância magnética multiparamétrica (MRI), a tomografia computadorizada e a tomografia de emissão de pósitrons (PET). Contudo, a confirmação diagnóstica acontece mediante a realização da biópsia e análise histológica do fragmento coletado. Após a retirada do órgão (prostatectomia), já para fins terapêuticos, o CaP é estadiado para que, então, seja definida a estratégia de tratamento adjuvante da doença (Descotes, 2019; Sun et al., 2022).

O estadiamento TNM (do inglês, *Tumor-Node-Metastasis*), usado em combinação com o grau do tumor e níveis de PSA, é usado como base para a tomada de decisão do tratamento e consiste na avaliação da extensão do tumor (T), invasão linfonodal (N) e presença ou ausência de metástases distantes (M) (Buyyounouski et al., 2017), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Definições do estadiamento de tumores prostáticos conforme a classificação TNM estabelecida pelo Comitê Conjunto Americano sobre Câncer.

Categoria	Critério de classificação
Clínica (cT)	
Tumor (T)	
TX	O tumor primário não pode ser acessado
T0	Sem evidência do tumor primário
T1	Tumor clinicamente inaparente e não palpável
T1a	Achado histológico incidental de tumor em 5% ou menos do tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental de tumor em mais de 5% do tecido ressecado.
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha encontrado em um ou ambos os lados, mas não palpável.
T2	O tumor é palpável e confinado na próstata
T2a	Tumor envolve metade de um lado ou menos
T2b	Tumor envolve mais da metade de um lado, mas não ambos os lados
T2c	Tumor envolve os dois lados
T3	Tumor extraprostático não fixo ou que não invade estruturas adjacentes
T3a	Extensão extraprostática (unilateral ou bilateral)

T3b	Tumor invade vesícula(s) seminal(is)
T4	O tumor é fixo ou invade estruturas adjacentes além das vesículas seminais, como esfíncter externo, reto, bexiga, músculos elevadores e/ou parede pélvica
Patológica (pT)	
T category	
T2	Confinado ao órgão
T3	Extensão extraprostática
T3a	Extensão extraprostática (unilateral ou bilateral) ou invasão microscópica do colo da bexiga
T3b	Tumor invade vesícula(s) seminal(is)
T4	O tumor é fixo ou invade estruturas adjacentes além das vesículas seminais, como esfíncter externo, reto, bexiga, músculos elevadores e/ou parede pélvica
N category	
NX	Os linfonodos regionais não foram acessados
N0	Sem linfonodos regionais positivos
N1	Metástases em linfonodos regionais
M category	
M0	Sem metástase distante
M1	Metástase distante
M1a	Metástase em linfonodos não regionais
M1b	Metástase no osso
M1c	Metástase em outro(s) local(is) com ou sem doença óssea

*A atribuição da categoria clínica T (cT) é realizada usando informações do toque retal. A atribuição da categoria patológica T (pT) é realizada em achados histológicos de prostatectomia radical. Fonte: Buyyounouski et al. 2017 (Adaptado).

O sistema de classificação de Gleason, desenvolvido em 1967 e atualizado em 2014, é empregado na avaliação da agressividade do CaP e, portanto, no prognóstico da doença (Gleason, 1992; Linkon et al., 2021). Definido em graus, o sistema é utilizado para descrever os padrões de diferenciação glandular, sendo o grau 1 correspondente ao tumor com células bem diferenciadas e melhor comportamento biológico e o grau 5 estabelecido como o perfil pouco diferenciado e, portanto, com comportamento mais agressivo. Os graus 2, 3 e 4 são níveis intermediários de diferenciação (Linkon et al., 2021). Devido à heterogeneidade do CaP, cada lesão recebe duas notas que se referem às alterações celulares mais frequentes, as quais são somadas e, ao final, cinco grupos são estabelecidos

(**Tabela 2**) conforme a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP), quais sejam: Grupo 1 - Gleason ≤ 6 ; Grupo 2 – Gleason 7 (3+4); Grupo 3 - Gleason 7 (4+3); Grupo 4 - Gleason 8 (4+4; 3+5; 5+3); e Grupo 5 - Gleason 9 e 10 (4+5; 5+4 ou 5+5) (Epstein et al., 2016a). Para evitar e/ou minimizar as divergências entre as avaliações e tornar o método de classificação mais acurado, análises computacionais de imagens e algoritmos de *deep learning* vêm sendo incorporados à interpretação de dados histológicos (Linkon et al., 2021).

Tabela 2: Definição histológica do novo sistema de graduação baseado em Gleason conforme estabelecido pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP).

Grupo	Score de Gleason	Características
1	≤ 6	Apenas glândulas bem formadas, discretas e individuais.
2	7 (3 + 4)	Glândulas predominantemente bem formadas com menor componente de glândulas mal-formadas/fundidas/cribriformes.
3	7 (4 + 3)	Glândulas predominantemente mal-formadas/fundidas/cribriformes com menor componente de glândulas bem formadas.
4	8 (4 + 4); (3 + 5); (5 + 3)	Apenas glândulas mal-formadas/fundidas/cribriformes; Glândulas predominantemente bem formadas e uma fração menor sem glândulas; Glândulas predominantemente ausentes com fração menor de glândulas bem formadas.
5	9 e 10	Sem formação de glândulas (com ou sem necrose) com ou sem glândulas mal-formadas/fundidas/cribriformes.

Fonte: (Epstein et al., 2016). Adaptado.

Quanto mais precocemente o tumor for detectado, mais eficazes se tornam as intervenções terapêuticas. Com o surgimento de técnicas mais eficientes de diagnóstico, de 1989 até os anos 2010, houve uma redução de aproximadamente 66% dos quadros graves de CaP em relação ao número total de casos, devido ao tratamento precoce (Jakobsen et al., 2022; van den Bergh et al., 2015). Quando o tumor prostático se encontra confinado ao órgão, ou localmente avançado, o que corresponde a aproximadamente 90% dos casos (Yap et al., 2016), a prostatectomia e radioterapia são comumente recomendadas e eficazes (Keyes et al., 2013; Nevedomskaya et al., 2018). Em casos de acometimento de outros tecidos além da próstata, a terapia de privação androgênica (TPA) é utilizada. Esta

visa inibir a sinalização da testosterona, seja via castração cirúrgica ou química (C. Dai et al., 2017; Yap et al., 2016). Algumas das principais drogas utilizadas na hormonioterapia são os análogos de hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), estrógenos, drogas anti-androgênicos como a ciproterona, flutamida, nilutamida, e inibidores da produção hormonal como a abiraterona e a enzalutamida (Nevedomskaya et al., 2018).

Contudo, pacientes metastáticos eventualmente desenvolverão resistência à TPA entre 12 e 18 meses, o que caracteriza o CaP resistente à castração (CRPC) (de Maeseneer et al., 2015; B.-R. ; Wang et al., 2022). Esses pacientes têm uma sobrevida global média de 14 a 26 meses (Gravis, 2019). Atualmente, novos anti-androgênicos (Enzalutamida ou Abiraterona), radioterápicos (Radium-223) e imunoterápicos (sipuleucel-T) foram aprovados para tratamento de pacientes com CRPC metastático (mCRPC). Porém, inevitavelmente, o mCRPC adquire resistência e se torna CaP resistente à terapia e à castração (t-CRPC), que é considerado uma doença em estágio terminal, sem terapia eficaz (Gravis, 2019; Virgo et al., 2017; B.-R. ; Wang et al., 2022).

Marcadores moleculares também têm sido amplamente estudados para auxiliar no manejo clínico da doença (Litwin & Tan, 2017). De fato, o uso de biomarcadores para diagnóstico e classificação tem revolucionado a perfilação de tumores, sendo capazes de rastrear, identificar, prognosticar e prever a evolução das lesões (Hatakeyama et al., 2017). Apesar de o PSA ser o biomarcador mais comumente empregado na detecção precoce do CaP e ser responsável pelo aumento dos diagnósticos e redução na mortalidade pela doença, esse alvo tem sido amplamente questionado. Autores relatam a influência de diferentes fatores não malignos nos níveis séricos de PSA como a idade, prostatites agudas, ejaculação, cateterização e medicamentos. Isso o torna não-específico, o que conduz a um número significativo de resultados falso positivos e a realização de biópsias desnecessárias (Hatakeyama et al., 2017; Ilic et al., 2018).

Visando aumentar a especificidade dos métodos moleculares, a associação do PSA com o PCA3 (do inglês, *Prostate Cancer Associated 3*) também descrito como *Prostate Cancer gene 3*, *Prostate Cancer Antigen 3*, *DD3*, *PCAT3* e *PRUNE2-AS1*, vem sendo utilizado clinicamente desde 2012 com a aprovação pelo FDA do kit PROGENSA™ da empresa Gen Probe. Nesse caso, os níveis de transcritos de

ambos os genes são mensurados, gerando uma pontuação. Esta é, portanto, baseada na razão entre a expressão desses dois genes e indica a probabilidade de o paciente estar com CaP, com melhores parâmetros de sensibilidade e especificidade (Crawford et al., 2012; Durand et al., 2014; Hatakeyama et al., 2017; Sartori & Chan, 2014).

A detecção da fusão TMPRSS2-ERG também tem sido testada como estratégia diagnóstica (Tomlins et al., 2016). Além disso, marcadores moleculares são utilizados em ensaios de prognóstico e resposta terapêutica. O teste de progressão do ciclo celular (Prolaris) determina a agressividade de tumores, inclusive o CaP, baseada no perfil de expressão de 46 genes, sendo 31 destes associados ao ciclo celular (Crawford et al., 2014). O Oncotype DX analisa genes da via de sinalização androgênica, de proliferação, de organização citoesquelética, e de resposta estromal, sendo clinicamente validado na identificação de pacientes responsivos a quimioterapia (Knezevic et al., 2013). Contudo, o gene *PCA3*, descrito primeiramente por pesquisadores do Hospital Johns Hopkins e da Universidade de Radboud (McKillop, 2006), se destaca e permanece amplamente explorado cientificamente com tendência de dados crescente (**Figura 2**).

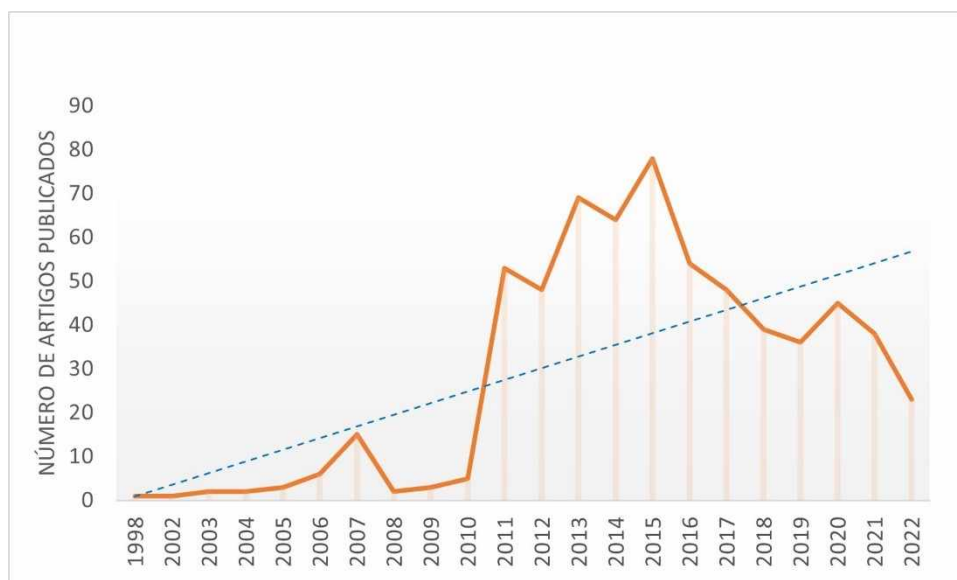


Figura 2: Análise do número de artigos publicados envolvendo o gene *PCA3* desde 1998. Os dados do PubMed foram acessados em (mês) 2022 como resultado da busca da palavra-chave “PCA3”. Em laranja está representado o número de publicações e em azul a linha de tendencia dos dados. (Imagem autoral).

O *PCA3* tem se mostrado valioso no diagnóstico do CaP, sendo este perfil o mais prevalente entre as publicações envolvendo esse gene. A **Tabela 3** ilustra alguns desses estudos e evidencia a diversidade de amostras e estratégias testadas. Embora o seu papel como biomarcador esteja muito bem estabelecido (Clarke et al., 2009a; Crawford et al., 2012; Ghafouri-Fard et al., 2022; Hatakeyama et al., 2017; Lemos et al., 2019; Tomlins et al., 2016), os mecanismos que envolvem sua ativação, funções biológicas e vias e moléculas reguladas ainda permanecem por serem descritos.

Tabela 3: Principais achados do *PCA3* como marcador de diagnóstico.

Estudo	Avaliação/ diagnóstico	Principais achados
(van Poppel et al., 2012)	Amostras de urina (DNA, RNA, proteínas e metabólitos); <i>PCA3</i>	Testes não invasivos em urina apresentam o <i>PCA3</i> como biomarcador para CaP.
(Neves et al., 2013a)	Amostras de sangue periférico (RNA e proteína); <i>PCA3</i> e PSA	Testes de detecção de <i>PCA3</i> em sangue periférico é uma ferramenta eficiente para o diagnóstico do CaP. Quando associados à dosagem de PSA apresenta especificidade de 93% e sensibilidade de 60%.
(Salagierski & Schalken, 2012)	Amostras de sangue e urina (RNA); <i>PCA3</i> e <i>TMPRSS2:ERG</i>	Biomarcadores moleculares séricos e urinários foram identificados, incluindo o <i>PCA3</i> , que foi introduzido clinicamente.
(Groskopf et al., 2006)	Amostra de urina (RNA); <i>PCA3</i>	O ensaio APTIMA <i>PCA3</i> aumentou a especificidade diagnóstica estabelecida por um novo algoritmo.
(Roobol et al., 2010)	Amostra de biópsia (RNA); <i>PCA3</i>	<i>PCA3</i> como teste de triagem de primeira linha mostrou desempenho melhorado no diagnóstico de CaP em relação ao PSA.
(Ploussard et al., 2010)	Amostra de urina (RNA); <i>PCA3</i>	A pontuação dos transcritos de <i>PCA3</i> correlacionou com o risco de nova biópsia, evitando o sobretratamento.
(Fenner, 2017)	Amostras de urina e tecido (RNA); <i>PCA3</i> e PSA	Ensaio quantitativo RT-PCR com <i>PCA3</i> promissor na análise de

		urina, reduzindo o número de biópsias desnecessárias.
(Tosoian et al., 2010)	Amostra de urina (RNA); <i>PCA3</i>	Prostatite crônica não influenciou o escore do <i>PCA3</i> .
(Durand et al., 2012)	Amostra de urina (RNA); <i>PCA3</i>	A quantificação de <i>PCA3</i> mostrou um aumento significativo na especificidade de diagnóstico quando comparado com PSA, <i>PSAD</i> e <i>PCA3</i> .
(Ruffion et al., 2013)	Células tumorais circulantes (CTC) no sangue (RNA) <i>PCA3</i>	Foi desenvolvida uma plataforma de dispositivo baseada em chip usando <i>PCA3</i> como alvo para capturar CTC.
(Mao et al., 2018)	Sangue periférico (RNA); <i>PCA3</i> , PSA e <i>hK2</i>	A combinação de <i>PCA3</i> , PSA e <i>hK2</i> mostrou melhor desempenho do que os biomarcadores individuais na detecção do CaP.
(Cao et al., 2018)	Amostras de urina (RNA) <i>PCA3</i> e PSA	A combinação de <i>PCA3</i> com PSA ofereceu melhor desempenho geral na identificação de CaP do que o PSA sérico sozinho em população de alto risco.
(Rigau et al., 2011)	Amostras de urina (RNA); <i>PCA3</i> , <i>PSMA</i> e <i>PSGR</i>	As pontuações de <i>PSMA</i> , <i>PSGR</i> e <i>PCA3</i> foram preditores significativos de CaP usando um modelo multiplex.

hK2: human kallikrein 2; mRNA: RNAmensageiro; CaP: câncer de próstata; *PCA3*: *prostate cancer antigen 3*; PSA: prostate specific antigen; *PSAD*: prostate specific antigen density; *PSGR*: *prostate specific G protein coupled receptor*; *PSMA*: *prostate-specific membrane antigen*. Fonte: Lemos et al., 2019 (Adaptado).

Localizado no cromossomo 9, posição q21.2, e possuindo cerca de 25k nucleotídeos, o gene *PCA3* é um gene não codificante longo (long non-coding RNA - lncRNA) (Bussemakers et al., 1999), uma vez que apresenta uma alta frequência de códons de parada detectados em seus quadros de leitura, sem proteína ou peptídeo identificados (Lemos et al., 2019). Possui um promotor com 460 nucleotídeos sem a presença de sequências iniciadoras clássicas, como a TATA box, e polimorfismos identificados nessa região têm sido relacionados com a tumorigênese (Clarke et al., 2009b; Zhou et al., 2011). Encontra-se em sentido antisense ao intron 6 do gene *PRUNE2* (do inglês *Prune homolog 2*), sendo

formado por quatro exons (Bussemakers et al., 1999; Clarke et al., 2009a). O transcrito primário de *PCA3* pode sofrer *splicing* e/ou poliadenilação alternativos, produzindo diferentes isoformas, sendo a mais frequente a que contém os exons 1, 2c, 3 e 4 (*PCA3-5*). Clarke et al, em 2009, descreveram outras isoformas (*PCA3-1*, *PCA3-2*, *PCA3-4*) decorrentes de combinações entre os exons e/ou introns e diferentes sítios iniciadores de transcrição, como demonstrado na **Figura 3** (Clarke et al., 2009a; Lemos et al., 2019). Marangoni et al. também descrevem 4 variantes do gene *PCA3* incluindo fragmentos de 88 pb (gi:87245044), 140 pb (gi:87245043) e 322 pb (gi:87245042) e 277pb (Marangoni et al., 2015). A variante de 277pb é amplamente utilizada para o diagnóstico de CaP (Neves et al., 2013b).

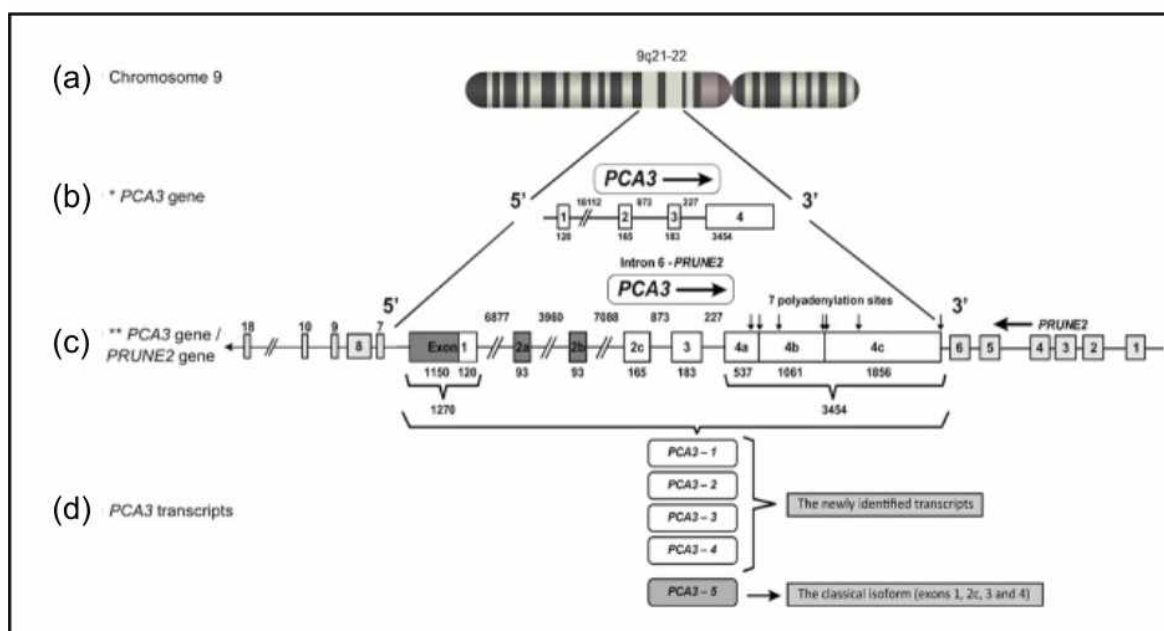


Figura 3: Gene *PCA3*, estrutura e transcritos. a) O gene *PCA3* está localizado no cromossomo humano 9q21-22. (b) Estrutura do gene *PCA3* descrita em 1999, compreendendo 4 éxons. (c) Estrutura do gene *PCA3* atualizada em 2009 por Clarke e colaboradores (Clarke et al., 2009), apresentando uma unidade transcricional mais complexa, incluindo éxons adicionais. Nesta descrição, verificou-se que o exon 1 era 1150 pb mais longo, compreendendo 1270 pb. Três exons de *splicing* alternativos foram descritos no exon 2 (2a, 2b e 2c) e quatro sítios de poliadenilação adicionais foram observados no exon 4, elevando o número total de sítios de poliadenilação para sete (indicados por setas verticais). As caixas escuras representam as regiões do gene *PCA3* mais recentemente identificadas, que possuem 6 éxons com *splicing* alternativo do exon 2a (93 bp), 2b (93 bp) e 2c (o exon 2 original tinha 165 pb). O gene *PCA3* encontra-se em

sentido antisense ao íntron 6 de *PRUNE2* (também chamado de isoforma 1 de BMCC1). As caixas cinza-claros representam os éxons de *PRUNE2* e as caixas brancas representam os éxons *PCA3*. (d) Transcritos de *PCA3*: isoformas *PCA3* 1-4 (identificadas por Clarke et al em 2009) e *PCA3*-5 (isoforma clássica). Fonte: (Lemos et al., 2019).

Diante da organização genômica dos genes *PCA3* e *PRUNE2*, existe um mecanismo de modulação entre ambos via Adenosina Deaminase Dependente de RNA1 (ADAR). Descrito por Salameh e co-autores em 2015, o lncRNA *PCA3* anela complementarmente ao intron 6 do pré-mRNA do *PRUNE2*, formando um duplex de RNA (dsRNA *PCA3-PRUNE2*), o qual é reconhecido pela ADAR. Esta, por sua vez, edita a sequência nucleotídica de *PRUNE2*, regulando-o negativamente (Lemos et al., 2019; Salameh et al., 2015). Considerando que *PRUNE2* é conhecido por suas atividades como supressor tumoral, o gene *PCA3* é definido como um oncogene transdominante, auxiliando no processo de tumorigênese (Machida et al., 2006; Salameh et al., 2015). Além disso, também regula a expressão de miR-132–3p, miR-1261, *SREBP1* (do inglês, *Sterol regulatory element-binding protein 1*), *PRKD3* (do inglês, *Protein kinase D3*) e *LAP2α* (do inglês, *Lamin-associated polypeptide 2 alpha*) além da sinalização de p53 (Ghafouri-Fard et al., 2022).

O *PCA3* atua em diferentes processos associados à tumorigênese, sendo encontrado no núcleo ou no citoplasma (Schalken et al., 2003). Modula genes relacionados com a transição epitélio-mesenquimal como E-caderina, Citoqueratina-18, e os fatores de transcrição SNAIL e TWIST. Também se encontra envolvido na sinalização do Receptor de Andrógeno (AR) e regula mais 16 genes envolvidos no controle da expressão gênica e na sinalização celular (Lemos et al., 2016). Por fim, é capaz de “esponjar” microRNAs, alterando as suas funções e expressão (He et al., 2016).

Apesar dos notórios avanços, a pesquisa científica tem se dedicado à caracterização de novos marcadores para o CaP, explorando, para isso, diferentes estratégias. Nesse contexto, o *Phage display* oferece uma possibilidade de identificação de ligantes aos mais diferentes alvos (Arab et al., 2018; Miller et al., 2020; Moreira et al., 2018; Nixon et al., 2014; Smith, 1985; Smith & Petrenko, 1997).

Em 2018, Smith recebeu o prêmio Nobel de química pelo desenvolvimento da técnica de *Phage Display*, a qual se baseia em peptídeos/anticorpos expressos na superfície de bacteriófagos (Barbas, 2001; Saw & Song, 2019). Para isso, sequências de DNA são inseridas no material genético do fago M13 em fusão aos genes pIII ou pVIII, os quais codificam proteínas de revestimento (**Figura 4**) (Sawada, 2017). Nessa técnica, são utilizadas bibliotecas combinatórias altamente variáveis, cujas sequências de interesse são selecionadas e enriquecidas por meio do processo de *biopanning*. Ao final, são obtidos peptídeos/anticorpos com alta afinidade e seletividade, com promissora aplicabilidade clínica (Ch'ng et al., 2022; Jaroszewicz et al., 2022; Saw & Song, 2019).

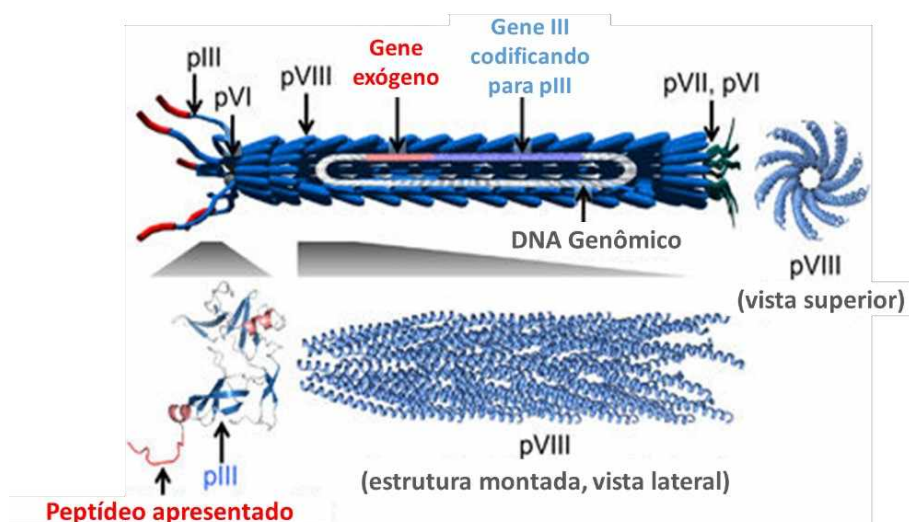


Figura 4: Imagem representativa de um bacteriófago M13. Um gene exógeno (em vermelho) é incorporado ao DNA do bacteriófago e o fenótipo representado pela sequência peptídica é expresso fusionado à pIII (azul) do vírus. Fonte: Sawada, 2017 (Adaptada).

Finalmente, técnicas de processamento de dados em grande escala também têm se destacado. As tecnologias “ômicas” associadas a bioinformática e o acesso a grandes bancos de dados de perfil genético e transcricional de pacientes como o The Cancer Genome Atlas (TCGA) e Gene Expression Omnibus (GEO) têm viabilizado a análise e identificação de alvos terapêuticos, biomarcadores e padrões de comportamento de vias e genes (Barrett et al., 2013; Jin et al., 2021; Tomczak et al., 2015; Toro-Domínguez et al., 2019). Assim, cada vez mais se avança no

caminho para um diagnóstico mais preciso e terapias mais eficientes, além de ampliar o conhecimento biológico e molecular a respeito da etiologia e progressão do CaP.

O TCGA foi criado por meio de um esforço colaborativo em larga escala liderado pelo National Cancer Institute (NCI) e pelo Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI) para mapear as mudanças genômicas e epigenômicas de tumores, utilizando sequenciamento e ferramentas de bioinformática. Esse banco de dados fornece dados clínicos, genômicos, transcriptômicos e proteômicos detalhados sobre mais de 20.000 indivíduos, diagnosticados com mais de 32 tipos de câncer humano, incluindo nove tumores raros. O TCGA se destaca na padronização e confiabilidade dos dados, os quais são curados e avaliados tecnicamente por meio de métricas de controle de qualidade (Alorda-Clara et al., 2022; Z. Wang et al., 2016).

O NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) é o repositório público internacional mais importante de dados de expressão gênica de alto rendimento e de matrizes de hibridização, chips e microarrays. Criado em 2000 como um recurso mundial para estudos de expressão gênica, evoluiu para arquivamento e processamento de dados de alto rendimento para diferentes aplicações, incluindo análises de metilação do genoma, estrutura da cromatina e de interações genoma-proteína. O GEO comporta padrões de relatórios com dados brutos, dados processados e metadados descritivos (Alorda-Clara et al., 2022; Clough & Barrett, 2016).

Nos últimos anos, as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento oferecem uma oportunidade sem precedentes para representar amostras de câncer em vários níveis moleculares. Nesse sentido, tecnologias de processamentos de dados como *Deep learning*, métodos baseados em redes, agrupamentos (*Clustering*), fatorização e transformação de dados e recursos, entre outros têm se tornado cada vez mais importantes (Nicora et al., 2020).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) cujo nome homenageia o psiquiatra alemão que a descreveu, Alois Alzheimer, é uma doença neurodegenerativa progressiva e o tipo mais comum de demência caracterizada por distúrbios na memória, na função cognitiva e comportamentais (Breijyeh et al., 2020; De-Paula et al., 2012).

Desde os primeiros sintomas, o traço característico clássico é a perda de memória recente, e, com o decorrer da doença e avanço dos estágios clínicos, há prejuízos na função cognitiva, dificuldade na fala, deslocamento espacial e no uso de objetos, distúrbios de atenção além de alterações comportamentais como irritabilidade, agressividade, alucinações e hiperatividade. Também são comuns sintomas depressivos, dificuldade de concentração, isolamento social e apatia (Lopez et al., 2003; Mayeux, 2010; Ownby et al., 2006; Porsteinsson et al., 2021).

A DA representa 50-60% de todos os casos de demência, afetando cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo estimados 152 milhões de casos até 2050. Atualmente, não há tratamento eficaz para a maioria das formas de demência e as intervenções clínicas se concentram no controle dos sintomas e no suporte ao paciente. A DA prejudica significativamente a saúde física, emoções e bem-estar financeiro do paciente, com um custo social grave (ADI, 2022; Alzheimer et al., 2019; Liu et al., 2022). No Brasil, a prevalência da DA aumentou 127% desde 1990, com estimativa de aumento em 284.2% até 2050 (Feter et al., 2021).

Apesar da complexidade e multifatorialidade da DA, esta é caracterizada, principalmente, pela formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares (**Figura 5**) decorrentes da acumulação de peptídeos beta-amilóides ($A\beta$) e filamentos anormais decorrentes da hiperfosforilação da proteína associada a microtúbulos (Tau) (Aguzzi & O'Connor, 2010; Breijyeh et al., 2020). Diferentemente do cérebro saudável (**Figura 5a**), a deposição extracelular da proteína $A\beta$, em diferentes morfologias e tamanhos, promove o surgimento de placas senis, também chamadas de placas amilóides (**Figura 5b e 5c**). Essas placas podem ser difusas, densas ou clássicas e compactadas (Armstrong & Armstrong, 2009; Breijyeh et al., 2020). O acúmulo de $A\beta$ desempenha um papel importante na neurotoxicidade e na função neural. Assim, o acúmulo de placas mais densas no hipocampo, amígdala e córtex cerebral pode causar estimulação de astrócitos e micróglia, danos a axônios, dendritos e perda de sinapses, além de deficiências cognitivas (Aguzzi & O'Connor, 2010; Armstrong & Armstrong, 2009; Chen et al., 2017; Tabaton & Piccini, 2005; Thal & Fändrich, 2015).

Os emaranhados neurofibrilares (**Figura 5b e 5c**) são filamentos anormais da proteína Tau hiperfosforilada, que, em alguns estágios, formam uma estrutura helicoidal e se acumula no citoplasma neuropericarial, axônios e dendritos. Essa

acumulação leva ao aumento da atividade de proteínas quinases e diminuição de fosfatase, além de prejudicar a montagem e organização de microtúbulos do citoesqueleto e proteínas associadas a tubulinas. Esses eventos conduzem à morte neuronal devido a grandes quantidades de proteína Tau filamentosa com resistência parcial a proteólise (Brion, 1998; Metaxas & Kempf, 2016; Shahani & Brandt, 2002).

A histopatologia da DA é caracterizada pelo dano sináptico e morte de neurônios no neocórtex e no sistema límbico, causando comprometimento da memória desde seus primeiros estágios. Os mecanismos da perda sináptica geralmente estão associados a problemas no transporte axonal, dano mitocondrial, estresse oxidativo, acúmulo de A β e Tau nos sítios sinápticos e inflamação. Também são descritos fatores genéticos, ambientais e deficiências no mecanismo de cálcio neuronal (Lleó et al., 2019; Overk & Masliah, 2014; Selkoe, 2001) com o encolhimento do córtex cerebral e do hipocampo, e alargamento dos ventrículos (**Figura 5b**) (Breijyeh et al., 2020).

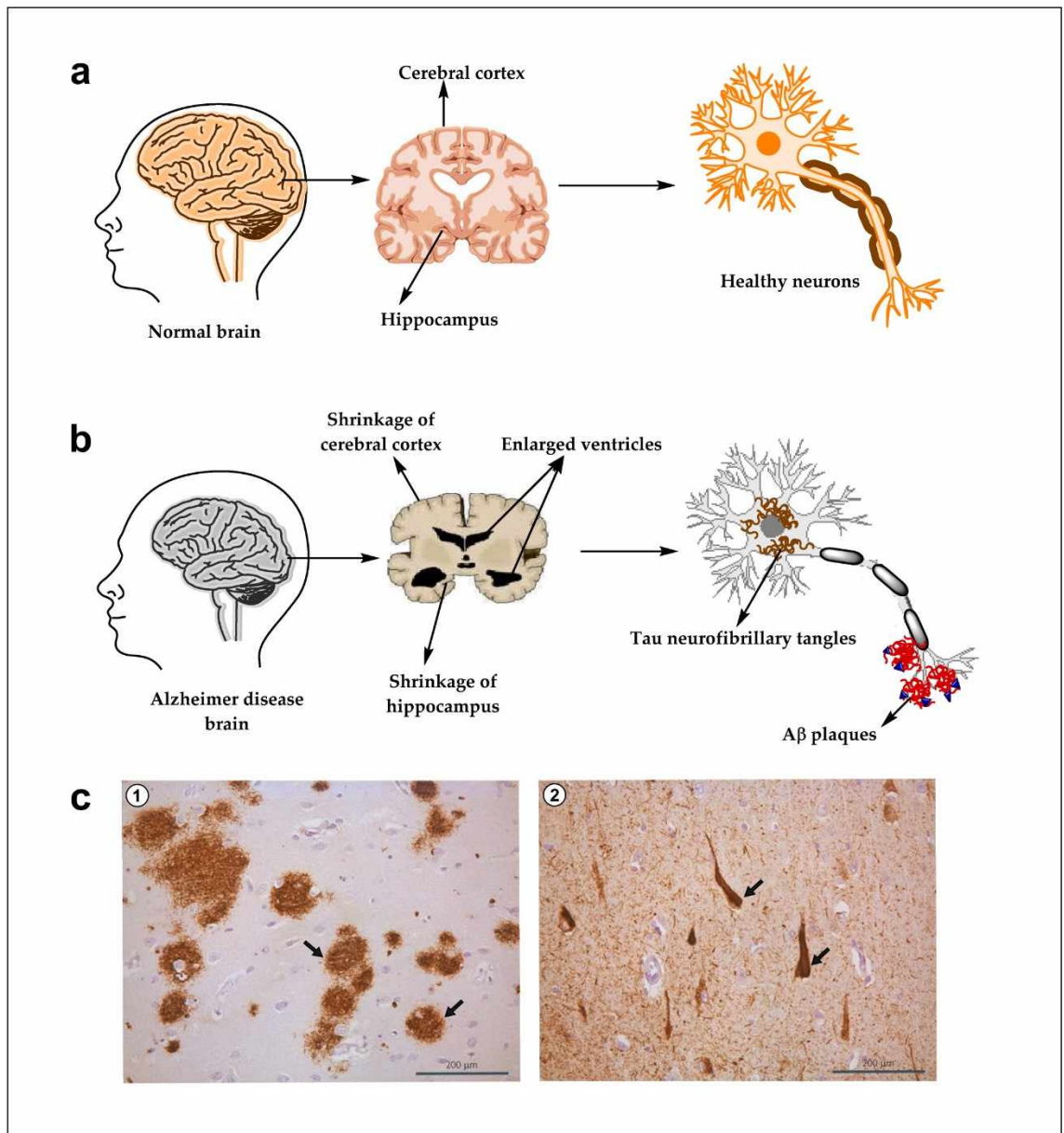


Figura 5: Estrutura fisiológica do cérebro e neurônios. (a) cérebro saudável. (b) cérebro com Doença de Alzheimer (DA). (c) Características da doença de Alzheimer em corte histológico. (c-1) Imagem de corte histológico do córtex cerebral afetado pela DA evidenciando a presença de β -amiloide (A β). As setas indicam o acúmulo de peptídeo A β , caracterizando as lesões extracelulares conhecidas como placas senis ou amilóides. (c-2) Imagem de corte histológico do córtex cerebral afetado pela DA evidenciando a fosforilação da proteína Tau. A seta indica lesões intraneuronais chamados emaranhados neurofibrilares, constituídos por filamentos anormais associados a fosforilação da proteína Tau. Fonte: (Aguzzi & O'Connor, 2010; Breijyeh et al., 2020) (Adaptado).

O principal fator de risco para a ocorrência da DA é a idade devido a mudanças no perfil de expressão de alguns genes, como o *CCL11* (do inglês, *C-C Motif Chemokine Ligand 11*), e alterações no sistema imune. Indivíduos mais jovens raramente são acometidos (de 1% a 6%) e a maioria dos casos de DA tem um início tardio, após os 65 anos de idade (Bekris et al., 2010; Guerreiro & Bras, 2015). A predisposição genética também está associada, uma vez que 70% dos casos são relacionados a características genéticas como mutações e polimorfismos no gene que codifica para Proteína Precursora de Amilóide (APP), no gene que codifica para γ -secretase, nos genes *PSEN1* (do inglês, *Presenilin 1*) e *PSEN2* (do inglês, *Presenilin 2*) e presença do alelo ApoE4 em mulheres (Armstrong, 2019; Cai et al., 2015; M.-H. Dai et al., 2018; Lanoiselée et al., 2017; N. M. Li et al., 2019; Tcw & Goate, 2017; Zhao et al., 2015). Por fim, a poluição do ar, a falta de nutrientes como o folato, vitaminas B12 e D (Koyama et al., 2016; Moulton & Yang, 2012), o acúmulo de metais tóxicos como chumbo, alumínio e cádmio, infecções crônicas no sistema nervoso, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes também são associados à maior incidência de DA (Alford et al., 2018; de Bruijn & Ikram, 2014; Huat et al., 2019; Lee et al., 2018; Sochocka et al., 2017).

A avaliação de marcadores neuropatológicos culminou na definição de duas etiologias canônicas para o surgimento da DA, definidas como hipótese amilóide e hipótese colinérgica. Contudo, fortes evidências, após décadas de associação da deposição de folhas-beta no sistema nervoso central com quadros de demência, confirmam a hipótese amiloide como a principal. Nesse sentido, os esforços têm se concentrado em terapias que atuem nesse mecanismo, predominantemente visando a redução de A β via inibição de β -secretase (BACE1) (Yan & Vassar, 2014).

Na hipótese amiloide, a degradação do A β , derivado da quebra enzimática pela γ -secretase é reduzida com o avanço da idade e em condições patológicas como a DA, o que leva ao acúmulo dos agregados multiméricos de peptídeos A β . De maneira simplificada, tal processo se inicia com a síntese da APP, uma proteína de 695 aminoácidos. Seu gene codificante *APP* é transcrito, traduzido e modificado pós-traducionalmente por proteases e secretases que por duas vias principais (**Figura 6**) a amiloidogênica e a não-amiloidogênica (Kang et al., 1987).

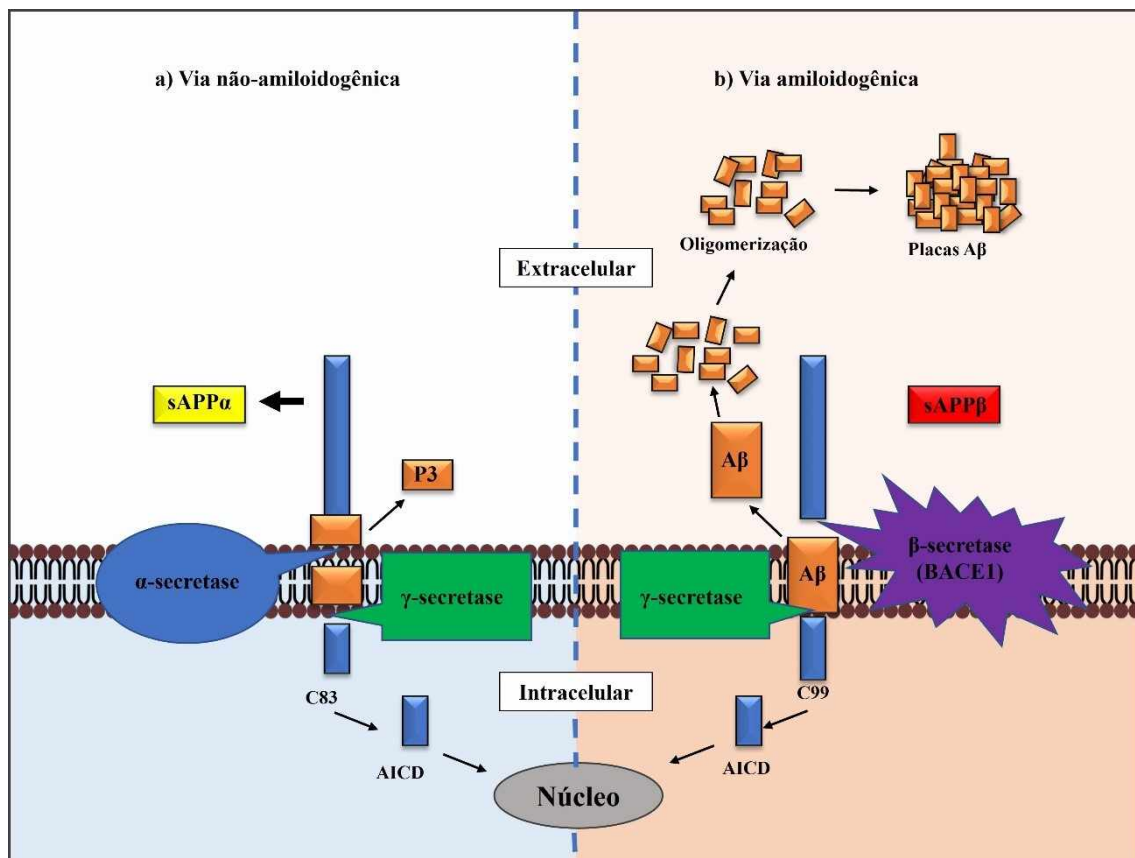


Figura 6: Processamento da proteína da Proteína Precursora de Amilóide (APP). Na via não amiloidogênica, a APP é sequencialmente clivada pelas enzimas α -secretase e γ -secretase. A primeira cliva APP no 17º aminoácido, gerando um grande domínio extracelular (sAPP- α) e um fragmento C-terminal de 83 aminoácidos associado à membrana (C83). APP C83 é então clivado pela γ -secretase gerando o peptídeo P3 e o domínio intracelular de APP (AICD), sendo ambos rapidamente degradados. Na via amiloidogênica, a APP é processada principalmente por β -secretase liberando sAPP- β e gerando um fragmento C terminal associado à membrana de 99 aminoácidos (C99). A γ -secretase ainda cliva C99, liberando AICD e o peptídeo A β amiloidogênico, que se agrega formando placas amilóides no cérebro. Fonte: (Rodrigues, T. S. 2021) (Adaptado)

Na via não-amiloidogênica o APP é inicialmente clivado no aminoácido 17, resultando no grande domínio extracelular sAPP α e em outro menor associado a membrana (C83). Este, subsequentemente, é clivado pela enzima γ -secretase formando o peptídeo P3 e o peptídeo correspondente ao domínio intracelular de APP (AICD). Ambos são facilmente degradados pelo metabolismo celular. Na via amiloidogênica a APP é clivada majoritariamente pela BACE1, resultando no

peptídeo sAPP- β e outro fragmento C-terminal associado à membrana com 99 aminoácidos (C99). O C99 é processado pela γ -secretase e gera o AICD e o peptídeo A β , que, devido à sua natureza hidrofóbica, forma agregados de monômeros que culminam na formação de placas amilóides/senis (Cole & Vassar, 2007; de Strooper et al., 2010; Hampel et al., 2021).

Contudo vários peptídeos A β são gerados por diferentes sítios de clivagens das secretases resultando em diferentes tamanhos (Burdick et al., 1992). O incremento na razão A β 42/A β 40 (com 42 e 40 aminoácidos respectivamente) leva a formação de fibrilas de A β , acarretando neurotoxicidade e indução da patologia via Tau, com morte celular e neurodegeneração (Kametani & Hasegawa, 2018; Paroni et al., 2019; Ricciarelli & Fedele, 2017). Apesar de o excesso de A β ocasionar neurotoxicidade, o fragmento A β 40 arbitrariamente é descrito como tendo papel neuroprotetor contra os danos ocasionados pelo A β 42, sendo este mais hidrofóbico, com maior agregação e neurotoxicidade (Burdick et al., 1992; Plant et al., 2003; Zou et al., 2003).

O diagnóstico precoce da DA afeta diretamente a qualidade de vida do paciente devido à implementação precoce de medidas que visam conter o avanço da doença. Uma grande dificuldade de se diagnosticar precocemente a DA é o compartilhamento de alterações e sintomas comuns ao envelhecimento livre da doença (Dubois et al., 2016; Porsteinsson et al., 2021). O uso de biomarcadores mensurados no fluido cérebro-espinhal (CSF) e sangue tem se mostrado confiáveis, embora seja necessário o desenvolvimento de novas estratégias (Briggs et al., 2016a; Hu et al., 2022; Lleó et al., 2021).

Já o tratamento da DA envolve a administração de duas classes de medicamentos, os antagonistas de N-methyl d-aspartate (NMDA) e os inibidores de colinesterase. As drogas mais usadas são o Donepezil, Rivastigmina, Galantamina (GAL) e Memantina. Contudo, a intervenção medicamentosa apenas minimiza os sintomas, não sendo curativa ou preventiva (Annicchiarico et al., 2007; Briggs et al., 2016b; Cacabelos, 2007; Folch et al., 2018; Kim & Park, 2017; R. Wang & Reddy, 2017). Embora a ação direta na via amiloidogênica seja a mais indicada no tratamento da DA, a transposição da barreira hemato-encefálica de moléculas inibidoras de BACE1 ainda é um empecilho. Neste sentido, novas moléculas bioativas pequenas que tenham a capacidade de reduzir e/ou impedir a formação

de placas amilóides via modulação de BACE1, são necessárias (Lai et al., 2022; H. J. Li et al., 2021; Pan et al., 2022; Y. Wang et al., 2022).

1.3 *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO

A *D. melanogaster*, popularmente conhecida como mosca de fruta, é um inseto pequeno e de ciclo de vida curto, levando cerca de 12 dias para chegar à fase adulta. São de fácil manutenção e produzem uma prole numerosa a cada cruzamento, o que as tornam interessantes para estudos científicos (Baenas et al., 2022; da Costa Silva et al., 2022; Demir & Turna Demir, 2022; Liegeois & Ferrandon, 2022; Malta et al., 2022). Sua biologia permite o estudo de diferentes mecanismos celulares e de desenvolvimento comuns em eucariotos superiores, incluindo humanos. Assim, a *D. melanogaster* é um modelo robusto que impactou a compreensão da genética moderna e da biologia do desenvolvimento nos últimos 100 anos (Shahzad et al., 2021). Após o sequenciamento do genoma de *D. melanogaster*, foi possível estimar que cerca de 75% dos genes associados a doenças em humanos possuem ortólogos funcionais nessa mosca (Adams et al., 2000; Buhlman et al., 2021).

O sistema nervoso humano e o da *D. melanogaster* (**Figura 7**) são ambos subdivididos em nervos motores, responsáveis pela condução de informações do sistema nervoso central (SNC) para os músculos e glândulas, e nervos sensoriais, que fazem a intercomunicação entre os órgãos sensoriais e SNC (**Figura 7a**). As semelhanças ainda incluem subdivisão do SNC em cérebro e medula ventral/espinal, mecanismos fundamentais de sinalização neuronal, uma arquitetura cerebral subjacente conservada e as principais classes de neurotransmissores (Venkatasubramanian & Mann, 2019).

As Drosófilas também possuem um repertório comportamental sofisticado que inclui extensas habilidades de adaptação à experiência e outras circunstâncias e, portanto, são suscetíveis aos mesmos tipos de insultos que podem causar distúrbios neuropsiquiátricos em humanos (O’Kane, 2011). Apesar de numericamente tais moscas apresentarem uma quantidade bem menor de neurônios e rede interneural menos complexa, em Drosófilas, assim como observado em humanos, são bem caracterizadas as unidades de processamento,

contendo regiões especializadas em centros funcionais olfatório, auditivo, visual, de aprendizado e motor, (**Figura 7b**) (Kaiser, 2015).

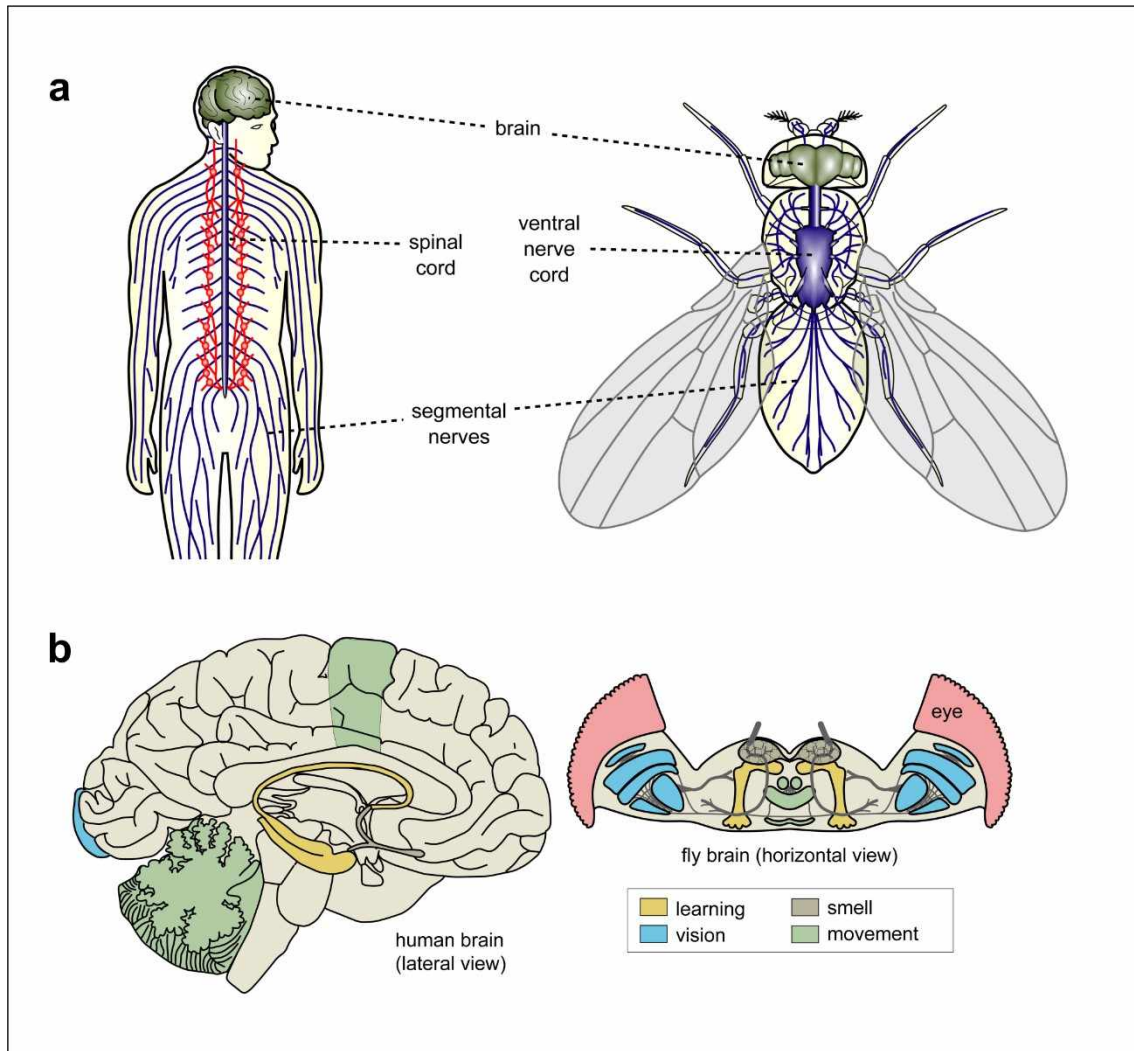


Figura 7: Semelhanças entre o sistema nervoso humano e de *D. melanogaster*. (a) Organização do sistema nervoso em cérebro na cabeça, medula ventral/espinal no tronco e nervos segmentares. (b) Organização do cérebro em centros funcionais codificados por cores para cérebro humano e de mosca. Em amarelo a região do cérebro responsável pelo aprendizado, em verde, pelo movimento, em azul, pela visão e em cinza a região responsável pelo cheiro. Fonte: (Organs / Drosophila4schools, n.d.) <<https://drosophila4schools.wordpress.com/organs/>> (Adaptado)

Um dos sistemas de expressão ectópica mais comuns em *D. melanogaster* é o sistema derivado de leveduras GAL4/UAS, descrito em 1993 por Brand e Perrimon (Busson & Pret, 2007). Esse sistema gerou diferentes linhagens transgênicas de Drosófilas utilizando a ligação específica do fator de transcrição GAL4 ao UAS (do inglês, *Upstream Activating Sequence*) através do cruzamento de um parental *driver* e outro *responder* (**Figura 8**) (Shahzad et al., 2021). A linhagem chamada “driver” é utilizada no cruzamento, sendo construída para direcionar a expressão do gene de interesse no modelo transgênico para um tecido específico. Como exemplo, a linhagem driver elav-GAL4 possui promotor gênico para expressão direcionada para o cérebro, geralmente associado a um gene repórter como o GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*) (Busson & Pret, 2007). Nesse modelo, o gene GAL4 codifica uma proteína de 881 aminoácidos, identificada em *Saccharomyces cerevisiae*, que atua como um regulador gênico induzido por galactose (Duffy, 2002; Ogienko et al., 2020). As linhagens chamadas “responder” são construídas de modo que a transcrição do gene de interesse, inserido por meio da incorporação no vetor de expressão, esteja sob comando de uma sequência de ativação antecedente dependente de GAL4. A exemplo da linhagem UAS-BACE1, APP, a qual expressa genes relacionados à DA (Busson & Pret, 2007). O acasalamento das moscas “responder” com as moscas “driver” resulta em uma progênie com os dois componentes, nos quais a expressão do UASgeneX segue um padrão de transcrição que reflete o do driver (**Figura 8**) (Duffy, 2002).

Neste trabalho, o sistema GAL4/UAS foi utilizado na construção da linhagem elav-GAL4 > UAS-BACE1, APP que representa um dos modelos mais bem aceitos para estudo *in vivo* do fenótipo de Alzheimer, produzindo as moscas denominadas *AD-Like* (semelhante à Doença de Alzheimer) (Malta et al., 2022). Nesse sistema, machos portando o “responder” UAS (UAS-BACE1, APP) são cruzados com fêmeas que expressam o “driver” GAL4 (elav-GAL4). Parte da progênie (F1), seguindo a segregação mendeliana, apresenta a super-expressão da proteína APP e da enzima BACE1, culminando no fenótipo de Alzheimer tardio por acúmulo de A β no cérebro (Duffy, 2002; Malta et al., 2022) (**Figura 8**).

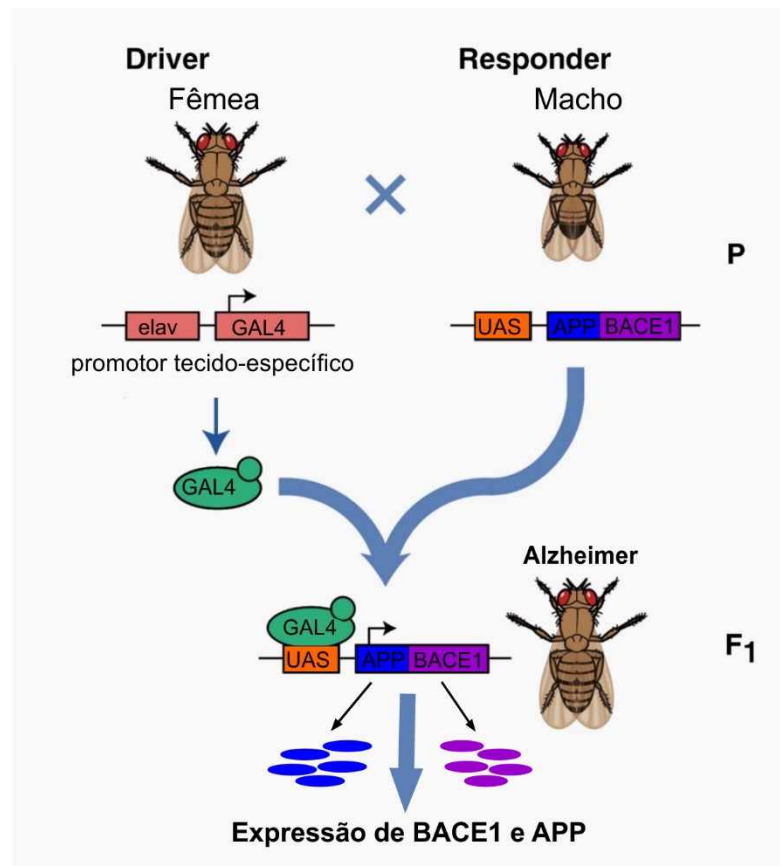


Figura 8: Modelo de *D. melanogaster* para Doença de Alzheimer. Para o modelo, ocorre o cruzamento transgênico simplificado entre a linhagem parental (P) *driver* (elav-GAL4) que expressa Gal4 de maneira tecido-específica, direcionada para o cérebro, e a linhagem parental (P) *responder* (UAS-BACE1, APP) que contém sequência UAS de ligação ao GAL4 e a sequência codificadora dos genes APP e BACE1. Na progênie F1, Gal4 se liga e ativa o potenciador UAS para transcrever genes subsequentes. A superexpressão de APP e BACE1 propiciam o acúmulo de Aβ e levam ao fenótipo modelado de Alzheimer (AD-Like). Fonte: (Shahzad et al., 2021). Adaptado.

Referencias

- About Alzheimer's & Dementia | Alzheimer's Disease International (ADI).* (n.d.). Retrieved November 3, 2022, from <https://www.alzint.org/about/>
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J.

- (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5461.2185>
- Aguzzi, A., & O'Connor, T. (2010). Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010 9:3, 9(3), 237–248. <https://doi.org/10.1038/nrd3050>
- Alford, S., Patel, D., Perakakis, N., & Mantzoros, C. S. (2018). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obesity Reviews*, 19(2), 269–280. <https://doi.org/10.1111/OBR.12629>
- Alorda-Clara, M., Torrens-Mas, M., Morla-Barcelo, P. M., Martinez-Bernabe, T., Sastre-Serra, J., Roca, P., Pons, D. G., Oliver, J., & Reyes, J. (2022). Use of Omics Technologies for the Detection of Colorectal Cancer Biomarkers. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 817, 14(3), 817. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14030817>
- Alzheimer, Association, sciencestaff, & alzorg. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 321–387. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2019.01.010>
- Amin, M., Khalid, A., Tazeen, N., & Yasoob, M. (2010). Zonal Anatomy of Prostate. *Annals of King Edward Medical University*, 16(3), 138–138. <https://doi.org/10.21649/AKEMU.V16I3.212>
- Annicchiarico, R., Federici, A., Pettenati, C., & Caltagirone, C. (2007). Rivastigmine in Alzheimer's disease: Cognitive function and quality of life. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(6), 1113. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1113/>
- Arab, A., Robati, R. Y., Nicastro, J., Slavcev, R., & Behravan, J. (2018). Phage-based Nanomedicines as New Immune Therapeutic Agents for Breast Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(11), 1195–1203. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180327152117>
- Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 87–105. <https://doi.org/10.5114/FN.2019.85929>
- Armstrong, R. A., & Armstrong, R. A. (2009). The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 47(4), 289–299.
- Baenas, N. ;, Wagner, A. E., Uversky, N., Baenas, N., & Wagner, A. E. (2022). *Drosophila melanogaster* as a Model Organism for Obesity and Type-2 Diabetes Mellitus by Applying High-Sugar and High-Fat Diets. *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 307, 12(2), 307. <https://doi.org/10.3390/BIOM12020307>
- Barbas, C. F. et al. (2001). Phage Display: a laboratory manual. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D991–D995. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1193>
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23(4), 213. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185

- countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.21492>
- Breijyeh, Z., Karaman, R., Muñoz-Torrero, D., & Dembinski, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5789, 25(24), 5789.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016a). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*, 16(3), 247–253. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.16-3-247>
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016b). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine*, 16(3), 247–253. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.16-3-247>
- Brion, J. P. (1998). Neurofibrillary Tangles and Alzheimer's Disease. *European Neurology*, 40(3), 130–140. <https://doi.org/10.1159/000007969>
- Buhlman, L. M., Krishna, G., Jones, T. B., & Thomas, T. C. (2021). Drosophila as a model to explore secondary injury cascades after traumatic brain injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112079. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112079>
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., & Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/β amyloid peptide analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 546–554. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48529-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48529-8)
- Bussemakers, M. J. G., van Bokhoven, A., Verhaegh, G. W., Smit, F. P., Karthaus, H. F. M., Schalken, J. A., Debruyne, F. M. J., Ru, N., & Isaacs, W. B. (1999). DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, 59(23), 5975–5979.
<https://doi.org/10.1038/ncb2161>
- Busson, D., & Pret, A.-M. (2007). *GAL4/UAS Targeted Gene Expression for Studying Drosophila Hedgehog Signaling*. 161–201. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-516-9_13
- Buyyounouski, M. K., Choyke, P. L., McKenney, J. K., Sartor, O., Sandler, H. M., Amin, M. B., Kattan, M. W., & Lin, D. W. (2017). Prostate cancer – major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(3), 245–253.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.21391>
- Cacabelos, R. (2007). Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(3), 303. [/pmc/articles/PMC2654795/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/172654795/)
- Cai, Y., An, S. S. A., & Kim, S. (2015). Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical Interventions in Aging*, 10, 1163–1172.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S85808>
- Câncer de próstata — Português (Brasil)*. (n.d.). Retrieved December 4, 2022, from
<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/prostata>
- Cao, L., Lee, C. H., Ning, J., Handy, B. C., Wagar, E. A., & Meng, Q. H. (2018). Combination of Prostate Cancer Antigen 3 and Prostate-Specific Antigen Improves Diagnostic Accuracy in Men at Risk of Prostate Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 142(9), 1106–1112.
<https://doi.org/10.5858/ARPA.2017-0185-OA>

- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/APS.2017.28>
- Ch'ng, A. C. W., Lam, P., Alassiri, M., & Lim, T. S. (2022). Application of phage display for T-cell receptor discovery. *Biotechnology Advances*, 54, 107870. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107870>
- Clarke, R. A., Zhao, Z., Guo, A. Y., Roper, K., Teng, L., Fang, Z. M., Samaratunga, H., Lavin, M. F., & Gardiner, R. A. (2009a). New Genomic Structure for Prostate Cancer Specific Gene PCA3 within BMCC1: Implications for Prostate Cancer Detection and Progression. *PLOS ONE*, 4(3), e4995. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0004995>
- Clarke, R. A., Zhao, Z., Guo, A. Y., Roper, K., Teng, L., Fang, Z. M., Samaratunga, H., Lavin, M. F., & Gardiner, R. A. (2009b). New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: Implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004995>
- Clough, E., & Barrett, T. (2016). The Gene Expression Omnibus database. *Methods in Molecular Biology*, 1418, 93–110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_5/COVER
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 2(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22/FIGURES/2>
- Crawford, E. D., Rove, K. O., Trabulsi, E. J., Qian, J., Drewnowska, K. P., Kaminetsky, J. C., Huisman, T. K., Bilowus, M. L., Freedman, S. J., Glover, W. L., & Bostwick, D. G. (2012). Diagnostic Performance of PCA3 to Detect Prostate Cancer in Men with Increased Prostate Specific Antigen: A Prospective Study of 1,962 Cases. *The Journal of Urology*, 188(5), 1726–1731. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2012.07.023>
- Crawford, E. D., Scholz, M. C., Kar, A. J., Fegan, J. E., Haregewoin, A., Kaldate, R. R., & Brawer, M. K. (2014). Cell cycle progression score and treatment decisions in prostate cancer: results from an ongoing registry. <https://doi.org/10.1185/03007995.2014.899208>, 30(6), 1025–1031. <https://doi.org/10.1185/03007995.2014.899208>
- da Costa Silva, J. R., Fujimura, P. T., Batista, L. L., Malta, S. M., Filho, R. M., Silva, M. H., de Souza, A. G., Silva, A. P. M., Borges, L. D. F., Bastos, V. A. F., Cossolin, J. F. S., Serrão, J. E., Bonetti, A. M., Júnior, L. C. O., & Ueira-Vieira, C. (2022). Differential gene expression by RNA-seq during Alzheimer's disease-like progression in the *Drosophila melanogaster* model. *Neuroscience Research*, 180, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2022.02.003>
- Dai, C., Heemers, H., & Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9), a030452. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030452>
- Dai, M.-H., Zheng, H., Zeng, L.-D., Zhang, Y., Dai, M.-H., Zheng, H., Zeng, L.-D., & Zhang, Y. (2018). The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget*, 9(19), 15132–15143. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23738>
- Das, C. K., Banerjee, I., & Mandal, M. (2020). Pro-survival autophagy: An emerging candidate of tumor progression through maintaining hallmarks of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 66, 59–74. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.08.020>

- de Bruijn, R. F. A. G., & Ikram, M. A. (2014). Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Medicine*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12916-014-0130-5/TABLES/1>
- de Maeseneer, D. J., van Praet, C., Lumen, N., & Rottey, S. (2015). Battling resistance mechanisms in antihormonal prostate cancer treatment: Novel agents and combinations. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33(7), 310–321. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2015.01.008>
- de Strooper, B., Vassar, R., & Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 2010 6:2, 6(2), 99–107. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.218>
- Demir, E., & Turna Demir, F. (2022). Drosophila melanogaster as a dynamic in vivo model organism reveals the hidden effects of interactions between microplastic/nanoplastic and heavy metals. *Journal of Applied Toxicology : JAT*. <https://doi.org/10.1002/JAT.4353>
- De-Paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. v. (2012). Alzheimer's disease. *Subcellular Biochemistry*, 65, 329–352. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_14/COVER
- Descotes, J. L. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, 6(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/J.AJUR.2018.11.007>
- Dubois, B., Padovanib, A., Scheltensc, P., Rossid, A., & Agnello, G. D. (2016). Timely Diagnosis for Alzheimer's Disease: A Literature Review on Benefits and Challenges. *Journal of Alzheimer's Disease*, 49(3), 617–631. <https://doi.org/10.3233/JAD-150692>
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in drosophila: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/GENE.10150>
- Durand, X., Moutereau, S., Xylinas, E., & de La Taille, A. (2014). Progensa™ PCA3 test for prostate cancer. <http://Dx.Doi.Org/10.1586/Erm.10.122>, 11(2), 137–144. <https://doi.org/10.1586/ERM.10.122>
- Durand, X., Xylinas, E., Radulescu, C., Haus-Cheymol, R., Moutereau, S., Ploussard, G., Forgues, A., Robert, G., Vacherot, F., Loric, S., Allory, Y., Ruffion, A., & de La Taille, A. (2012). The value of urinary prostate cancer gene 3 (PCA3) scores in predicting pathological features at radical prostatectomy. *BJU International*, 110(1), 43–49. <https://doi.org/10.1111/J.1464-410X.2011.10682.X>
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., & Humphrey, P. A. (2016a). The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 244–252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., & Humphrey, P. A. (2016b). The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 244–252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>

- Fenner, A. (2017). Prostate cancer: PCA3 as a Grade Reclassification Predictor. *Nature Reviews. Urology*, 14(7), 390. <https://doi.org/10.1038/NRUROL.2017.70>
- Feter, N., Leite, J. S., Caputo, E. L., Cardoso, R. K., & Rombaldi, A. J. (2021). Who are the people with Alzheimer's disease in Brazil? Findings from the Brazilian Longitudinal Study of Aging. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 24. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210018>
- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Auladell, C., & Camins, A. (2018). Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 62(3), 1223–1240. <https://doi.org/10.3233/JAD-170672>
- Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Baniahmad, A., Taheri, M., & Rashnoo, F. (2022). A review on the role of PCA3 lncRNA in carcinogenesis with an especial focus on prostate cancer. *Pathology - Research and Practice*, 231, 153800. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2022.153800>
- Gleason, D. F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human Pathology*, 23(3), 273–279. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90108-F](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90108-F)
- Gravis, G. (2019). Systemic treatment for metastatic prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, 6(2), 162–168. <https://doi.org/10.1016/J.AJUR.2019.02.002>
- Groskopf, J., Aubin, S. M. J., Deras, I. L., Blase, A., Bodrug, S., Clark, C., Brentano, S., Mathis, J., Pham, J., Meyer, T., Cass, M., Hodge, P., Macairan, M. L., Marks, L. S., & Rittenhouse, H. (2006). APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clinical Chemistry*, 52(6), 1089–1095. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.063289>
- Guerreiro, R., & Bras, J. (2015). The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Medicine*, 7(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/S13073-015-0232-5>
- Hamilton, W., & Sharp, D. (2004). Symptomatic diagnosis of prostate cancer in primary care: a structured review. *British Journal of General Practice*, 54(505).
- Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., Villemagne, V. L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., Masters, C. L., Cho, M., Lannfelt, L., Cummings, J. L., & Vergallo, A. (2021). The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry* 26:10, 26(10), 5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
- Hatakeyama, S., Yoneyama, T., Tobisawa, Y., & Ohyama, C. (2017). Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers. *International Journal of Clinical Oncology*, 22(2), 214–221. <https://doi.org/10.1007/S10147-016-1049-Y/FIGURES/3>
- He, J. H., Li, B. X., Han, Z. P., Zou, M. X., Wang, L., Lv, Y. B., Zhou, J. bin, Cao, M. R., Li, Y. G., & Zhang, J. zhi. (2016). Snail-activated long non-coding RNA PCA3 up-regulates PRKD3 expression by miR-1261 sponging, thereby promotes invasion and migration of prostate cancer cells. *Tumor Biology* 2016 37:12, 37(12), 16163–16176. <https://doi.org/10.1007/S13277-016-5450-Y>
- Hu, S., Yang, C., & Luo, H. (2022). Current trends in blood biomarker detection and imaging for Alzheimer's disease. *Biosensors and Bioelectronics*, 210, 114278. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2022.114278>

- Huat, T. J., Camats-Perna, J., Newcombe, E. A., Valmas, N., Kitazawa, M., & Medeiros, R. (2019). Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *Journal of Molecular Biology*, 431(9), 1843–1868. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.01.018>
- Huncharek, M., Sue Haddock, K., Reid, R., & Kupelnick, B. (2010). Smoking as a risk factor for prostate cancer: A meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American Journal of Public Health*, 100(4), 693–701. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.150508>
- Ilic, D., Djulbegovic, M., Jung, J. H., Hwang, E. C., Zhou, Q., Cleves, A., Agoritsas, T., & Dahm, P. (2018). Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 362. <https://doi.org/10.1136/BMJ.K3519>
- INCA. (2022a). *Câncer de próstata- Estatísticas*. Instituto Nacional de Câncer. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/prostata>
- INCA. (2022b). *O que é câncer? O Que é Câncer?* <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>
- Jakobsen, J., Veierød, M. B., Grimsrud, T. K., Fosså, S. D., Hammarström, B., & Kjærheim, K. (2022). Early detection of prostate cancer in firefighters: a register-based study of prognostic factors and survival. *Occupational and Environmental Medicine*, 79(3), 200–206. <https://doi.org/10.1136/OEMED-2021-107622>
- Jaroszewicz, W., Morcinek-Orłowska, J., Pierzynowska, K., Gaffke, L., & Węgrzyn, G. (2022). Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2), 1–25. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAB052>
- Jin, K., Qiu, S., Jin, D., Zhou, X., Zheng, X., Li, J., Liao, X., Yang, L., & Wei, Q. (2021). Development of prognostic signature based on immune-related genes in muscle-invasive bladder cancer: bioinformatics analysis of TCGA database. *Aging (Albany NY)*, 13(2), 1859. <https://doi.org/10.18632/AGING.103787>
- Kaiser, M. (2015). Neuroanatomy: Connectome Connects Fly and Mammalian Brain Networks. *Current Biology*, 25(10), R416–R418. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.03.039>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12(JAN), 25. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00025/BIBTEX>
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., & Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733–736. <https://doi.org/10.1038/325733A0>
- Keyes, M., Crook, J., Morton, G., Vigneault, E., Usmani, N., & Morris, W. J. (2013). Treatment options for localized prostate cancer. *Canadian Family Physician*, 59(12).
- Kim, J. K., & Park, S. U. (2017). Pharmacological aspects of galantamine for the treatment of Alzheimer's disease. *EXCLI Journal*, 16, 35–39. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2016-820>
- Knezevic, D., Goddard, A. D., Natraj, N., Cherbavaz, D. B., Clark-Langone, K. M., Snable, J., Watson, D., Falzarano, S. M., Magi-Galluzzi, C., Klein, E. A., & Quale, C. (2013). Analytical validation of the

- Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-690/FIGURES/4>
- Koyama, A., Hashimoto, M., Tanaka, H., Fujise, N., Matsushita, M., Miyagawa, Y., Hatada, Y., Fukuhara, R., Hasegawa, N., Todani, S., Matsukuma, K., Kawano, M., & Ikeda, M. (2016). Malnutrition in Alzheimer's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Frontotemporal Lobar Degeneration: Comparison Using Serum Albumin, Total Protein, and Hemoglobin Level. *PLOS ONE*, 11(6), e0157053. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157053>
- Lai, X., Hu, J., Liu, H., Lan, L., Long, Y., Gao, X., & Deng, J. (2022). A short peptide from sAPP α binding to BACE1-APP action site rescues Alzheimer-like pathology. *Neuroscience Letters*, 770, 136397. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2021.136397>
- Lanoiselée, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A. C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., de la Sayette, V., Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., ... Campion, D. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Medicine*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1002270>
- Lee, H. J., Seo, H. I., Cha, H. Y., Yang, Y. J., Kwon, S. H., & Yang, S. J. (2018). Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clinical Nutrition Research*, 7(4), 229. <https://doi.org/10.7762/CNR.2018.7.4.229>
- Lemos, A. E. G., da Rocha Matos, A., Ferreira, L. B., & Gimba, E. R. P. (2019). The long non-coding RNA PCA3: an update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. *Oncotarget*, 10(61), 6589. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27284>
- Lemos, A. E. G., Ferreira, L. B., Batoreu, N. M., de Freitas, P. P., Bonamino, M. H., & Gimba, E. R. P. (2016). PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumor Biology* 2016 37:8, 37(8), 11339–11348. <https://doi.org/10.1007/S13277-016-5012-3>
- Li, H. J., Wang, T. Z., Hou, C., Liu, H. Y., Zhang, Y., Xue, Z. Z., Cai, Q. C., Chen, D. M., Gao, C. W., Yang, J. L., Cong, L., Chen, Y., Yao, Q., Zhu, Q. S., & Cao, C. (2021). Artemether Attenuates A β 25-35-Induced Cognitive Impairments by Downregulating A β , BACE1, mTOR and Tau Proteins. *Clinical Laboratory*, 67(10), 2207–2215. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2021.201212>
- Li, N. M., Liu, K. F., Qiu, Y. J., Zhang, H. H., Nakanishi, H., & Qing, H. (2019). Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regeneration Research*, 14(4), 658–665. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.247469>
- Liegeois, S., & Ferrandon, D. (2022). Sensing microbial infections in the *Drosophila melanogaster* genetic model organism. *Immunogenetics* 2022 74:1, 74(1), 35–62. <https://doi.org/10.1007/S00251-021-01239-0>
- Linkon, A. H. M., Labib, M. M., Hasan, T., Hossain, M., & Jannat, M. E. (2021). Deep learning in prostate cancer diagnosis and Gleason grading in histopathology images: An extensive study. *Informatics in Medicine Unlocked*, 24, 100582. <https://doi.org/10.1016/J.IMU.2021.100582>
- Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 317(24), 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.7248>

- Liu, S., Fan, M., Zheng, Q., Hao, S., Yang, L., Xia, Q., Qi, C., & Ge, J. (2022). MicroRNAs in Alzheimer's disease: Potential diagnostic markers and therapeutic targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112681. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.112681>
- Lleó, A., Núñez-Llaves, R., Alcolea, D., Chiva, C., Balateu-Pañós, D., Colom-Cadena, M., Gomez-Giro, G., Muñoz, L., Querol-Vilaseca, M., Pegueroles, J., Rami, L., Lladó, A., Molinuevo, J. L., Tainta, M., Clarimón, J., Spires-Jones, T., Blesa, R., Fortea, J., Martínez-Lage, P., ... Belbin, O. (2019). Changes in synaptic proteins precede neurodegeneration markers in preclinical Alzheimer's disease cerebrospinal fluid*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(3), 546–560. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA118.001290/ATTACHMENT/6312D389-C1AE-49C9-8941-88F292F23203/MMC1.ZIP>
- Lleó, A., Zetterberg, H., Pegueroles, J., Karikari, T. K., Carmona-Iragui, M., Ashton, N. J., Montal, V., Barroeta, I., Lantero-Rodríguez, J., Videla, L., Altuna, M., Benejam, B., Fernandez, S., Valldenueu, S., Garzón, D., Bejanin, A., Iulita, M. F., Camacho, V., Medrano-Martorell, S., ... Fortea, J. (2021). Phosphorylated tau181 in plasma as a potential biomarker for Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24319-x>
- Lopez, O. L., Becker, J. T., Sweet, R. A., Klunk, W., Kaufer, D. I., Saxton, J., Habeych, M., & DeKosky, S. T. (2003). Psychiatric symptoms vary with the severity of dementia in probable Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15(3), 346–353. <https://doi.org/10.1176/JNP.15.3.346/ASSET/IMAGES/LARGE/RC4690T3.JPEG>
- Machida, T., Fujita, T., Ooo, M. L., Ohira, M., Isogai, E., Mihara, M., Hirato, J., Tomotsune, D., Hirata, T., Fujimori, M., Adachi, W., & Nakagawara, A. (2006). Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* 2006 25:13, 25(13), 1931–1942. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209225>
- Malta, S. M., Batista, L. L., Silva, H. C. G., Franco, R. R., Silva, M. H., Rodrigues, T. S., Correia, L. I. V., Martins, M. M., Venturini, G., Espindola, F. S., da Silva, M. V., & Ueira-Vieira, C. (2022). Identification of bioactive peptides from a Brazilian kefir sample, and their anti-Alzheimer potential in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15297-1>
- Mao, Z., Ji, A., Yang, K., He, W., Hu, Y., Zhang, Q., Zhang, D., & Xie, L. (2018). Diagnostic performance of PCA3 and hK2 in combination with serum PSA for prostate cancer. *Medicine*, 97(42). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012806>
- Marangoni, K., Neves, A. F., Rocha, R. M., Faria, P. R., Alves, P. T., Souza, A. G., Fujimura, P. T., Santos, F. A. A., Araújo, T. G., Ward, L. S., & Goulart, L. R. (2015). Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like cancer detection. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep12090>
- Mayeux, R. (2010). Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(23), 2194–2201. https://doi.org/10.1056/NEJMCP0910236/SUPPL_FILE/NEJMCP0910236_DISCLOSURES.PDF
- McKillop, C. (2006). Interview with Jack Schalken. PCA3 and its Use as a Diagnostic Test in Prostate Cancer. In *European Urology* (Vol. 50, Issue 1, pp. 153–154). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.04.021>

- Mendiratta, G., Ke, E., Aziz, M., Liarakos, D., Tong, M., & Stites, E. C. (2021). Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26213-y>
- Metaxas, A., & Kempf, S. J. (2016). Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: Elucidation of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-proteomics. *Neural Regeneration Research*, 11(10), 1579–1581. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.193234>
- Miller, S. M., Wang, T., & Liu, D. R. (2020). Phage-assisted continuous and non-continuous evolution. *Nature Protocols* 2020 15:12, 15(12), 4101–4127. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00410-3>
- Moreira, G. M. S. G., Fühner, V., & Hust, M. (2018). Epitope Mapping by Phage Display. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1701, pp. 497–518). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7447-4_28
- Moulton, P. V., & Yang, W. (2012). Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/472751>
- Netto, G. J., Amin, M. B., Berney, D. M., Compérat, E. M., Gill, A. J., Hartmann, A., Menon, S., Raspollini, M. R., Rubin, M. A., Srigley, J. R., Hoon Tan, P., Tickoo, S. K., Tsuzuki, T., Turajlic, S., Cree, I., & Moch, H. (2022). The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. *European Urology*, 82(5), 469–482. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2022.07.002>
- Nevedomskaya, E., Baumgart, S. J., & Haendler, B. (2018). Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 1359, 19(5), 1359. <https://doi.org/10.3390/IJMS19051359>
- Neves, A. F., Dias-Oliveira, J. D. D., Araújo, T. G., Marangoni, K., & Goulart, L. R. (2013a). Prostate cancer antigen 3 (PCA3) RNA detection in blood and tissue samples for prostate cancer diagnosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(4), 881–887. <https://doi.org/10.1515/CCLM-2012-0392/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Neves, A. F., Dias-Oliveira, J. D. D., Araújo, T. G., Marangoni, K., & Goulart, L. R. (2013b). Prostate cancer antigen 3 (PCA3) RNA detection in blood and tissue samples for prostate cancer diagnosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(4), 881–887. <https://doi.org/10.1515/CCLM-2012-0392/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Nicora, G., Vitali, F., Dagliati, A., Geifman, N., & Bellazzi, R. (2020). Integrated Multi-Omics Analyses in Oncology: A Review of Machine Learning Methods and Tools. *Frontiers in Oncology*, 10, 1030. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01030/BIBTEX>
- Nieto, C. M., Rider, L. C., & Cramer, S. D. (2014). Influence of stromal–epithelial interactions on androgen action. *Endocrine-Related Cancer*, 21(4), T147–T160. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0138>
- Nixon, A. E., Sexton, D. J., & Ladner, R. C. (2014). Drugs derived from phage display. *MAbs*, 6(1), 73–85. <https://doi.org/10.4161/mabs.27240>
- Ogienko, A. A., Andreyeva, E. N., Omelina, E. S., Oshchepkova, A. L., & Pindyurin, A. v. (2020). Molecular and cytological analysis of widely-used Gal4 driver lines for Drosophila neurobiology. *BMC Genetics*, 21(Suppl 1), 96. <https://doi.org/10.1186/S12863-020-00895-7>

- O’Kane, C. J. (2011). *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 7(1), 37–60.
https://doi.org/10.1007/7854_2010_110/COVER
- Oliveira, B. S. A. de, de Assis, A. C. C., Souza, N. M., Ferreira, L. F. R., Soriano, R. N., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2021). Nanotherapeutic approach to tackle chemotherapeutic resistance of cancer stem cells. *Life Sciences*, 279, 119667. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119667>
- Organs | droso4schools*. (n.d.). Retrieved November 1, 2022, from
<https://droso4schools.wordpress.com/organs/>
- Overk, C. R., & Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer’s disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 508–516.
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2014.01.015>
- Ownby, R. L., Crocco, E., Acevedo, A., John, V., & Loewenstein, D. (2006). Depression and Risk for Alzheimer Disease: Systematic Review, Meta-analysis, and Metaregression Analysis. *Archives of General Psychiatry*, 63(5), 530–538. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.63.5.530>
- Pan, L., He, Q., Wu, Y., Zhang, N., Cai, H., Yang, B., Wang, Y., Li, Y., & Wu, X. (2022). Synthesis, radiolabeling, and evaluation of a potent β -site APP cleaving enzyme (BACE1) inhibitor for PET imaging of BACE1 in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 59, 128543.
<https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2022.128543>
- Paroni, G., Bisceglia, P., & Seripa, D. (2019). Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, 68(2), 493–510. <https://doi.org/10.3233/JAD-180802>
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., & Pearson, H. A. (2003). The Production of Amyloid β Peptide Is a Critical Requirement for the Viability of Central Neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5531–5535. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05531.2003>
- Ploussard, G., Haese, A., van Poppel, H., Marberger, M., Stenzl, A., Mulders, P. F. A., Huland, H., Bastien, L., Abbou, C. C., Remzi, M., Tinzl, M., Feyerabend, S., Stillebroer, A. B., van Gils, M. P. M. Q., Schalken, J. A., & de La Taille, A. (2010). The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU International*, 106(8), 1143–1147. <https://doi.org/10.1111/J.1464-410X.2010.09286.X>
- Porsteinsson, A. P., Isaacson, R. S., Knox, S., Sabbagh, M. N., & Rubino, I. (2021). Diagnosis of Early Alzheimer’s Disease: Clinical Practice in 2021. *Journal of Prevention of Alzheimer’s Disease*, 8(3), 371–386. <https://doi.org/10.14283/JPAD.2021.23/TABLES/2>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, 7(1), 1–27.
<https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Ricciarelli, R., & Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer’s Disease: It’s Time to Change Our Mind. *Current Neuropharmacology*, 15(6).
<https://doi.org/10.2174/1570159X15666170116143743>

- Rigau, M., Ortega, I., Mir, M. C., Ballesteros, C., Garcia, M., Llauredó, M., Colás, E., Pedrola, N., Montes, M., Sequeiros, T., Ertekin, T., Majem, B., Planas, J., Ruiz, A., Abal, M., Sánchez, A., Morote, J., Reventós, J., & Doll, A. (2011). A Three-Gene panel on urine increases PSA specificity in the detection of prostate cancer. *The Prostate*, 71(16), 1736–1745. <https://doi.org/10.1002/PROS.21390>
- Rodrigues, T. S., & <http://lattes.cnpq.br/5086533831523196>. (2021). *Análise do secretoma de bactérias isoladas do alimento de larvas de abelhas brasileiras sem ferrão em Drosophila melanogaster modelo para Doença de Alzheimer*. <https://doi.org/10.14393/UFU.TE.2021.5514>
- Rodriguez-Calero, A., Gallon, J., Akhoundova, D., Maletti, S., Ferguson, A., Cyrta, J., Amstutz, U., Garofoli, A., Paradiso, V., Tomlins, S. A., Hewer, E., Genitsch, V., Fleischmann, A., Vassella, E., Rushing, E. J., Grobholz, R., Fischer, I., Jochum, W., Cathomas, G., ... Rubin, M. A. (2022). Alterations in homologous recombination repair genes in prostate cancer brain metastases. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30003-5>
- Roobol, M. J., Schröder, F. H., van Leeuwen, P., Wolters, T., van den Bergh, R. C. N., van Leenders, G. J. L. H., & Hessels, D. (2010). Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *European Urology*, 58(4), 475–481. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2010.06.039>
- Ruffion, A., Devonec, M., Champetier, D., Decaussin-Petrucci, M., Rodriguez-Lafrasse, C., Paparel, P., Perrin, P., & Vlaeminck-Guillem, V. (2013). PCA3 and PCA3-Based Nomograms Improve Diagnostic Accuracy in Patients Undergoing First Prostate Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17767. <https://doi.org/10.3390/IJMS140917767>
- Salagierski, M., & Schalken, J. A. (2012). Molecular diagnosis of prostate cancer: PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion. *The Journal of Urology*, 187(3), 795–801. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2011.10.133>
- Salameh, A., Lee, A. K., Cardó-Vila, M., Nunes, D. N., Efstathiou, E., Staquicini, F. I., Dobroff, A. S., Marchiò, S., Navone, N. M., Hosoya, H., Lauer, R. C., Wen, S., Salmeron, C. C., Hoang, A., Newsham, I., Lima, L. A., Carraro, D. M., Oliviero, S., Kolonin, M. G., ... Arap, W. (2015). PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), 8403–8408. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507882112>
- Salem, S., Salahi, M., Mohseni, M., Ahmadi, H., Mehraei, A., Jahani, Y., & Pourmand, G. (2011). Major dietary factors and prostate cancer risk: A prospective multicenter Case-Control Study. *Nutrition and Cancer*, 63(1), 21–27. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.516875>
- Sartori, D. A., & Chan, D. W. (2014). Biomarkers in prostate cancer: what's new? *Current Opinion in Oncology*, 26(3), 259. <https://doi.org/10.1097/CCO.000000000000065>
- Saw, P. E., & Song, E. W. (2019). Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein & Cell* 2019 10:11, 10(11), 787–807. <https://doi.org/10.1007/S13238-019-0639-7>

- Sawada, T. (2017). Filamentous virus-based soft materials based on controlled assembly through liquid crystalline formation. *Polymer Journal* 2017 49:9, 49(9), 639–647. <https://doi.org/10.1038/pj.2017.35>
- Schalken, J. A., Hessels, D., & Verhaegh, G. (2003). New targets for therapy in prostate cancer: Differential display code 3 (DD3PCA3), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*, 62(5 SUPPL. 1), 34–43. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(03\)00759-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(03)00759-3)
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, 81(2), 741–766. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.2.741>
- Selman, S. H. (2011). The McNeal Prostate: A Review. *Urology*, 78(6), 1224–1228. <https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2011.07.1395>
- Shahani, N., & Brandt, R. (2002). Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2002 59:10, 59(10), 1668–1680. <https://doi.org/10.1007/PL00012495>
- Shahzad, U., Taccone, M. S., Kumar, S. A., Okura, H., Krumholtz, S., Ishida, J., Mine, C., Gouveia, K., Edgar, J., Smith, C., Hayes, M., Huang, X., Derry, W. B., Taylor, M. D., & Rutka, J. T. (2021). Modeling human brain tumors in flies, worms, and zebrafish: From proof of principle to novel therapeutic targets. *Neuro-Oncology*, 23(5), 718–731. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAA306>
- Smid, M., Wilting, S. M., & Martens, J. W. M. (2022). Lost by Transcription: Fork Failures, Elevated Expression, and Clinical Consequences Related to Deletions in Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 5080, 23(9), 5080. <https://doi.org/10.3390/IJMS23095080>
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Sochocka, M., Zwolińska, K., & Leszek, J. (2017). The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 15(7). <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170313122937>
- Srougi, M., Ribeiro, L. A., Piovesan, A. C., Colombo, J. R., & Nesrallah, A. (2008). Doenças da próstata. *Revista de Medicina*, 87(3), 166–177. <https://doi.org/10.11606/ISSN.1679-9836.V87I3P166-177>
- Sugimura, T., & Ushijima, T. (2000). Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutation Research*.
- Sun, C., Yang, D., Zhu, J., Zhou, Y., Xiang, C., & Wu, S. (2022). Modified the 8th AJCC staging system for patients with advanced prostate cancer: a study based on SEER database. *BMC Urology* 2022 22:1, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12894-022-01135-Z>
- Tabaton, M., & Piccini, A. (2005). Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 86(3), 139–145. <https://doi.org/10.1111/J.0959-9673.2005.00428.X>

- Tcw, J., & Goate, A. M. (2017). Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(6), a024539. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A024539>
- Thal, D. R., & Fändrich, M. (2015). Protein aggregation in Alzheimer's disease: A β and τ and their potential roles in the pathogenesis of AD. *Acta Neuropathologica*, 129(2), 163–165. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1387-2>
- Thorek, D. L. J., Evans, M. J., Carlsson, S. v., Ulmert, D., & Lilja, H. (2013). Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(3), 484–492. <https://doi.org/10.1160/TH13-04-0275/ID/JR0275-11>
- Tipos de câncer de próstata: quais as principais diferenças - Oncocenter*. (n.d.). Retrieved November 3, 2022, from <https://oncocentermedicos.com.br/tipos-de-cancer-de-prostata-quais-as-principais-diferencas/>
- Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). Review
The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 2015(1), 68–77. <https://doi.org/10.5114/WO.2014.47136>
- Tomlins, S. A., Day, J. R., Lonigro, R. J., Hovelson, D. H., Siddiqui, J., Kunju, L. P., Dunn, R. L., Meyer, S., Hodge, P., Groskopf, J., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2016). Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *European Urology*, 70(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2015.04.039>
- Toro-Domínguez, D., Martorell-Marugán, J., López-Domínguez, R., García-Moreno, A., González-Rumayor, V., Alarcón-Riquelme, M. E., & Carmona-Sáez, P. (2019). ImaGEO: integrative gene expression meta-analysis from GEO database. *Bioinformatics*, 35(5), 880–882. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY721>
- Tosoian, J. J., Loeb, S., Kettermann, A., Landis, P., Elliot, D. J., Epstein, J. I., Partin, A. W., Carter, H. B., & Sokoll, L. J. (2010). Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. *The Journal of Urology*, 183(2), 534–538. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2009.10.003>
- van den Bergh, R. C. N., Loeb, S., & Roobol, M. J. (2015). Impact of Early Diagnosis of Prostate Cancer on Survival Outcomes. *European Urology Focus*, 1(2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/J.EUF.2015.01.002>
- van Poppel, H., Haese, A., Graefen, M., de La Taille, A., Irani, J., de Reijke, T., Remzi, M., & Marberger, M. (2012). The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU International*, 109(3), 360–366. <https://doi.org/10.1111/J.1464-410X.2011.10377.X>
- Venkatasubramanian, L., & Mann, R. S. (2019). The development and assembly of the Drosophila adult ventral nerve cord. *Current Opinion in Neurobiology*, 56, 135–143. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2019.01.013>
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology* 2016 13:7, 13(7), 379–386. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>

- Virgo, K. S., Basch, E., Andrew Loblaw, D., Oliver, T. K., Rumble, R. B., Carducci, M. A., Nordquist, L., Taplin, M. E., Winkquist, E., & Singer, E. A. (2017). Second-line hormonal therapy for men with chemotherapy-naïve, castration-resistant prostate cancer: American society of clinical oncology provisional clinical opinion. *Journal of Clinical Oncology*, 35(17), 1952–1964. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.8030>
- Wang, B.-R. ;, Chen, Y.-A. ;, Kao, W.-H. ;, Lai, C.-H. ;, Lin, H. ;, Hsieh, J., Mishra, M. K., Wang, B.-R., Chen, Y.-A., Kao, W.-H., Lai, C.-H., Lin, H., & Hsieh, J.-T. (2022). Developing New Treatment Options for Castration-Resistant Prostate Cancer and Recurrent Disease. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 1872, 10(8), 1872. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10081872>
- Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1041–1048. <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>
- Wang, Y., Zhu, J., Jia, W., Xiong, H., Qiu, W., Xu, R., & Lin, Y. (2022). BACE1 Aptamer-Modified Tetrahedral Framework Nucleic Acid to Treat Alzheimer's Disease in an APP-PS1 Animal Model. *ACS Applied Materials & Interfaces*. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.2C14626/SUPPL_FILE/AM2C14626_SI_001.PDF
- Wang, Z., Jensen, M. A., & Zenklusen, J. C. (2016). A practical guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Methods in Molecular Biology*, 1418, 111–141. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_6/COVER
- Wong, M. C. S., Goggins, W. B., Wang, H. H. X., Fung, F. D. H., Leung, C., Wong, S. Y. S., Ng, C. F., & Sung, J. J. Y. (2016). Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *European Urology*, 70(5), 862–874. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2016.05.043>
- Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3), 319–329. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
- Yap, T. A., Smith, A. D., Ferraldeschi, R., Al-Lazikani, B., Workman, P., & de Bono, J. S. (2016). Drug discovery in advanced prostate cancer: translating biology into therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2016 15:10, 15(10), 699–718. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.120>
- Zhao, L., Woody, S. K., & Chhibber, A. (2015). Estrogen receptor β in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics. *Ageing Research Reviews*, 24, 178–190. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2015.08.001>
- Zhou, W., Chen, Z., Hu, W., Shen, M., Zhang, X., Li, C., Wen, Z., Wu, X., Hu, Y., Zhang, X., Duan, X., Han, X., & Tao, Z. (2011). Association of Short Tandem Repeat Polymorphism in the Promoter of Prostate Cancer Antigen 3 Gene with the Risk of Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 6(5), e20378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020378>
- Zou, K., Kim, D., Kakio, A., Byun, K., Gong, J. S., Kim, J., Kim, M., Sawamura, N., Nishimoto, S. I., Matsuzaki, K., Lee, B., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2003). Amyloid β -protein (A β)1–40 protects neurons from damage induced by A β 1–42 in culture and in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 87(3), 609–619. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2003.02018.X>

Capítulo II

Artigo Científico 1

ARHGAP21-mediated regulation of *PCA3* in prostate cancer cells

Para esclarecimento, a figura 1 e a tabela 2 deste artigo pertence aos resultados apresentados no TCC do autor, mas para fins de melhor compreensão do trabalho como um todo, e por compor o artigo submetido à revista **Applied Biochemistry and Biotechnology**, além do fato de estes dados não estarem disponíveis para visualização em citação direta (TCC não foi publicado online), tais informações foram incorporadas ao artigo. O *biopanning* dos bacteriófagos confrontados com a região promotora do *PCA3* também foi apresentado no TCC do autor.

Title: ARHGAP21-mediated regulation of *PC43* in prostate cancer cells

Authorship:

Douglas Alexsander Alves^{a,b}, Adriana Freitas Neves^c, Lara Vecchi^b, Tafarel Andrade Souza^b, Emília Rezende Vaz^b, Sara Teixeira Soares Mota^{a,b}, Nilson Nicolau-Junior^d, Luiz Ricardo Goulart^{b,e}, Thaise Gonçalves Araújo^{a,b,*}

Affiliation:

^aLaboratory of Genetics and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Patos de Minas-MG, Brazil; (D.A.A. ORCID:0000-0001-9330-1045; S.T.S.M. ORCID: 0000-0002-2225-4496; T.G.A. ORCID: 0000-0002-7593-1403)

^bLaboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Institute of Biotechnology, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil; (L.V. ORCID: 0000-0001-8147-0060; T.A.S. ORCID:0000-0001-6281-1093; E.R.V. ORCID: 0000-0003-1733-9812; L.R.G. ORCID: 0000-0002-1803-4861)

^cLaboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Goiás-GO, Brazil; (A.F.N. ORCID:0000-0002-2299-2114)

^dLaboratory of Molecular Modeling, Biotechnology Institute, Universidade Federal de Uberlândia-MG, Brazil; (N.N.J. ORCID: 0000-0002-7148-5813)

^eUniversity of California Davis, Dept. of Medical Microbiology and Immunology, Davis, CA, USA.

***Corresponding author:** Thaise G. Araújo, Laboratory of Genetics and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Major Jerônimo, 566, Sala 601, 38700-002, Patos de Minas, MG, Brazil. Phone: +55 34 38142027. tgaraujo@ufu.br.

Acknowledgments

The authors would like to thank the financial support by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology - INCT – Teranano. The authors are immensely grateful for all the support and dedication of Luiz Ricardo Goulart, PhD, who have died due to COVID19. Brazilian and world science are losing a great scientist.

Abstract

The overexpression of the prostate cancer antigen 3 (*PCA3*) gene is well defined as a marker for Prostate Cancer (PCa) diagnosis. Although widely used in clinical research, *PCA3* molecular mechanisms remain unknown. Herein we used Phage Display technology to identify putative molecules that bind to the promoter region of *PCA3* and regulate its expression. The most frequent peptide PCA3p1 (80%) was similar to the Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21) and its binding affinity was confirmed using Phage Bead ELISA. We showed that ARHGAP21 silencing in LNCaP prostate cancer cells decreased *PCA3* and Androgen receptor (*AR*) transcriptional levels and increased Prune homolog 2 coding (*PRUNE2*) gene expression. Supporting our findings, chromatin immunoprecipitation assay confirmed the interaction between *PCA3* promoter region and ARHGAP21, which was modelled by docking analyses. This is the first study that describes the role of ARHGAP21 in regulating *PCA3*, standing out as a unique mechanism for the molecular control of PCa.

Keywords: *PCA3*, Phage Display, Prostate Cancer, promoter region

References

1. WCRF (2021) Prostate cancer statistics | World Cancer Research Fund International. <https://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>. Accessed 18 Jan 2021
2. Carlsson S V., Vickers AJ (2020) Screening for Prostate Cancer. *Medical Clinics of North America* 104:1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.08.007>
3. Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW, et al (1999) DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 59:5975–5979. <https://doi.org/10.1038/ncb2161>
4. Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, et al (2009) Prostate Cancer Gene 3 (PCA3): Development and Internal Validation of a Novel Biopsy Nomogram. *Eur Urol* 56:659–668. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.03.029>
5. Gittelman MC, Hertzman B, Bailen J, et al (2013) PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: A prospective multicenter clinical study. *Journal of Urology* 190:64–69. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.02.018>
6. Hessels D, Klein Gunnewiek JMT, Van Oort I, et al (2003) DD3PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 44:8–16. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(03\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00201-X)
7. Kim JH, Hong SK (2021) Clinical utility of current biomarkers for prostate cancer detection. *Investig Clin Urol* 62:1–13
8. Lee GL, Dobi A, Srivastava S (2011) Prostate cancer: Diagnostic performance of the PCA3 urine test. *Nat Rev Urol* 8:123–124
9. Mao Z, Ji A, Yang K, et al (2018) Diagnostic performance of PCA3 and hK2 in combination with serum PSA for prostate cancer. *Medicine (United States)* 97:. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012806>
10. Sokoll LJ, Ellis W, Lange P, et al (2008) A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: Pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clinica Chimica Acta* 389:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.11.003>
11. Ploussard G, de la Taille A (2018) The role of prostate cancer antigen 3 (PCA3) in prostate cancer detection. *Expert Rev Anticancer Ther* 18:1013–1020
12. Schalken JA (2014) Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review. *Clin Biochem* 47:889–896
13. Neves AF, Dias-Oliveira JDD, Araújo TG, et al (2013) Prostate cancer antigen 3 (PCA3) RNA detection in blood and tissue samples for prostate cancer diagnosis. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 51:881–7. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0392>
14. Wang K, Zhao H, Wang W, et al (2020) Effect of upregulation of DD3 on early detection and prognosis in prostate cancer. *Transl Androl Urol* 9:1550–1558. <https://doi.org/10.21037/tau-19-899>

15. Kohaar I, Chen Y, Banerjee S, et al (2021) A Urine Exosome Gene Expression Panel Distinguishes between Indolent and Aggressive Prostate Cancers at Biopsy. *Journal of Urology* 205:420–425. <https://doi.org/10.1097/ju.0000000000001374>
16. Marangoni K, Neves AF, Rocha RM, et al (2015) Prostate-specific RNA aptamer: Promising nucleic acid antibody-like cancer detection. *Sci Rep* 5:12090. <https://doi.org/10.1038/srep12090>
17. Lemos AEG, da Rocha Matos A, Ferreira LB, Gimba ERP (2019) The long non-coding RNA PCA3: An update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. *Oncotarget* 10:6589–6603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27284>
18. Salameh A, Lee AK, Cardó-Vila M, et al (2015) PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8403–8408. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507882112>
19. Clarke RA, Zhao Z, Guo AY, et al (2009) New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: Implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One* 4:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004995>
20. Zhou W, Chen Z, Hu W, et al (2011) Association of Short Tandem Repeat Polymorphism in the Promoter of Prostate Cancer Antigen 3 Gene with the Risk of Prostate Cancer. *PLoS One* 6:e20378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020378>
21. Ferreira LB, Palumbo A, de Mello KD, et al (2012) PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer* 12:. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-507>
22. Lemos AEG, Ferreira LB, Batoreu NM, et al (2016) PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumor Biology* 37:11339–11348. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5012-3>
23. Lázaro-Silva DN, De Mattos JCP, Castro HC, et al (2015) The Use of DNA Extraction for Molecular Biology and Biotechnology Training: A Practical and Alternative Approach. *Creat Educ* 06:762–772. <https://doi.org/10.4236/ce.2015.68079>
24. Barbas CF et al (2001) *Phage Display: a laboratory manual*
25. Mota STS, Vecchi L, Alves DA, et al (2020) Annexin A1 promotes the nuclear localization of the epidermal growth factor receptor in castration-resistant prostate cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 127:. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105838>
26. Neves AF, Araújo TG, Biase WKFS, et al (2008) Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis. *Clin Biochem* 41:1191–1198. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2008.06.013>
27. Ambrish Roy AK, & Yang Zhang (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:1–14
28. Yang J, Yan R, Roy A, et al (2014) The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12:7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
29. Yang J, Zhang Y (2015) I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* 43:W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>

30. Lamiable A, Thévenet P, Rey J, et al (2016) PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res* 44:W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>
31. Colovos C, Yeates TO (1993) Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* 2:1511–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>
32. Pontius J, Richelle J, Wodak SJ (1996) Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J Mol Biol* 264:121–136. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0628>
33. Anderson RJ, Weng Z, Campbell RK, Jiang X (2005) Main-chain conformational tendencies of amino acids. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 60:679–689. <https://doi.org/10.1002/prot.20530>
34. Neves AF, Araújo TG, Biase WKFS, et al (2008) Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis. *Clin Biochem* 41:1191–1198. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.06.013>
35. McKillop C (2006) Interview with Jack Schalken. PCA3 and its Use as a Diagnostic Test in Prostate Cancer. *Eur Urol* 50:153–154
36. Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629–635. <https://doi.org/10.1038/nature01148>
37. Li Y, Zeng B, Li Y, et al (2019) Downregulated expression of ARHGAP10 correlates with advanced stage and high Ki-67 index in breast cancer. *PeerJ* 2019:e7431. <https://doi.org/10.7717/peerj.7431>
38. Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: Turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587–1609. <https://doi.org/10.1101/gad.1003302>
39. Verhaegh GW, Van Bokhoven A, Smit F, et al (2000) Isolation and characterization of the promoter of the human prostate cancer-specific DD3 gene. *Journal of Biological Chemistry* 275:37496–37503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006293200>
40. Lazarini M, Traina F, Machado-Neto JA, et al (2013) ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1832:365–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.010>
41. Farfán N, Ocarez N, Castellón EA, et al (2018) The transcriptional factor ZEB1 represses Syndecan 1 expression in prostate cancer. *Sci Rep* 8:11467. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29829-1>
42. Arámbula-Meraz E, Bergez-Hernández F, Leal-León E, et al (2020) Expression of miR-148b-3p is correlated with overexpression of biomarkers in prostate cancer. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0330>
43. He JH, Li BX, Han ZP, et al (2016) Snail-activated long non-coding RNA PCA3 up-regulates PRKD3 expression by miR-1261 sponging, thereby promotes invasion and migration of prostate cancer cells. *Tumor Biology* 37:16163–16176. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5450-y>

44. Ménétrey J, Perderiset M, Cicolari J, et al (2007) Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes. *EMBO Journal* 26:1953–1962. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601634>
45. Doyle DA, Lee A, Lewis J, et al (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein- binding domain: Molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85:1067–1076
46. Rosa LRO, Soares GM, Silveira LR, et al (2018) ARHGAP21 as a master regulator of multiple cellular processes. *J Cell Physiol* 233:8477–8481. <https://doi.org/10.1002/jcp.26829>
47. Lu S, Wang J, Chitsaz F, et al (2020) CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res* 48:D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
48. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, et al (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* 389:758–762. <https://doi.org/10.1038/39651>
49. Carles A, Millon R, Cromer A, et al (2006) Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display. *Oncogene* 25:1821–1831. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209203>
50. Katoh M, Katoh M (2004) Characterization of human ARHGAP10 gene in silico. *Int J Oncol* 25:1201–1206. <https://doi.org/10.3892/ijo.25.4.1201>

Statements and Declarations

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq); the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author Contributions

Conceptualization: Douglas Alexsander Alves (D.A.A.), Adriana Freitas Neves (A.F.N.), Thaise Gonçalves de Araújo (T.G.A); Methodology: D.A.A., Emília Resende Vaz (E.R.V.), Sara Teixeira Soares Mota (S.T.S.M.), Lara Vecchi (L.V.), Tafarel Andrade Souza (T.A.S.) and Nilson Nicolau-Júnior (N.N.J); Investigation: D.A.A., and T.G.A.; Formal analysis: D.A.A., L.V., and T.G.A.; Writing-original draft preparation, D.A.A.; Writing-review and editing, D.A.A., L.V., and T.G.A.; Supervision: Luiz Ricardo Goulart (L.R.G.) and T.G.A.; Funding acquisition, L.R.G.; T.G.A.. All authors read and approved the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This study was conducted in the Laboratory of Nanotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho of the Universidade Federal de Uberlândia (UFU) upon approval by the Ethics Committee in Research (CEP 005/2001) in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 2013. The recruitment of participants was carried out by the urology service of the Clinical Hospital of UFU. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Consent to participate

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study

Consent for publication

All the authors consent to publish.

Capítulo III

Artigo Científico 2

**Título: Programmed cell death 7 (PDCD7) e suas
implicações no câncer de próstata**

ARTIGO PDCD7

Título: *Programmed cell death 7* (PDCD7) e suas implicações no câncer de próstata

Resumo

O *Programmed cell death 7* (PDCD7) é uma proteína reguladora de apoptose e *splicing*, capaz de se ligar a miRNAs e lncRNAs, sendo associada a diferentes tumores. Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa selecionou peptídeo mimético a PDCD7 ligante à região promotora do *PCA3*, evidenciando sua correlação com o câncer de próstata (CaP). Aqui, foi investigado o papel diagnóstico e/ou prognóstico de *PDCD7* e preditos os miRNAs ligantes ao seu transcrito e ao do *PCA3*. Além disso, as vias reguladas por *PDCD7* em linhagem LNCaP (CaP hormônio-dependente) também foram analisadas. Foram utilizados os dados disponíveis no TCGA e GEO para os transcritos de *PDCD7* em tecido com CaP e tecido não-tumoral adjacente de modo que sua expressão foi superior em tecido não tumoral. Interessantemente, ao compararmos a doença inicial e o estágio de CaP resistente à castração, a expressão de *PDCD7* aumentou com o avanço da doença e em pacientes com recidiva. Por meio dos programas miRBASE, miRANDA e RNAhybrid foram identificados 40 miRNAs ligantes de *PDCD7* e *PCA3*, sendo oito capazes de diferenciar tecidos malignos de não malignos. Por fim, ensaios de silenciamento de *PDCD7* confirmaram sua relação com o gene *PCA3*, aumentando seus transcritos e diminuindo os de *PRUNE2*, *AR* e *CK18*, além de diminuir a expressão de 81 genes relacionados a diferentes vias oncogênicas. Nossos resultados iluminam uma nova e intrincada rede de regulação envolvendo os genes *PDCD7* e *PCA3* no CaP, além de identificar novos miRNAs com potencial diagnóstico, os quais precisam ser extensivamente estudados tanto do ponto de vista clínico quanto molecular.

Palavras-chave: *PDCD7*; Câncer de próstata; *PCA3*; CRPC; miRNA

1. INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP), responsável por aproximadamente 1,4 milhões de casos e 375,000 mortes associadas à doença em todo o mundo em 2020, é a segunda neoplasia mais comum em homens (GANDAGLIA *et al.*, 2021). Com o início silencioso e assintomático, o CaP é uma doença tipicamente dependente de androgênio e, portanto, responsiva à terapia hormonal. Porém, um número expressivo de pacientes desenvolve resistência a esse tratamento evoluindo para o CaP resistente a castração (CRPC). Estes são rotineiramente tratados com quimioterapia, hormonioterápicos de segunda linha e terapia-alvo. Eventualmente, o paciente também adquire resistência e se torna CaP resistente à terapia e à castração (t-CRPC), que é considerada uma doença em estágio terminal (GRAVIS, 2019; VIRGO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2022).

O diagnóstico precoce do CaP é essencial para o sucesso terapêutico (FREITAS *et al.*, 2021; ICHAEI; ARRY, 2001), com sobrevida em cinco anos acima de 95% quando detectado nos estágios 1, 2 e 3 e de apenas 47,7% quando em estágio 4 (HAWKES, 2019). Além disso, a qualidade de vida do paciente é diretamente impactada pelo prognóstico da doença, de modo que o tratamento exige um esforço multidisciplinar que desafia a prática clínica.

A detecção do CaP envolve diferentes abordagens, incluindo o toque retal, exames de imagem, a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) e a biópsia do órgão. Apesar de suas limitações quanto à especificidade, o PSA é capaz de estimar a probabilidade da doença em paciente com biópsia anterior negativa, sendo, portanto, relevante também no acompanhamento do paciente (CASANOVA-SALAS *et al.*, 2021; KHOO *et al.*, 2021; LI, ZHUO *et al.*, 2021) (GUPTA *et al.*, 2010). Na urina, transcritos do gene *KLK3* (codificante para PSA) têm sido analisados conjuntamente com a expressão do RNA longo não-codificante *PCA3* (*Prostate Cancer Associated 3*) no teste Progens, gerando um *score* cujo valor preditivo e especificidade têm se destacado (DURAND *et al.*, 2014). Em seu estudo, Salami *et al.* demonstraram que a combinação dos níveis séricos de PSA com os transcritos de *PCA3* e da fusão *TMPRSS2:ERG* aumenta a segurança diagnóstica, com 90% de especificidade e 80% de sensibilidade (SALAMI *et al.*, 2013). Contudo, ainda há limitações quanto a identificação do CaP e, sobretudo, de melhor prognosticar a doença frente ao seu avanço para a antecipação de quadros mais graves e muitas

vezes irreversíveis de insensibilidade às terapias usuais (WANG *et al.*, 2022). Portanto, a descoberta de novos marcadores diagnósticos, prognósticos e/ou preditivos é essencial no direcionamento terapêutico e no desfecho clínico dos pacientes.

Primeiramente descrito como ES18 em camundongo, o PDCD7 (Programmed cell death 7) foi identificado em 1999 e caracterizado como uma proteína de 59kDa associada à apoptose, com expressão diferencial em células T (PARK *et al.*, 1999) e associada à pequena ribonucleoproteína nuclear (snRNP) U11 pertencente ao spliceossomo tipo U-12, portanto, responsável por processar introns de pré-mRNA tipo U12 (WILL *et al.*, 2004). Em tumores, sua superexpressão tem sido relacionada a leucemia mieloide aguda, sendo incluída como fator de risco e indicativo de pior prognóstico (ABO ELWAFA; GAMALELDIN; GHALLAB, 2019; TIAN *et al.*, 2014). Contudo, também tem sido descrito como supressor, uma vez que o seu silenciamento resultou em maiores níveis de metástase nodal do pescoço em ratos (PENG, SHIH YUAN *et al.*, 2018).

Recentemente, Ghafouri-Fard e colaboradores evidenciaram a relação entre proteínas da família das PDCDs e miRNAs e lncRNAs, principalmente no contexto de desenvolvimento e prognóstico de tumores (GHAFOURI-FARD; HUSSEN; *et al.*, 2022). Além disso, nosso grupo de pesquisa selecionou peptídeos miméticos ao PDCD7 ligantes ao gene *PCA3* (dados não publicados, apresentados no Capítulo II desta tese), sugerindo uma possível relação entre ambos os genes. No presente estudo objetivamos avaliar o perfil diagnóstico e prognóstico dos níveis transcricionais de *PDCD7* utilizando dados disponíveis no TCGA e GEO. Além disso, considerando sua regulação pós-transcricional, miRNAs ligantes ao PDCD7 foram preditos, assim como aqueles também ligantes ao *PCA3* identificando novos possíveis ncRNAs envolvidos com o CaP. Por fim, ensaios de silenciamento de *PDCD7* foram conduzidos na linhagem LNCaP para determinar seus efeitos sobre diferentes vias, incluindo a do *PCA3*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. TCGA e GEO

Os dados de expressão gênica foram obtidos a partir de arquivos de RNA-seq em sua versão 2 (Illumina Hi-Seq) disponíveis para tecidos tumorais (461

amostras) ou não-tumorais (tecidos pareados -51 amostras), do TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) acessado em agosto de 2022. A versão 2 fornece valores de expressão gênica para 20.532 genes referidos como GeneSymbol. Cada perfil de expressão gênica (contagem de tags por gene) foi normalizado para leituras por kilobase de exon por milhão de leituras de sequência mapeada (RPKM), de acordo com o tamanho do CDS e contagem de tags inteiras usando a fórmula $(10^9 * C)/(N * L)$, em que 10^9 é um fator de correção, C é o número de leituras que correspondem a um gene, N é o total de tags mapeáveis no experimento e L é o tamanho do CDS (MORTAZAVI *et al.*, 2008).

Os dados das amostras de CRPC foram baixados do banco de dados Gene Expression Omnibus - GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Barrett *et al.*, 2013; Edgar *et al.*, 2002) sob o código de acesso GSE80609, obtido através do estudo de Yun *et al.* que dividiu as amostras em HPB (7), CaP (16), CaP avançado (4) e CRPC (8), com normalização conduzidas pelos autores (YUN *et al.*, 2017). UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) foi utilizado para acessar os dados sobre a expressão de mi-RNAs de tecido de pacientes com CaP e tecido não-tumoral (pareados) do banco de dados de miRNA do TCGA (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2022).

2.2. Análises de miRNA

Para a identificação dos alvos de miRNA, 2.654 miRNAs humanos maduros do banco de dados miRBase 22.1 foram usados como moléculas de miRNAs, e as sequências PDCD7-201 3' UTR e cDNA completo de ENST00000644657.1 (*PCA3*) foram usados como alvo dos miRNAs putativos. Além disso, com o intuito de identificar os alvos, o software miRanda (<http://www.microrna.org/>) e o RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) foram usados. O software miRanda foi configurado com os seguintes parâmetros e condições: penalidade de abertura de gap de -8, penalidade de extensão de gap de -2; correspondência com limite de pontuação mínima 120, duplex do alvo com energia livre de limite máximo -15 kcal/mol, parâmetro de escalonamento três para pontuação de correspondência de nucleotídeo complementar, contando a partir da extremidade 5' do miRNA, e exigindo emparelhamento estrito 5' entre dois e nove nucleotídeos. O software RNAhybrid também foi usado para o mesmo propósito e foi configurado com

parâmetros padrão. Apenas os genes-alvo de miRNA encontrados em ambos os softwares foram considerados para análise posterior.

2.3 Cultivo celular

As células não-tumorais RWPE-1, as células tumorais prostáticas andrógeno-dependentes (LNCaP) e andrógeno-independentes (PC-3), foram obtidas e mantidas de acordo com recomendações da ATCC. O meio de cultivo RPMI 1640, (#31800022; Gibco™) foi usado para as linhagens LNCaP e PC-3. As células RWPE-1 foram mantidas com meio Keratinocyte SFM (serum-free medium; Thermo Fisher Scientific) com 5,0 ng/mL de fator de crescimento epidérmico EGF (epidermal growth factor; # PHG0313; Thermo Fisher Scientific) e 0,05 mg/mL de extrato de pituitária bovina (#13028014; Thermo Fisher Scientific). Todos os meios foram suplementados com antibiótico-antimicótico (Gibco™) 1X e 10% de soro fetal bovino FBS (fetal bovine serum; Thermo Fisher Scientific). A incubação aconteceu em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. As células foram mantidas até confluência de 80%, autenticadas por análises de STR e confirmadas como livres de micoplasma.

2.4 Silenciamento gênico, extração de RNA total e transcrição reversa

O silenciamento foi realizado utilizando um conjunto de 19 siRNAs preparados por endoribonucleases direcionados ao gene *PDCD7* humano (esiPDCD7; MISSION® esiRNA-SIGMA), e à proteína verde fluorescente (esiGFP; MISSION® esiRNA-SIGMA) como controle negativo. Células LNCaP (1x10⁶ células/poço) foram transfectadas com vesículas de lipofectamina (Lipofectamine 3000®-INVITROGEN) contendo 75pmol de MISSION esiPDCD7 ou esiGFP conforme as recomendações do fabricante. O RNA total foi extraído após 48h da transfecção. Para isso foi utilizado o reagente TRIZOL®, seguindo-se os passos estabelecidos pelo *datasheet* do fabricante.

A quantificação foi realizada em NanoDropND-100 (NanoDrop Technologies) no comprimento de 260nm e a razão 260 / 280nm foi considerada como parâmetro qualitativo. Além disso foi conduzida eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 1 hora a 100 volts, usando tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) para a observação do RNA extraído, corado com 0,5

X GelRed (1:500 - Uniscience) e visualizado por luz ultravioleta (sistema de documentação de vídeo ImageSystem - VDS, Amersham Biosciences). Em seguida, o material foi armazenado a -80°C para experimentos subsequentes. A transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando 1 μg do RNA total das células e o kit GoScript™ -Promega, seguindo todas as recomendações do fabricante.

2.5 qPCR e qPCR array

Os ensaios de qPCR foram conduzidos em termociclador ABI 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™). As reações foram preparadas com 1 μL of cDNA, 0,5 μM dos primers específicos direto e reverso, 5,0 μL do GoTaq mix, 0,2 μL de CXR, e água Nuclease-free para completar o volume para 10 μL . O gene *B2M*: Beta-2-Microglobulina (F 5'-CCTGCCGTGTGAACCATG-3'; R 5'-GCGGCATCTTCAAACCTC-3') foi utilizado como referência para a aplicação do método Cq comparativo.

Os primers utilizados foram o *PDCD7*: *Programmed cell death 7*, *PCA3*: *Prostate Cancer Associated 3* (F 5'- CGAGGGAGACCAGGAAGAT-3'; R 5'-ATCGATGACCCAAGATGGCG-3'), *AR*: *Androgen Receptor* (F 5'-GTGTAAGTTGCGGAAGCCAGG -3'; R 5'- CATGTGGAAGCTGCAAGGTCT -3') , *PRUNE2*: *Prune Homolog 2* (F 5'- GCTACCAGATGATTGACAGACGGT -3'; R 5'-GGGATCAGCCCACTGAGTTC -3'), *CK18*: *keratin 18* (F 5'-GAGGGCCAACAACACCTGC -3'; R 5'-GAGTGGTGAAGCTCATGCCC-3'), *PSA*: *Prostate-Specific Antigen* (F 5'- GTGTGTGGACCTCCATGTTA -3'; R 5'-AATAGGGGGTTGATAGGGGTGCT-3'), *ECAD/CDH1*: *cadherin 1* (F 5'-TCTTCTCTCAATTGGCAACTG-3'; R 5'TTTGGGTAACTTCATGACGA-3'). As reações foram incubadas a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 15s a 94°C , 30s à respectiva temperatura de anelamento, 30s a 72°C .

Para a análise das vias associadas à carcinogênese que pudessem ser modulados pelo silenciamento de *PDCD7* foi utilizado o ensaio customizado RT² Profiler™ PCR Array Human Cancer PathwayFinder™ (PAHS-033ZA; cat. no. 330231). O mRNA extraído das células LNCaP tratadas com esiGFP foi utilizado como controle. Os *arrays* foram incubados no termociclador ABI 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de

desnaturação a 95°C durante 15s e anelamento de primers a 60°C por 1 min. Foi adicionado o estágio de dissociação para análises dos parâmetros da PCR de 72°C por 10 min, assegurando a amplificação de um único amplicon. As análises dos dados foram conduzidas conforme descrito anteriormente por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.6 Síntese de peptídeo mimético e imunoensaio

Em estudo anterior do nosso grupo pesquisa (Capítulo II-Artigo 1) foi selecionado, por *Phage Display*, um peptídeo recombinante ligante à região promotora do gene *PCA3*, que, por predição *in silico*, se apresentou como mimético ao PDCD7. Este, então, foi sintetizado quimicamente pela empresa FastBio™ e denominado pepPDCD7.

Para avaliar sua capacidade diagnóstica por meio da detecção de autoanticorpos, foram conduzidos ensaios de ELISA com o soro de pacientes diagnosticados com CaP (n=22) e HPB (n=23). O projeto cumpriu com todas as exigências éticas, com aprovação Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CAAE 31178620.8.0000.5152) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e concordaram em participar da pesquisa.

No imunoensaio, placas de 96 poços foram sensibilizadas por 16 horas com 1µg/poço de pepPDCD7 diluído em tampão carbonato-bicarbonato (1M carbonato-1M bicarbonato pH 9,6). O bloqueio foi realizado com tampão fosfato-salino (PBS) 1X com albumina sérica bovina (BSA) 5% por 1 hora a 37°C. Após três lavagens PBS-Tween (T) 0,05%, foram adicionados os soros de pacientes com CaP e HPB diluídos 1:100 em tampão de bloqueio. A reação foi, então, incubada por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com PBS-T 0,05% e incubadas com anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase HRP (1:5000; G21234; Thermoscientific) diluído em tampão de bloqueio por 1 hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBS-T 0,05%, a reação foi revelada com OPD (*Ortho-phenylenediamine*) SigmaFast™ (Sigma-Aldrich) e lida no espectrofotômetro Multiskan GO® no comprimento de onda de 492nm.

2.7 Ensaio de citotoxicidade

Para analisar os efeitos do peptídeo pepPDCD7 sobre as células prostáticas RWPE-1, LNCaP e PC-3, como uma possível estratégia terapêutica, foram conduzidos ensaios de citotoxicidade por meio da redução do MTT ([3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide]). Placas de 96 poços foram semeadas com $2,4 \times 10^5$ células em cada poço (K12-096; Kasvi™) e, após confluência, foram tratadas com 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg e 100 µg de pepPDCD7 por 24 e 48h. Após esse período o MTT (5 mg MTT/ml em PBS 1X) foi adicionado com incubação de 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foi pipetada a solução de SDS (20% SDS, 50% dimetilformamida, 30% H₂O milliQ) para solubilização dos cristais e a placa mantida ao abrigo da luz por 16 horas. A absorbância foi, então, registrada em espectrofotômetro no comprimento de 570nm. Os valores de viabilidade, em porcentagem, foram obtidos pela seguinte fórmula:

$$[\text{Viabilidade (\%)} = [(\text{AbsControle})/(\text{AbsTratamento}) \times 100]$$

AbsControle = Absorbância mensurada nas células sem tratamento.

AbsTratamento = Absorbância mensurada nas células tratadas com o pepPDCD7.

2.8 Análises estatísticas

As análises foram conduzidas no software Graphpad Prism 8.0.2 (San Diego, CA, EUA). Foram realizados em triplicata e os dados apresentados como média ± desvio padrão (DP). A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi empregada para verificar diferenças entre as médias de grupos independentes, cujos dados estavam em distribuição normal pela análise de D'Agostino-Pearson omnibus. O teste t não pareado foi usado para avaliar as diferenças entre as médias entre dois grupos. O teste de Mann-Whitney foi realizado em comparações entre grupos para o ensaio de ELISA com 45 pacientes. A curva *Receiver operating characteristic* (ROC) e valores de área sob a curva (AUC) foram gerados para prever o potencial diagnóstico do peptídeo.

RESULTADOS

Para investigar a relação entre *PDCD7* e a ocorrência e desenvolvimento de CaP, os dados disponíveis publicamente no TCGA foram analisados (**Figura 1**). Verificou-se que é possível discriminar tecidos com CaP de controle não-tumoral (tecido adjacente não-tumoral) ($p < 0,001$) uma vez que a expressão de *PDCD7* diminui com a transformação maligna (**Figura 1a**) com AUC = 0,675 ($p < 0.0001$) (**Figura 1b**). Independente dos valores de PSA (**Figura 1c**) e do peso do órgão (**Figura 1d**), os transcritos de *PDCD7* diferiram apenas entre o tecido tumoral e o controle não tumoral adjacente, não indicando correlação com essas características no grupo de amostras malignas.

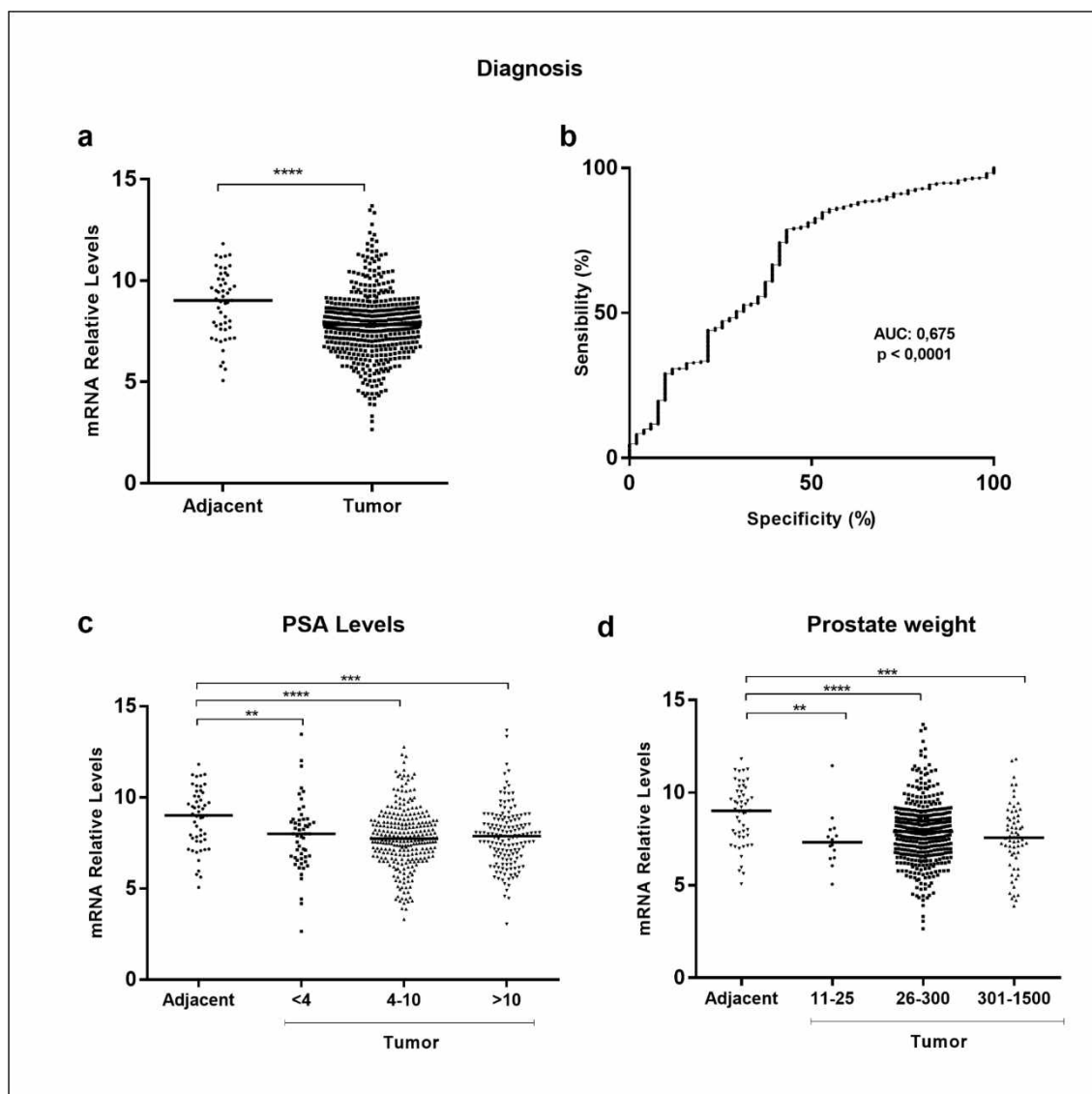


Figura 1: Análise da expressão do gene *PDCD7* em tecido de pacientes com câncer de próstata a partir dos dados disponíveis no TCGA. (a) Expressão relativa de *PDCD7* em tecidos malignos comparados ao tecido adjacente não-tumoral. (b) Curva ROC

(Receiver Operating Characteristic) para estimar o valor diagnóstico da expressão de *PDCD7*. (c) Níveis relativos de *PDCD7* em tecidos de pacientes estratificados pelos níveis séricos do Antígeno Prostático Específico (PSA). (d) Níveis relativos de *PDCD7* em tecido prostático estratificado conforme o peso do órgão. Dados normalizados por RPKM: *Reads per kilobase of exon per million*. AUC: Área sob a Curva. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, e **** $p < 0.0001$.

Para variáveis relacionadas ao prognóstico, a expressão de *PDCD7* foi analisada utilizando o TCGA e GEO (GSE80609). Para os dados do GEO foi utilizado um estudo em que os pacientes foram estratificados em CaP inicial, avançado e CRPC e os níveis dos transcritos de *PDCD7* foram maiores na doença refratária ($p < 0,01$) (**Figura 2**). Esses resultados sugerem que, durante o desenvolvimento da doença, os níveis de transcritos de *PDCD7* diminuem, mas se elevam com a progressão do tumor, sendo superiores no quadro mais grave de CaP (**Figura 2a**). Já os dados do TCGA demonstram que níveis elevados de *PDCD7* estão relacionados com um novo evento tumoral, sendo um indicador prognóstico (**Figura 2b**).

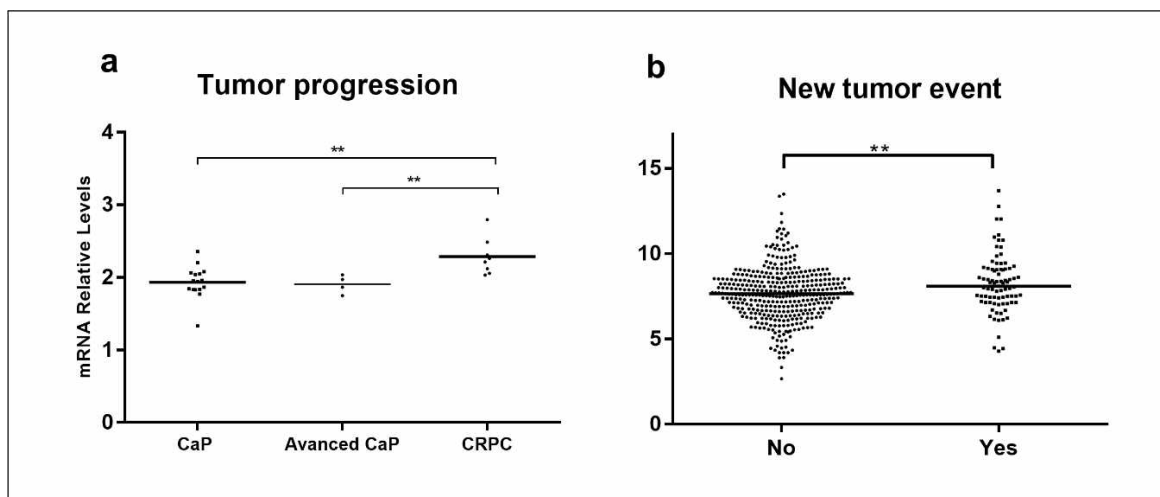


Figura 2: Expressão genica de *PDCD7* em tecidos tumorais a partir de (a) dados disponíveis no GEO (GSE80609), estratificados em cancer de prostata inicial (CaP), cancer de próstata avançado (Advanced CaP) e cancer de prostata resistente à castração (CRPC). (b) expressão genica de *PDCD7* em tecidos tumorais disponíveis no TCGA, estratificando pacientes que tiveram ou não um novo evento tumoral. Dados normalizados por FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped). ** $p < 0.01$.

Recentemente, Ghafouri-Fard et al revisaram RNAs não-codificantes capazes de regular diferentes membros da família dos PDCDs em desordens não-malignas e em tumores (GHAFOURI-FARD; HUSSEN; *et al.*, 2022). Nesse sentido, foi realizada a busca de possíveis miRNAs que possam interagir com *PDCD7*. Considerando que, em nosso estudo anterior, observamos uma possível relação de *PDCD7* como *PCA3* e como este é um lncRNA capaz de regular miRNAs, refinamos a pesquisa para miRNA que possam se ligar ambos os alvos, como um novo possível mecanismo de controle pós-transcricional no CaP. Do total de 351 miRNAs prospectados, 238 possuem estruturas que favorecem a interação com o gene *PCA3*, 113 passíveis de interação com *PDCD7* e 40 miRNAs poderiam se ligar/interagir de maneira termodinamicamente favorável a ambos os genes (**Figura 3**).

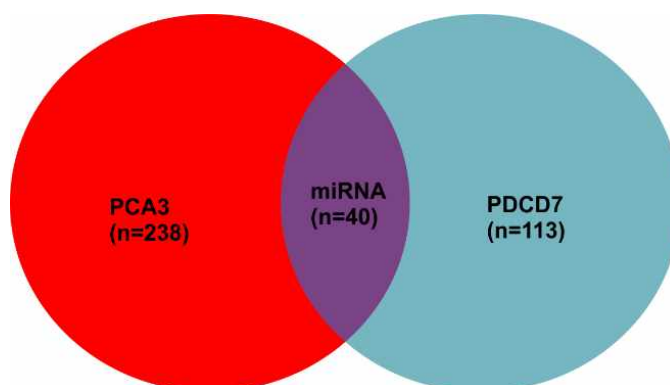


Figura 3: Representação gráfica do número total de miRNA preditos como ligantes do *PCA3* (n=238 miRNAs), *PDCD7* (n=113 miRNAs) e de ambos (interseção; n=40 miRNAs).

Em seguida, foi conduzida uma análise da expressão desses miRNAs em tecidos tumorais e não tumoral adjacente de pacientes com CaP, também utilizando o TCGA, via UALCAN. Dentre os 40 miRNAs passíveis de interação com *PCA3* e *PDCD7*, 8 tiveram expressão diferencial em tecido não tumoral e tumoral, correlacionando com o score de Gleason (**Figura 4 e Figura 5**).

Os miRNAs hsa-miR-1228-3p, hsa-miR-1343-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-186-3p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-362-3p, e hsa-miR-660-3p tiveram a sua expressão aumentada em CaP e em maiores escores de Gleason (≥ 7) (**Figura 4a-d e Figura 5-h**). Por outro lado, o miRNA hsa-miR-378a-5p foi o único que se apresentou menos expresso em pacientes com CaP, correlacionando-se negativamente com o escore de Gleason (**Figura 5g**).

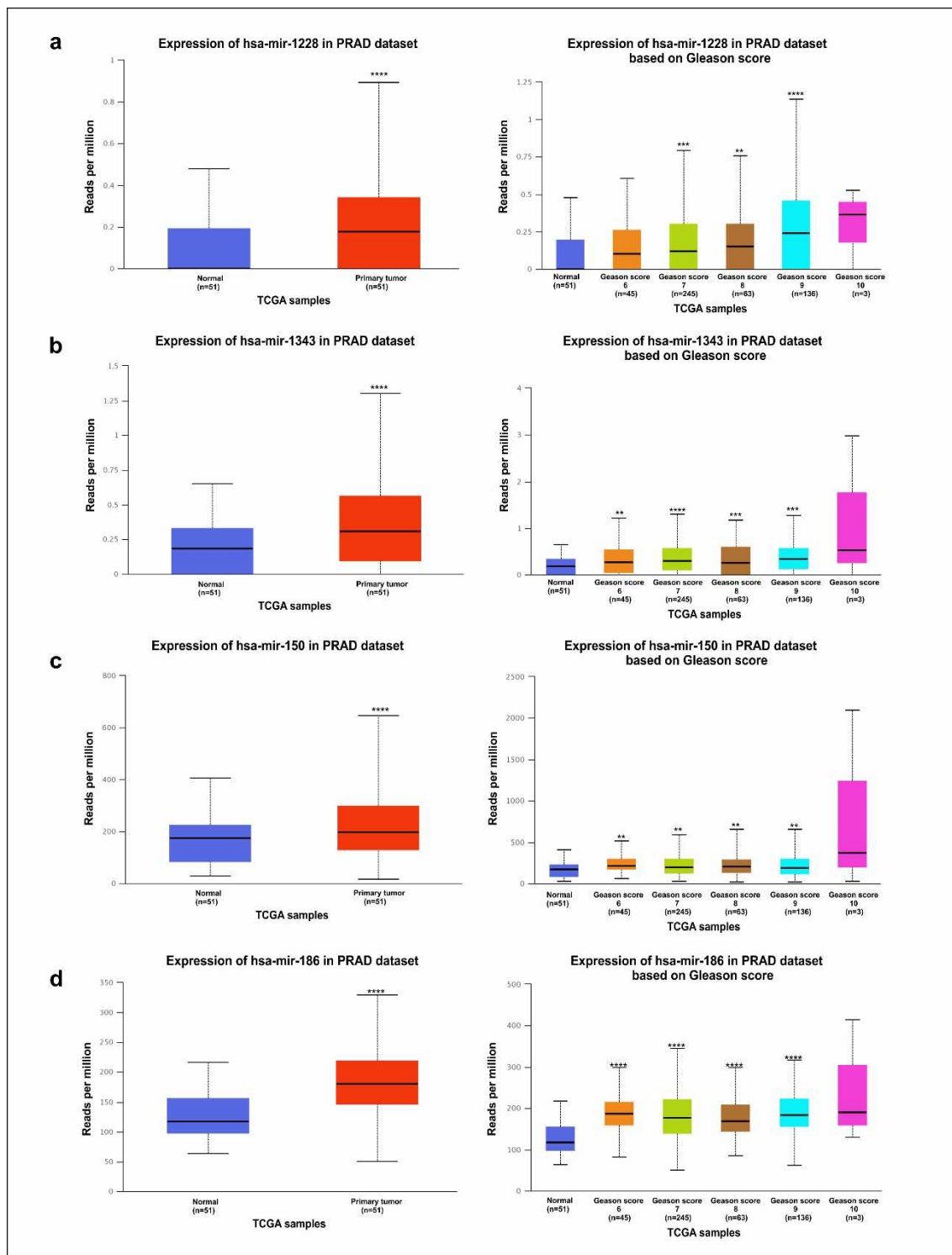


Figura 4: Expressão de mi-RNA, a partir de dados depositados no TCGA, preditos por bioinformática como ligantes de ambos *PCA3* e *PDCD7*, em tecido não tumoral comparado com tecido com câncer de próstata (PRAD). As amostras também foram subdivididas pelo escore de Gleason. (a) hsa-miR-1228-3p, (b) hsa-miR-1343-3p, (c) hsa-miR-150-5p e (d) hsa-miR-186-3p. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, e **** $p < 0.0001$.

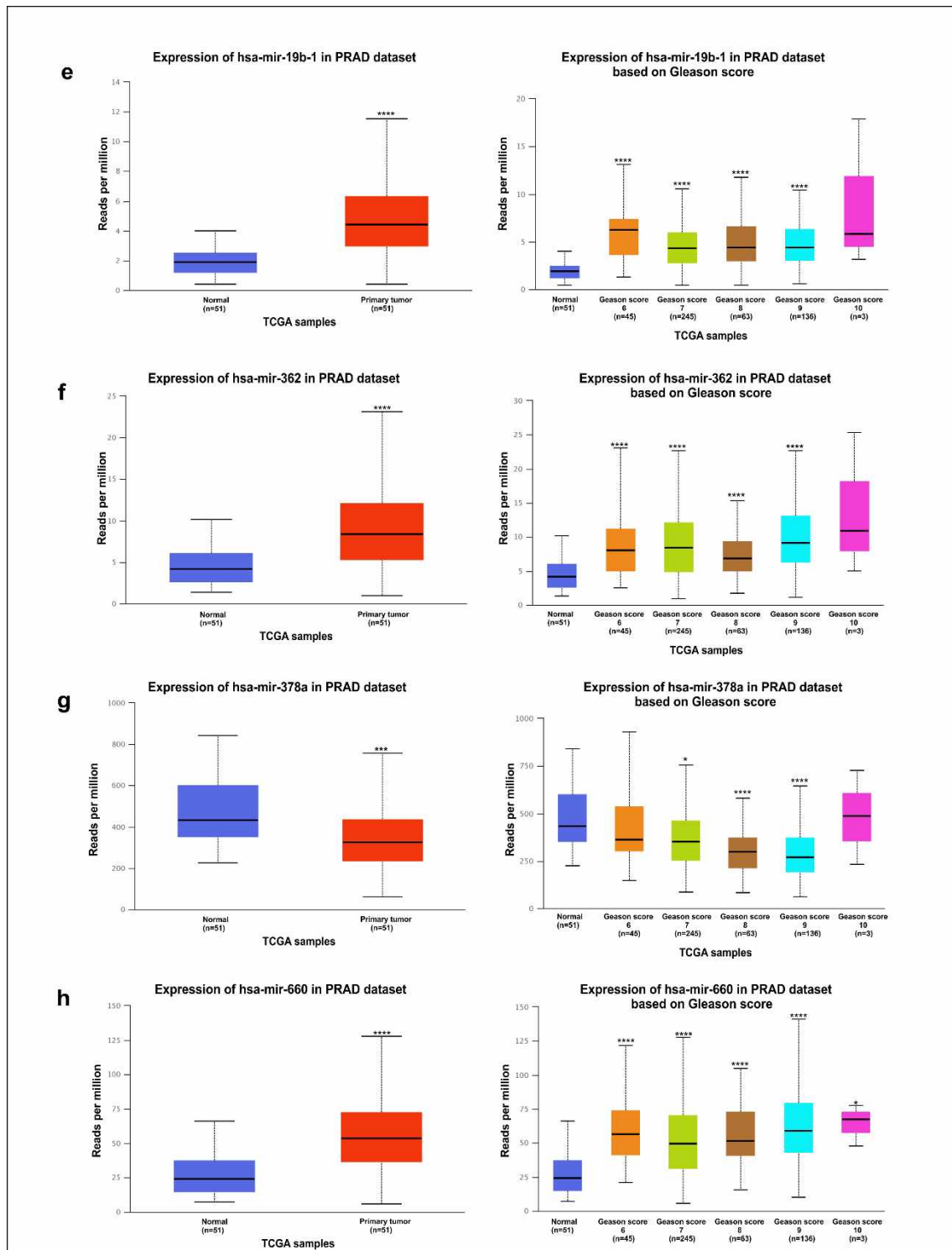


Figura 5: Expressão de mi-RNA, a partir de dados depositados no TCGA, preditos por bioinformática como ligantes de ambos *PCA3* e *PDCD7*, em tecido não tumoral comparado com tecido com câncer de próstata (PRAD). As amostras também foram subdivididas pelo escore de Gleason. (e) hsa-miR-19b-1-5p, (f) hsa-miR-362-3p, (g) hsa-miR-378a-5p e (h) hsa-miR-660-3p. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, e **** $p < 0.0001$.

Em modelos celulares, observamos que maiores níveis de *PDCD7* são detectados em LNCaP, representativa de CaP hormônio-dependente. Menos transcritos foram quantificados na linhagem RWPE-1 (não tumoral) e na PC-3 (hormônio-independente) (**Figura 6**).

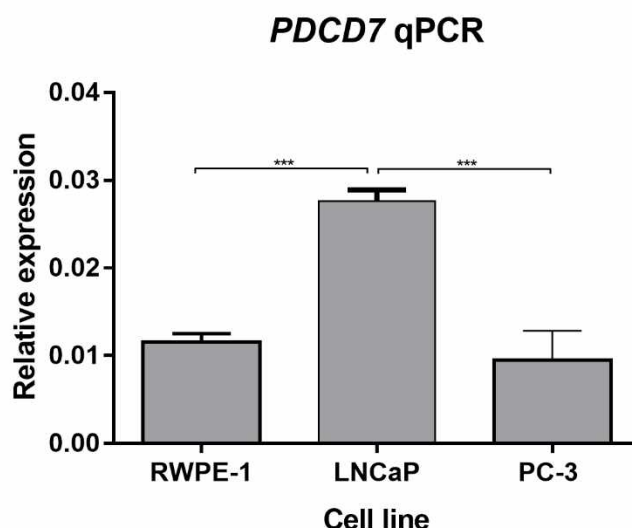


Figura 6: Níveis transcricionais de *PDCD7* nas linhagens celulares da próstata RWPE-1 (não-tumorigênica), LNCaP (câncer hormônio-dependente) e PC-3 (câncer hormônio-independente). *** $p < 0.001$.

Como o *PDCD7* foi identificado como um possível regulador do gene *PCA3* (*dados não publicados, apresentados no Capítulo II-Artigo 1 desta tese*), sugerindo seu papel na gênese da doença, e dentre as linhagens avaliadas a LNCaP é a única que apresenta níveis expressivos de *PCA3* (*dados não publicados apresentados no Capítulo II-Artigo 1 desta tese*) (LEMOS *et al.*, 2016), esta foi escolhida para os ensaios de silenciamento transiente da expressão de *PDCD7* utilizando esiRNA (**Figura 7**).

O silenciamento em nível de mRNA foi bem-sucedido, com diminuição em 85% dos transcritos de *PDCD7* em relação às células transfectadas com o controle negativo (esiGFP) (**Figura 7a**). A inibição da expressão de *PDCD7* também aumentou os níveis transcricionais do *PCA3* em 90% quando comparado com o controle negativo (**Figura 7b**). Paralelamente, houve diminuição dos níveis de

mRNA dos genes *AR*, *PRUNE2*, *CK18* e *PSA* ($p \leq 0,05$) em 87%, 67,17%, 24,5% e 23,12%, respectivamente (**Figuras 7c,7d,7e e 7f**). Os dados de *CDH1* não foram estatisticamente significativos (**Figura 7g**).

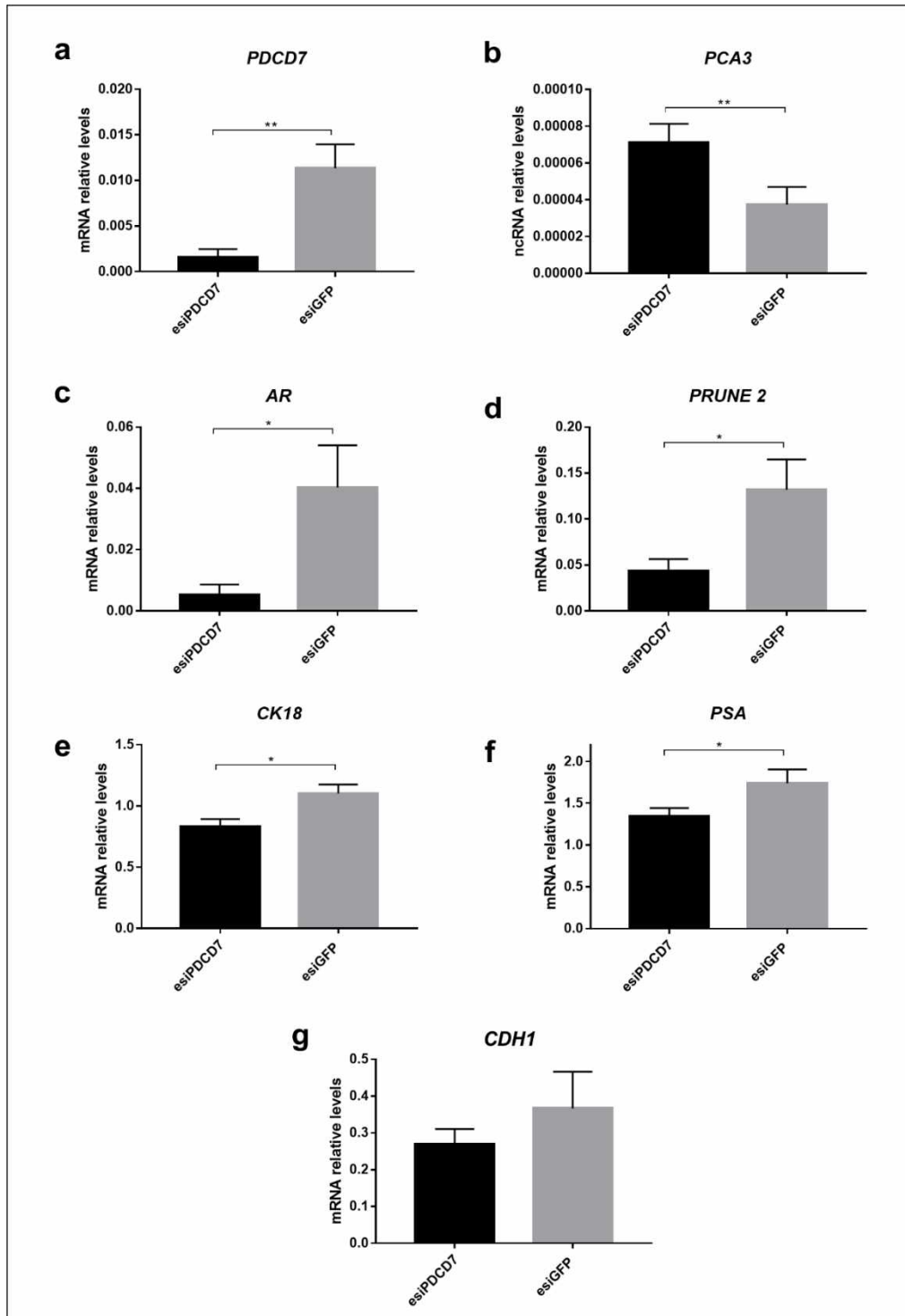


Figura 7: Níveis relativos de diferentes transcritos após o silenciamento da linhagem LNCaP (a) *PDCD7* (*Programmed cell death 7*). (b) *PCA3* (*Prostate cancer associated 3*). (c) *AR* (*Androgen receptor*). (d) *PRUNE2* (*prune homolog 2 with BCH domain*). (e) *CK18* (*keratin 18*). (f) *PSA* (*kallikrein related peptidase 3*) (g) *CDH1* (*cadherin 1*). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$

Análises de qPCR array também foram realizadas com sondas para biomarcadores para diferentes vias associadas à tumorigênese (**Figura 8**), com evidente diminuição da expressão dos genes mediante silenciamento de *PDCD7* (apresentados em verde) (**Figura 8a**). Apenas os genes *FASLG* (*Fas ligand*), *FLT1* (*fms related receptor tyrosine kinase 1*), *FOXC2* (*forkhead box C2*) e *TBX2* (*T-box transcription factor 2*), tiveram seus níveis transcrpcionais aumentados (apresentados em vermelho). Estratificando pelas vias tumorais clássicas, observa-se que as mais afetadas foram as de angiogênese, transição epitélio-mesenquimal e de sinalização de hipoxia (**Figura 8b**). Os dados de cada gene avaliado com o respectivo *fold-change* são apresentados na **Tabela Suplementar 1**.

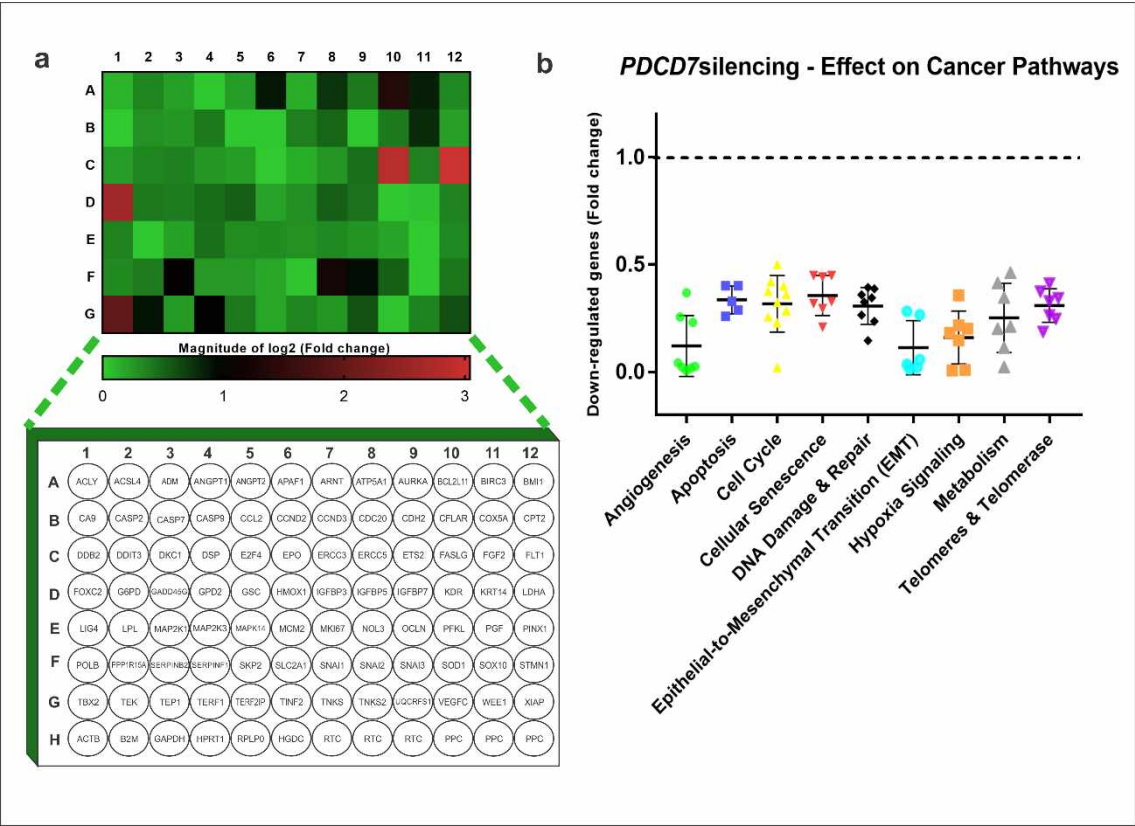


Figura 8: Perfil de expressão gênica obtido pelo ensaio do RT² profiler PCR array após o silenciamento do gene *PDCD7* em LNCaP. (a) Mapa de calor mostrando as alterações das expressões de cada gene. Os quadrantes vermelhos, verdes e pretos indicam genes que tiveram a expressão aumentada, diminuída e inalterada, respectivamente. (b) Efeitos do silenciamento na diminuição da expressão de genes em cada via relacionada à tumorigênese, escalados em *fold-change* e normalizados em relação às células silenciadas com o controle negativo, cujo alvo inexistente no genoma humano.

Finalmente, o peptídeo pepPDCD7 foi avaliado quanto à sua capacidade diagnóstica e terapêutica. Em soro de pacientes, pepPDCD7 não diferenciou pacientes com CaP daqueles com HPB (**Figura 9a**). Quanto ao tratamento das linhagens, o peptídeo não diminui a viabilidade das células em 24 e 48h (**Figura 9**). Apenas as células PC-3, quando tratadas com 10ng e 100ng de peptídeo durante 48h aumentou a viabilidade em 13.1% e 9.14% ($p < 0,05$), respectivamente.

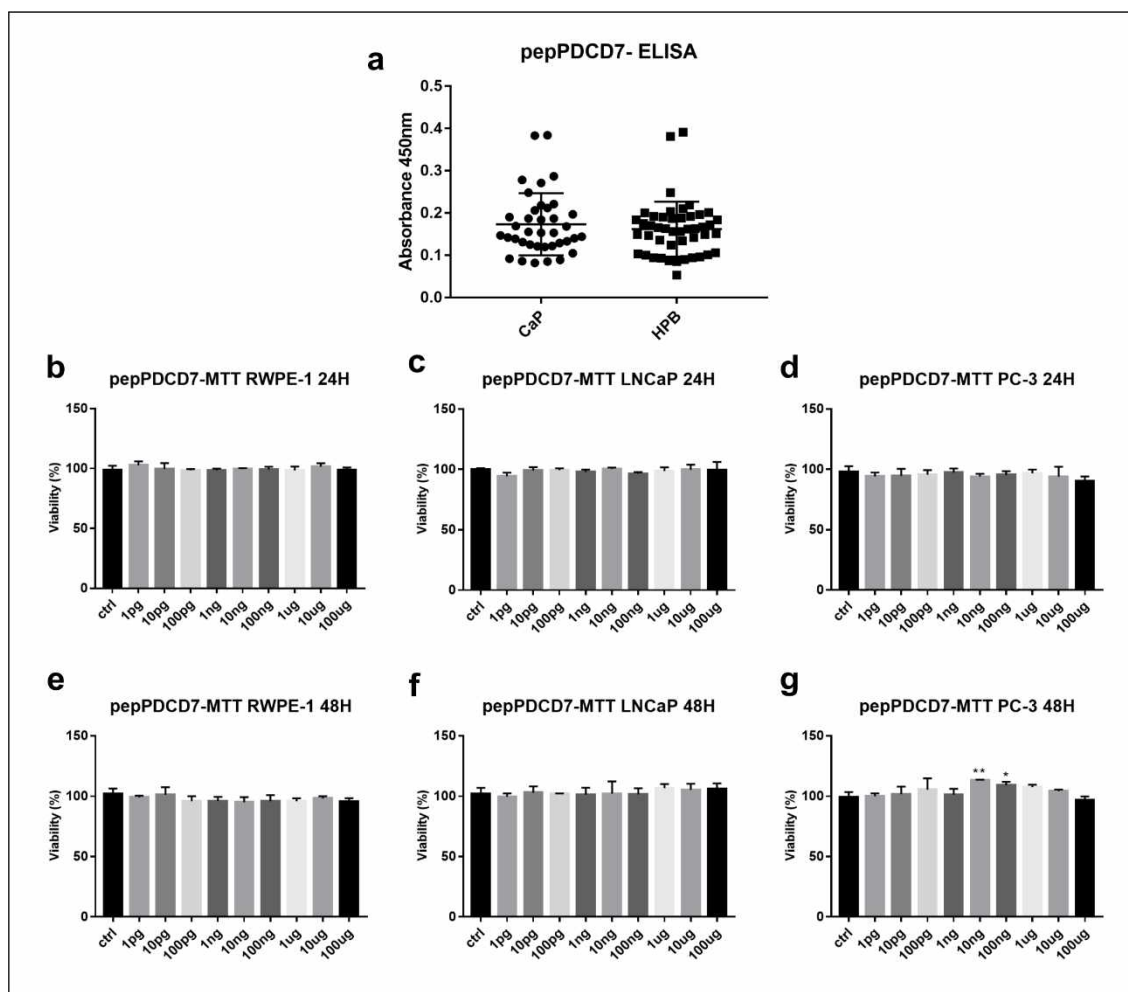


Figura 9: Ensaios conduzidos com peptídeo sintético mimético ao PDCD7 (pepPDCD7). (a) Ensaio de ELISA utilizando soro de pacientes com câncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB). Ensaios de viabilidade também foram realizados nas células prostáticas RWPE-1 (b e e), LNCaP (c e f) e PC-3 (d e g) estimuladas com peptídeo pepPDCD7 durante 24 e 48h. A significância estatística foi calculada em relação ao controle sem tratamento. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$

DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, é notório o avanço nas estratégias diagnósticas do CaP, o que tem tido grande impacto nas decisões terapêuticas e no desfecho clínico dos pacientes (GHAFOURI-FARD; KHOSHBAKHT; *et al.*, 2022; LITWIN; TAN, 2017; LUDWIG; WEINSTEIN, 2005; SCHALKEN, 2014). Contudo, o CaP ainda carece de caracterização molecular, especialmente de seus mecanismos regulatórios. Neste contexto o PDCD7 surge como uma molécula importante na sinalização e interação tumoral, que possui vários efetores e reguladores associados ao processo oncogênico que podem ter alta relevância clínica e terapêutica para o CaP.

Em um primeiro momento, avaliamos seu potencial diagnóstico e/ou prognóstico utilizando dados do TCGA e GEO. A redução dos transcritos de *PDCD7* possui valor diagnóstico, indicando maiores chances de o paciente estar com CaP, quando em comparação com a ausência de tumor. De maneira preditiva, a expressão de *PDCD7* em pacientes antes da biópsia, consegue prever a progressão clínica do mesmo, uma vez que maiores níveis desse transcrito em pacientes com CaP, indicam maiores chances de evoluir para casos mais graves da doença e estão associados a maiores chances de um novo evento tumoral. Sendo um valioso marcador prognóstico. Devido ao comportamento peculiar dos transcritos, diminuindo na discriminação do CaP de tecido normal, e aumentando em casos de maior agressividade, correlacionado com a ocorrência de um novo evento tumoral, quando diagnosticado, sugerimos que a expressão de *PDCD7* seja regulada indiretamente por outras moléculas, dentre estas miRNAs. De fato, além de atuar (Park *et al.*, 1999a) nos mecanismos de defesa e morte programada, o PDCD7 também se encontra envolvido em modificações pós-transcricionais por meio da formação do spliceossomo e consequentemente, na edição de transcritos (AUGSPACH *et al.*, 2021; OLTROF *et al.*, 2021). Interessantemente, no Capítulo II

dessa tese, apresentamos o *PDCD7* como ligante à região promotora do gene *PCA3*, modulando sua transcrição e hipotetizamos que também possa regular seus mecanismos de *splicing*, uma vez que atua no complexo spliceossômico.

Portanto, oito miRNAs ligantes a *PDCD7* e *PCA3* foram preditos enquanto um possível mecanismo de regulação indireta entre essas duas moléculas. O miR-1228-3p é descrito na literatura como superexpresso em câncer de pulmão de células não-pequenas (non-small cell lung cancer-NSCLC), com potencial valor diagnóstico e preditor de pior prognóstico em amostras de sangue (XUE *et al.*, 2020). Também possui a expressão aumentada em tecido de osteosarcoma regulando diferentes genes associados a esses tumores. (MONTERDE-CRUZ *et al.*, 2020).

hsa-miR-1343-3p é descrito como ativador de LINC01559, um lncRNA RNA oncogênico associado ao aumento de autofagia em adenocarcinoma de pulmão (ZHAO *et al.*, 2021). Sua expressão está associada ao diagnóstico de câncer gástrico, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade (GILANI *et al.*, 2022), além de ser descrito como um oncogene em câncer endometrial (JAYARATHNA *et al.*, 2021).

A superexpressão de hsa-miR-150-5p é associada ao câncer de mama triplo-negativo (SUGITA *et al.*, 2022), sendo regulado por lncRNAs em câncer de tireóide (GUO *et al.*, 2021). Em CaP, tem seus níveis elevados em homens jovens diagnosticados com a doença (VALERA *et al.*, 2020). Já o hsa-miR-186-3p atua como supressor tumoral em câncer de colon através da inibição da via KRT18/MAPK (XIA *et al.*, 2022).

Nossos dados corroboram os apresentados por Soremekun *et al.*, que correlacionou a expressão de hsa-miR-19b-1-5p com o CaP (SOREMEKUN *et al.*, 2021) e este miRNA também é expresso diferencialmente em tecido normal e tumoral de bexiga (CHEN *et al.*, 2019). Em câncer de mama, o hsa-miR-362-3p atua como um anti-tumoral inibindo hERG via ligação na região 3'UTR, sendo um potencial biomarcador (ASSIRI *et al.*, 2019). Em carcinoma hepatocelular esse miRNA é oncogênico, uma vez que inibe o supressor tumoral ZC3H13, correlacionando-se com pior prognóstico da doença (WU *et al.*, 2022).

Assim como nos dados apresentados aqui, a expressão de hsa-miR-378a-5p é menor em câncer colorretal em comparação com o controle não-tumoral e

essa diminuição também se encontra correlacionado com maior grau histológico e pior prognóstico desse pacientes (LI, HUI *et al.*, 2014; LI, JIANXIN *et al.*, 2022). Assim, o hsa-miR-378a-5p atua como um supressor tumoral inibindo a proliferação celular em câncer colorretal, além de promover a apoptose de células tumorais em câncer de mama triplo-negativo via lncRNA GAS5 (LI, JIANXIN *et al.*, 2022; ZHENG *et al.*, 2020).

O hsa-miR-660-3p foi o miRNA com expressão diferencial mais expressiva, discriminando todos os graus de Gleason acima de 6 do controle não-tumoral. Este miRNA é “esponjado” pelo RNAcircular circ_0060967 e modulado negativamente em câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC), facilitando, assim, a sua progressão, proliferação e invasão (ZHU *et al.*, 2022).

Apesar de o *PDCD7* já ter sido relatado em outros tumores como câncer oral (PENG, SHIH YUAN *et al.*, 2018), câncer de cabeça e pescoço (PENG, SHIH-YUAN *et al.*, 2015) e leucemia mieloide aguda (TIAN *et al.*, 2014), nosso estudo é pioneiro em apresentar seu perfil no CaP. Considerando sua correlação com o *PCA3*, realizamos ensaios de knockdown de *PDCD7* na linhagem LNCaP e avaliamos a expressão dos genes *PCA3*, *AR*, *PRUNE2*, *CK18*, *PSA* e *CDH1*, já descritos como regulados pelo *PCA3*. De fato, além da sua utilização como biomarcador, o *PCA3* tem a capacidade de modular a expressão de genes chave para a manutenção do câncer de próstata como o *Androgen Receptor (AR)*, *Prune Homolog 2 (PRUNE2)* e marcadores de transição epitélio-mesenquimal como *CK18* e *CDH1* (LEMOS *et al.*, 2016; SALAMEH *et al.*, 2015b).

Aparentemente é possível que o *PDCD7* atue na repressão da proliferação do câncer de próstata por meio do controle de *PCA3* e *PRUNE2* e *AR*, uma vez que o silenciamento de *PDCD7*, aumenta os níveis de *PCA3*, e diminui *PRUNE2* e *AR*, configuração esta que favorece a proliferação do tumor em células hormônio-responsivas (FERREIRA *et al.*, 2012; SALAMEH *et al.*, 2015a), representada pela linhagem LNCaP.

Após silenciamento, houve diminuição na expressão de *AR*. Esse efeito em *AR*, reforça os achados de Augspach e colaboradores que descreveram a interação de *PDCD7* e *AR* por co-imunoprecipitação, implicando na regulação direta do spliceossoma menor (MiS) via *PDCD7* (AUGSPACH *et al.*, 2021). Revelando

indícios da regulação pós transcricional de RNAs por *PDCD7* via estímulo androgênico.

Com o *knockdown*, também houve uma diminuição nos transcritos de *CK18*, o que aumenta a agressividade do CaP, conforme demonstrado por Yin et al. (YIN et al., 2016). Os níveis de *PRUNE2* também diminuíram, evidenciando sua relação antagônica com o gene *PCA3* (SALAMEH et al., 2015b). Finalmente, verificou-se uma discreta diminuição dos níveis transcricionais de *CDH1* após o silenciamento de *PDCD7* em LNCaP, suportando os achados de Peng et al. que apontaram a redução de *CDH1* por inibição de *PDCD7* via miR-134 em Carcinoma espinocelular oral (PENG, SHIH YUAN et al., 2018). Quanto as vias reguladas, (Jiang et al., 2011; Pajares, 2017) (Tian et al., 2014b) o ensaio de qPCR-Array evidenciou uma diminuição na expressão de 70% dos genes, sugerindo a existência de uma intrincada rede de interações envolvendo o gene *PDCD7*.

Contudo o peptídeo sintético não demonstrou efeitos celulares significativos, possivelmente por não ter adquirido a mesma conformação tridimensional que o peptídeo expresso na superfície do bacteriófago. Bem como não houve a capacidade de detectar auto-anticorpos circulantes que se ligassem ao peptídeo sintético, como mostrado nos resultados de ELISA.

CONCLUSÃO

Neste estudo evidenciamos o perfil diferencial de transcritos de *PDCD7* no CaP, apresentando-o como potencial diagnóstico e prognóstico. Demonstramos um comportamento peculiar, com maior expressão em tecido não tumoral e no CRPC. Além disso, identificamos oito miRNAs com potencial diagnóstico e/ou regulatório, sendo ligantes de *PDCD7* e *PCA3*. Por fim, demonstramos a relação de ambos os genes em ensaios de silenciamento, em que o *knockdown* de *PDCD7* conduziu a um aumento na expressão de *PCA3* e diminuição de *PRUNE2*, *AR* e *CK18*.

Portanto, estudos adicionais são necessários para compreender essa intrincada rede regulatória envolvendo *PDCD7*, miRNA e lncRNAs no CaP. Esta poderá otimizar a detecção da doença e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1: Valores de Fold-change de todos os genes contidos no Array RT2 profiler.

Gene ID:	Fold-Change	Gene ID:	Fold-Change	Gene ID:	Fold-Change	Gene ID:	Fold-Change
ACLY	0,112514278	DDB2	0,235350039	LIG4	0,359628684	TBX2	1,949737633
ACSL4	0,345697003	DDIT3	0,345864777	LPL	0,020632751	TEK	0,897870945
ADM	0,21719759	DKC1	0,375264572	MAP2K1	0,209232664	TEP1	0,248200857
ANGPT1	0,017955629	DSP	0,266328735	MAP2K3	0,449745266	TERF1	1,027102384
ANGPT2	0,231354971	E2F4	0,228359704	MAPK14	0,318768284	TERF2IP	0,412503996
APAF1	0,88477345	EPO	0,007217325	MCM2	0,323958294	TINF2	0,18804893
ARNT	0,146612498	ERCC3	0,145801756	MKI67	0,284318524	TNKS	0,345385638
ATP5A1	0,74297213	ERCC5	0,264929426	NOL3	0,329483928	TNKS2	0,26518664
AURKA	0,4000577	ETS2	0,449714093	OCLN	0,28190481	UQCRFS1	0,597653001
BCL2L11	1,341902638	FASLG	2,835454489	PFKL	0,199530334	VEGFC	0,041803861
BIRC3	0,847144511	FGF2	0,368689951	PGF	0,006453869	WEE1	0,360677167
BMI1	0,327434899	FLT1	3,041493667	PINX1	0,33019267	XIAP	0,613816784
CA9	0,00915249	FOXC2	2,598861949	POLB	0,32612117		
CASP2	0,287947959	G6PD	0,4127328	PPP1R15A	0,392721912		
CASP7	0,259207614	GADD45G	0,387288347	SERPINB2	1,051814288		
CASP9	0,401975645	GPD2	0,461109086	SERPINF1	0,255639026		
CCL2	0,020714431	GSC	0,538747061	SKP2	0,256597674		
CCND2	0,021510427	HMOX1	0,201797471	SLC2A1	0,182488822		
CCND3	0,376150001	IGFBP3	0,295244072	SNAI1	0,035264979		
CDC20	0,500756102	IGFBP5	0,537963427	SNAI2	1,20704545		
CDH2	0,020639903	IGFBP7	0,442233432	SNAI3	0,939770248		
CFLAR	0,401112825	KDR	0,02567984	SOD1	0,52202109		
COX5A	0,781804612	KRT14	0,057407379	SOX10	0,014575407		
CPT2	0,210571195	LDHA	0,357392187	STMN1	0,421288372		

Os quadrantes vermelhos, verdes e pretos indicam genes que tiveram a expressão aumentada, diminuída e inalterada, respectivamente.

REFERENCIAS

ABO ELWAFI, Reham; GAMALELDIN, Marwa; GHALLAB, Omar. The clinical and prognostic significance of FIS1, SPI1, PDCD7 and Ang2 expression levels in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics*, v. 233–234, p. 84–95, 1 abr. 2019. Acesso em: 2 out. 2022.

ASSIRI, Abdullah A. *et al.* MicroRNA 362-3p Reduces hERG-related Current and Inhibits Breast Cancer Cells Proliferation. *Cancer Genomics & Proteomics*, v. 16, n. 6, p. 433–442, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://cgp.iiarjournals.org/content/16/6/433>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

AUGSPACH, Anke *et al.* Minor intron splicing efficiency increases with the development of lethal prostate cancer. *bioRxiv*, p. 2021.12.09.471104, 10 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.09.471104v1>>. Acesso em: 13 nov. 2022.

BARRETT, Tanya *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D991–D995, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D991/1067995>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

CASANOVA-SALAS, Irene *et al.* Quantitative and Qualitative Analysis of Blood-based Liquid Biopsies to Inform Clinical Decision-making in Prostate Cancer. *European Urology*, v. 79, n. 6, p. 762–771, 1 jun. 2021. Acesso em: 3 out. 2022.

CHANDRASHEKAR, Darshan Shimoga *et al.* UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, v. 25, p. 18–27, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35078134/>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

CHEN, Chien Lung *et al.* Plasma miRNA profile is a biomarker associated with urothelial carcinoma in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 316, n. 6, p. F1094–F1102, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00014.2019>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

DURAND, Xavier *et al.* ProgenSA™ PCA3 test for prostate cancer. <http://dx.doi.org/10.1586/erm.10.122>, v. 11, n. 2, p. 137–144, mar. 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erm.10.122>>. Acesso em: 9 out. 2022.

EDGAR, Ron; DOMRACHEV, Michael; LASH, Alex E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 1, p. 207–210, 1 jan. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/30/1/207/1332640>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

FERREIRA, Luciana Bueno *et al.* PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer*, v. 12, n. 1, p. 507, 6 nov. 2012. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-507>>.

Acesso em: 17 fev. 2021.

FREITAS, Cláudia *et al.* The Role of Liquid Biopsy in Early Diagnosis of Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 1130, 16 abr. 2021. Acesso em: 3 out. 2022.

GANDAGLIA, Giorgio *et al.* Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. *European Urology Oncology*, v. 4, n. 6, p. 877–892, 1 dez. 2021. Acesso em: 7 dez. 2022.

GHAFOURI-FARD, Soudeh; KHOSHBAKHT, Tayyeb; *et al.* A review on the role of PCA3 lncRNA in carcinogenesis with an especial focus on prostate cancer. *Pathology - Research and Practice*, v. 231, p. 153800, 1 mar. 2022. Acesso em: 27 out. 2022.

GHAFOURI-FARD, Soudeh; HUSSEN, Bashdar Mahmud; *et al.* Interplay Between Non-Coding RNAs and Programmed Cell Death Proteins. *Frontiers in Oncology*, v. 12, p. 1076, 23 mar. 2022. Acesso em: 10 nov. 2022.

GILANI, Neda *et al.* Identifying Potential miRNA Biomarkers for Gastric Cancer Diagnosis Using Machine Learning Variable Selection Approach. *Frontiers in Genetics*, v. 12, 10 jan. 2022. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8785967/](https://pmc/articles/PMC8785967/)>. Acesso em: 16 nov. 2022.

GRAVIS, Gwenaëlle. Systemic treatment for metastatic prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, v. 6, n. 2, p. 162–168, 1 abr. 2019. Acesso em: 25 nov. 2022.

GUO, Kai *et al.* LncRNA-MIAT promotes thyroid cancer progression and function as ceRNA to target EZH2 by sponging miR-150-5p. *Cell Death & Disease* 2021 12:12, v. 12, n. 12, p. 1–12, 22 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41419-021-04386-0>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

GUPTA, A. *et al.* A four-kallikrein panel for the prediction of repeat prostate biopsy: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Rotterdam, Netherlands. *British Journal of Cancer* 2010 103:5, v. 103, n. 5, p. 708–714, 27 jul. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/6605815>>. Acesso em: 3 out. 2022.

HAWKES, Nigel. Cancer survival data emphasise importance of early diagnosis. *BMJ*, v. 364, p. l408, 25 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/364/bmj.l408>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

ICHAEL, M; ARRY, J B. Prostate-Specific–Antigen Testing for Early Diagnosis of Prostate Cancer. <https://doi.org/10.1056/NEJM200105033441806>, v. 344, n. 18, p. 1373–1377, 3 maio 2001. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200105033441806>>. Acesso em: 3 out. 2022.

JAYARATHNA, Dulari K. *et al.* Integrative Transcriptome-Wide Analyses Uncover Novel Risk-Associated MicroRNAs in Hormone-Dependent Cancers. *Frontiers in Genetics*, v. 12, 26 ago. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8427606/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

KHOO, Amanda *et al.* Proteomic discovery of non-invasive biomarkers of localized prostate cancer using mass spectrometry. *Nature Reviews Urology* 2021 18:12, v. 18, n. 12, p. 707–724, 27 ago. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41585-021-00500-1>. Acesso em: 3 out. 2022.

LEMOS, Ana Emília Goulart *et al.* PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumor Biology* 2016 37:8, v. 37, n. 8, p. 11339–11348, 9 mar. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5012-3>. Acesso em: 3 out. 2022.

LI, Hui *et al.* Clinical and biological significance of miR-378a-3p and miR-378a-5p in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, v. 50, n. 6, p. 1207–1221, 1 abr. 2014. Acesso em: 16 nov. 2022.

LI, Jianxin *et al.* H19 may regulate the immune cell infiltration in carcinogenesis of gastric cancer through miR-378a-5p/SERPINH1 signaling. *World journal of surgical oncology*, v. 20, n. 1, p. 295, 1 dez. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12957-022-02760-6>. Acesso em: 16 nov. 2022.

LI, Zhuo *et al.* Identification of Urinary Exosomal miRNAs for the Non-Invasive Diagnosis of Prostate Cancer. *Cancer Management and Research*, v. 13, p. 25, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7797303/>. Acesso em: 3 out. 2022.

LITWIN, Mark S.; TAN, Hung Jui. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, v. 317, n. 24, p. 2532–2542, 27 jun. 2017. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2633921>. Acesso em: 3 out. 2022.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001. Acesso em: 23 ago. 2022.

LUDWIG, Joseph A.; WEINSTEIN, John N. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 11, p. 845–856, 20 nov. 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc1739>. Acesso em: 11 fev. 2019.

MONTERDE-CRUZ, Lucero *et al.* MicroRNA expression in relation with clinical evolution of osteosarcoma. *Pathology - Research and Practice*, v. 216, n. 8, p. 153038, 1 ago. 2020. Acesso em: 16 nov. 2022.

MORTAZAVI, Ali *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 2008 5:7, v. 5, n. 7, p. 621–628, 30 maio 2008.

Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.1226>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

OLTHOF, Anouk M. *et al.* Disruption of exon-bridging interactions between the minor and major spliceosomes results in alternative splicing around minor introns. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. 6, p. 3524–3545, 6 abr. 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/49/6/3524/6154467>>. Acesso em: 13 nov. 2022.

PARK, Eun Jung *et al.* Characterization of a novel mouse cDNA, ES18, involved in apoptotic cell death of T-cells. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 6, p. 1524, 3 mar. 1999. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC148348/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC148348/?report=abstract)>. Acesso em: 27 set. 2022.

PENG, Shih Yuan *et al.* miR-134 targets PDCD7 to reduce E-cadherin expression and enhance oral cancer progression. *International Journal of Cancer*, v. 143, n. 11, p. 2892–2904, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.31638>>. Acesso em: 2 out. 2022.

PENG, Shih-Yuan *et al.* Abstract 181: miR-134 targets programmed cell death 7 (PDCD7) gene to modulate the pathogenesis of head and neck carcinoma. 1 ago. 2015, [S.I.]: American Association for Cancer Research, 1 ago. 2015. p. 181–181. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2015-181>>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SALAMEH, Ahmad *et al.* PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 27, p. 8403–8408, 2015a. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1507882112>>.

SALAMEH, Ahmad *et al.* PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 27, p. 8403–8408, 7 jul. 2015b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26080435/>>. Acesso em: 9 fev. 2021.

SALAMI, Simpa S. *et al.* Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 31, n. 5, p. 566–571, 1 jul. 2013. Acesso em: 3 out. 2022.

SCHALKEN, J. A. *Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review. Clinical biochemistry.* [S.I.]: Elsevier. . Acesso em: 19 maio 2021. , 1 jul. 2014

SOREMEKUN, Opeyemi *et al.* Integrative analysis of microRNA expression level profile identifies microRNAs associated with prostate cancer. *Gene Reports*, v. 25, p. 101376, 1 dez. 2021. Acesso em: 16 nov. 2022.

SUGITA, Bruna M. *et al.* MiR-150-5p Overexpression in Triple-Negative Breast Cancer Contributes to the In Vitro Aggressiveness of This Breast Cancer Subtype. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 2156, v. 14, n. 9, p. 2156, 26 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/14/9/2156/htm>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

TIAN, Yiming *et al.* Identification of Novel Molecular Markers for Prognosis Estimation of Acute Myeloid Leukemia: Over-Expression of PDCD7, FIS1 and Ang2 May Indicate Poor Prognosis in Pretreatment Patients with Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE*, v. 9, n. 1, p. e84150, 8 jan. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084150>>. Acesso em: 2 out. 2022.

VALERA, Vladimir A. *et al.* microRNA Expression Profiling in Young Prostate Cancer Patients. *Journal of Cancer*, v. 11, n. 14, p. 4106, 2020. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC7196262/>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

VIRGO, Katherine S. *et al.* Second-line hormonal therapy for men with chemotherapy-naïve, castration-resistant prostate cancer: American society of clinical oncology provisional clinical opinion. *Journal of Clinical Oncology*, v. 35, n. 17, p. 1952–1964, 10 jun. 2017. Acesso em: 25 nov. 2022.

WANG, B.-R; *et al.* Developing New Treatment Options for Castration-Resistant Prostate Cancer and Recurrent Disease. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 1872, v. 10, n. 8, p. 1872, 3 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9059/10/8/1872/htm>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

WILL, Cindy L. *et al.* The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome. *RNA*, v. 10, n. 6, p. 929–941, 1 jun. 2004. Disponível em: <<http://rnajournal.cshlp.org/content/10/6/929.full>>. Acesso em: 2 out. 2022.

WU, Shuang *et al.* Downregulation of ZC3H13 by miR-362-3p/miR-425-5p is associated with a poor prognosis and adverse outcomes in hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*, v. 14, n. 5, p. 2304, 3 mar. 2022. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC8954979/>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

XIA, Tian *et al.* Hsa-miR-186-3p suppresses colon cancer progression by inhibiting KRT18/MAPK signaling pathway. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.2023305>, v. 21, n. 7, p. 741–753, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15384101.2021.2023305>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

XUE, Wei Xiao *et al.* Serum miR-1228-3p and miR-181a-5p as Noninvasive Biomarkers for Non-Small Cell Lung Cancer Diagnosis and Prognosis. *BioMed Research International*, v. 2020, 2020. Acesso em: 16 nov. 2022.

YIN, Bo *et al.* Downregulation of cytokeratin 18 is associated with paclitaxel-resistance and tumor aggressiveness in prostate cancer. *International Journal of Oncology*, v. 48, n. 4, p. 1730–1736, 1 abr. 2016. Disponível em:

<<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3396/abstract>>. Acesso em: 13 nov. 2022.

YUN, Seok Joong *et al.* Transcriptomic features of primary prostate cancer and their prognostic relevance to castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, v. 8, n. 70, p. 114845, 12 dez. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5777737/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29984445/)>. Acesso em: 8 nov. 2022.

ZHAO, Zhuochen *et al.* Long non-coding RNA LINC01559 exerts oncogenic role via enhancing autophagy in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell International*, v. 21, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/articles/10.1186/s12935-021-02338-4>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

ZHENG, Shipeng *et al.* lncRNA GAS5-promoted apoptosis in triple-negative breast cancer by targeting miR-378a-5p/SUFU signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 121, n. 3, p. 2225–2235, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.29445>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

ZHU, Zheng *et al.* Circ_0060967 facilitates proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer cells by sponging miR-660-3p/UBN2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 1, p. 1–12, 13 out. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-022-04569-z>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

Capítulo IV

Artigo Científico 3

Título: Câncer de Próstata e Alzheimer: uma ponte molecular entre as duas doenças

Título: Câncer de Próstata e Alzheimer: uma ponte molecular entre as duas doenças.

Resumo

Com o avanço na expectativa de vida da sociedade moderna e mudanças nos hábitos alimentares, doenças crônicas têm se mostrado cada vez mais prevalentes. O câncer de próstata (CaP) e a doença de Alzheimer (DA) acometem homens acima de 60 anos, com dados epidemiológicos alarmantes. Com características clínicas distintas, essas doenças compartilham mecanismos moleculares, os quais impactam nas estratégias terapêuticas a serem adotadas. Neste estudo objetivamos demonstrar os efeitos da Clorpromazina (CPZ) no CaP e DA e evidenciar o papel de eventos moleculares relacionados ao gene *PCA3* nessas doenças. Para tal, avaliamos a citotoxicidade de CPZ a linhagens de próstata não tumorigênica (RWPE-1) e tumorais hormônio-dependente (LNCaP) e hormônio-independente (PC-3), sendo o composto mais ativo a células PC-3. Na linhagem LNCaP, a droga diminuiu os transcritos de *PCA3*, aumentando *PRUNE2* e *ARHGAP1*. No modelo *in vivo* de Alzheimer, utilizando *Drosophila melanogaster AD-Like*, CPZ, a 1600 µg/mL, reduziu a neurodegeneração e diminuiu os transcritos de ortólogos de *PRUNE2* e *ARHGAP21*. Portanto, CaP e DA compartilham mecanismos moleculares de modo que CPZ agiu sobre células tumorais prostáticas e reverteu o fenótipo de DA em *D. melanogaster*. Nosso estudo apresenta uma nova abordagem no estudo dessas doenças, sobretudo no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: PCA3; Clorpromazina; Câncer de próstata; Alzheimer; PRUNE2; ARHGAP21

1. INTRODUÇÃO

Câncer e doenças neurodegenerativas têm se mostrado cada vez mais prevalentes na sociedade moderna, sobretudo com o aumento da expectativa de vida e com as mudanças nos hábitos da população (BALLENTINE CARTER; COFFEY, 1990; LEITÃO *et al.*, 2022; LITKE *et al.*, 2021; QIU; KIVIPERTO; VON STRAUSS, 2022). Nesse contexto, a idade tem se destacado como fator de risco para diferentes doenças crônicas, tais como o câncer de próstata e a doença de Alzheimer. O câncer de próstata (CaP) é o segundo tumor maligno mais incidente em homens, com aproximadamente 1,2 milhões de diagnósticos a cada ano, com estimativa de um aumento para 2,43 milhões em 2040, acometendo, principalmente, indivíduos acima de 60 anos (MAROTTE *et al.*, 2022; NOBARI *et al.*, 2022; PERNAR *et al.*, 2018). Cerca de 4% da população mundial acima de 60 anos, aproximadamente 25 milhões de pessoas, sofrem de demência, sendo a doença de Alzheimer (AD) responsável por 5 milhões de novos casos a cada ano (FERRI *et al.*, 2005; QIU; KIVIPERTO; VON STRAUSS, 2022). Estima-se que 11% da população masculina acima de 71 anos é diagnosticada com a DA (“2020 Alzheimer’s disease facts and figures”, 2020) (PODCASY; EPPERSON, 2022).

O Alzheimer é uma doença crônica neurodegenerativa progressiva responsável pela perda da função cognitiva, declínio no pensamento, dificuldades na memória e alterações comportamentais, os quais dificultam a independência nas atividades pessoais diárias (BREIJEH *et al.*, 2020a; QIU; KIVIPERTO; VON STRAUSS, 2022). Duas hipóteses são aceitas como as principais responsáveis por sua etiologia: (i) a hipótese colinérgica, na qual sugere que a disfunção do sistema colinérgico seja responsável por deficiências na memória (BREIJEH *et al.*, 2020b; HAMPEL *et al.*, 2018) e (ii) a hipótese amilóide, em que há um acúmulo de peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) no cérebro, formando oligômeros e protofibrilas insolúveis e neurotóxicas. Estas conduzem à morte de células neuronais e neurodegeneração, sendo o mecanismo mais aceito, atualmente. De fato, com a idade, ou em condições patológicas, há uma diminuição da degradação de $A\beta$ e seu consequente acúmulo no cérebro (BREIJEH *et al.*, 2020a; DE-PAULA *et al.*, 2012).

O CaP também é uma doença multifatorial. Molecularmente, envolve uma intrincada rede de interações, além da modulação de diferentes genes, codificantes ou não. Especial atenção tem sido dedicada ao gene *PCA3* (*Prostate Cancer Associated 3*), utilizado na prática clínica para diagnóstico de CaP desde 2011 pelo teste PROGENSA (DURAND *et al.*, 2014; FREITAS NEVES ORIENTADOR; RICARDO GOULART, 2007; HESSELS; SCHALKEN, 2009; LEE; DOBI; SRIVASTAVA, 2011; LEMOS *et al.*, 2019a; WANG; LIU; YAO, 2014; WEI *et al.*, 2014). O *PCA3* é um lncRNA localizado em sentido antisense ao intron 6 do gene supressor de tumor *PRUNE2* (*Prune homolog 2*), exercendo, portanto, um papel oncogênico e conduzindo à proliferação de células tumorais prostáticas (SALAMEH *et al.*, 2015). Nosso grupo de pesquisa ainda demonstrou que a expressão de *PCA3* é modulada por *ARHGAP21* (*Rho GTPase activating protein 21*), sugerindo este como um fator de transcrição importante no CaP (dados não publicados – Capítulo 2-Artigo1).

Interessantemente, tem sido descrita a correlação de *PCA3* não somente com o CaP, mas também com doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Bussemakers *et al.*, 1999; Hessels & Schalken, 2009) (Garofalo *et al.*, 2021; Gui *et al.*, 2015b; Lemos *et al.*, 2019a; Soreq *et al.*, 2014). Gui *et al.* demonstraram um aumento na expressão de *PCA3* em exossomos de líquido cérebro-espinhal de pacientes com Alzheimer, como um marcador de neurodegeneração (GAROFALO *et al.*, 2021). Além disso, *PRUNE2* foi apresentado como um gene de suscetibilidade para DA (POTKIN *et al.*, 2009). Tanto *PCA3* quanto *PRUNE2* são regulados pelo Receptor de Andrógeno (*AR*) e os níveis de mRNA do gene *AR* no cérebro são fundamentais para a função cognitiva. Ainda, pacientes com CaP em tratamento com terapia de privação androgênica têm maiores chances de desenvolver demência e/ou Alzheimer (SARI MOTLAGH *et al.*, 2021) (FERREIRA; PALUMBO; *et al.*, 2012). O gene *ARHGAP21* também é um importante alvo de investigação na DA, uma vez que genes da família *ARHGAP* foram relatados como associados à demência e ao CaP (GUO *et al.*, 2017; LAZARINI *et al.*, 2013; SEKIGUCHI *et al.*, 2020). Apesar de Ospina-Romero *et al.* terem encontrado uma baixa correlação entre o Alzheimer e o câncer, os autores enfatizam a possibilidade de compartilharem fator causal comum (OSPINA-ROMERO *et al.*, 2020). Nesse sentido, hipotetizamos que ambas as doenças

compartilham eventos moleculares que, quando modulados, podem contribuir para seu desenvolvimento e se mostrarem como importantes alvos terapêuticos.

Em 1972 Csatory descreveu a redução na mortalidade por câncer em pacientes que sofriam de doenças mentais e eram tratados com clorpromazina (CPZ) (CSATARY, 1972). Em 1992 Mortensen associou o menor risco de desenvolver CaP com tratamento cumulativo de altas doses de fenotiazinas, principalmente CPZ (MORTENSEN, 1992). Sintetizada por Paul Charpentier na década de 1950, a CPZ, também conhecida como Amplictil e Thorazine, teve o primeiro nome comercial de Largactil® com atividades adrenolítica, antiedema, antipirética e anticonvulsivante (LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2005). Atualmente, é utilizada como antipsicótica/neuroléptica (MANN; MARWAHA, 2022; REY *et al.*, 1989). No câncer inibe a síntese de DNA e da citocromo oxidase, além de atuar na via da proteína quinase B/alvo em mamíferos da rapamicina (akt/mTOR) (KAMGAR-DAYHOFF; BRELIDZE, 2021).

Molecularmente, oligodendrócitos tratados com clorpromazina tiveram os níveis de *PRUNE2* e *ARHGAP21* alterados, sugerindo estes como possíveis mecanismos de ação da droga (BRANDÃO, 2018). Portanto, objetivamos demonstrar os efeitos da CPZ no CaP e DA e evidenciar o papel de eventos moleculares relacionados ao *PCA3* nessas doenças. Nosso estudo apresenta, pela primeira vez, uma intersecção, em nível molecular, entre o CaP e DA, direcionando novas abordagens no tratamento de pacientes, sobretudo aqueles em grupo de risco para ambos os problemas relacionados à idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaios em linhagens celulares prostáticas

2.1.1 Cultivo Celular

As células prostáticas não tumorigênicas RWPE-1 foram mantidas em meio Keratinocyte SFM (serum-free medium; Thermo Fisher Scientific) com 5,0 ng/mL de EGF (fator de crescimento epidérmico; # PHG0313; Thermo Fisher Scientific) e 0,05 mg/mL de extrato de pituitária bovina (#13028014; Thermo Fisher Scientific). As células tumorais LNCaP (hormônio-dependente) e PC-3 (hormônio-

independente) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (#31800022; Gibco™). Todos os meios foram suplementados com 1X antibiótico-antimicótico (Gibco™) e 10% de SFB (soro fetal bovino; Thermo Fisher Scientific) e incubados a 37°C e 5% CO₂ até 80% de confluência. As linhagens foram confirmadas como livres de micoplasma e autenticadas por meio de análises de *Short Tandem Repeat* (STR).

2.1.2 Citotoxicidade

A citotoxicidade de CPZ sobre as células prostáticas foi avaliada pela redução do MTT ([3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide]). Placas de 96 poços foram semeadas com 2,4x10⁵ células em cada poço (K12-096; Kasvi™) e, após confluência, essas foram tratadas com 6,25; 12,5; 25, 50, 100, 200 e 400 µM de CPZ por 48 e 72h, determinados a partir da literatura e após testes previos (LABUZEK *et al.*, 2005). Após esses períodos, foi adicionado o MTT (5 mg MTT/ml em tampão fosfato-salino - PBS 1X) com incubação por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foi adicionada a solução de SDS (20% SDS, 50% dimetilformamida, 30% H₂O) e as placas incubadas por 16 horas ao abrigo da luz. A absorbância foi, então, registrada em espectrofotômetro no comprimento de 570 nm e os valores apresentados em porcentagem em relação às células não tratadas.

2.1.3 Quantificação de transcritos

Os ensaios de qPCR foram conduzidos para avaliar o efeito modulatório da CPZ sobre os transcritos do *PCA3* e dos genes a ele relacionados *ARHGAP21*, *PRUNE2* e *AR* (FERREIRA; NEVES; *et al.*, 2012; SALAMEH *et al.*, 2015). Foram semeadas 5x10⁵ células por poço em placas de 6-poços (K12-096; Kasvi™) para, após confluência, serem tratadas com 25 µM de CPZ durante 72h. O RNA foi, então, extraído utilizando o TRIzol Reagent® (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante, quantificado e qualificado a partir de leituras a 260nm e 280nm em equipamento NanoDropND-100 (NanoDrop Technologies). Foi utilizado o kit GoScript™ -Promega, para a síntese de cDNA de acordo com todas as recomendações do fabricante. Finalmente, a quantificação dos transcritos foi realizada utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™) e os primers descritos na **Tabela 1**. O gene *Beta-2-Microglobulina (B2M)* foi utilizado como

referência para a aplicação do método Ct relativo, após padronização das curvas-padrão relativas conforme recomendado cientificamente (BUSTIN *et al.*, 2009).

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados para a amplificação dos diferentes genes em linhagens prostáticas.

Gene-Alvo	Sequência 5'-3' (forward/reverse)	TA (°C)	Amplicon
<i>B2M</i>	CCTGCCGTGTGAACCATG GCGGCATCTTCAAACCTC	60°C	93bp
<i>PCA3</i>	CGAGGGAGACCAGGAAGAT ATCGATGACCCAAGATGGCG	62°C	277bp
<i>ARHGAP21</i>	ACCGATAAGGGCAAGCGAG CTCTTCCTCAGACGGAGTCGTC	60°C	120bp
<i>AR</i>	GTGTAAGTTGCGGAAGCCAGG CATGTGGAAGCTGCAAGGTCT	64°C	516bp
<i>PRUNE2</i>	GCTACCAGATGATTGACAGACGGT GGGATCAGCCCACTGAGTTC	60°C	172bp

B2M: Beta-2-Microglobulin; *PCA3* Prostate Cancer Associated 3; *ARHGAP21*: Rho GTPase Activating Protein 21; *AR*: Androgen Receptor; *PRUNE2*: Prune Homolog 2. TA: temperatura de anelamento.

2.2 Ensaios em *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Moscas *AD-Like*

Os estoques das moscas utilizadas nesse estudo foram obtidos do Bloomington Stock Center: w1118 (stock# 3605), UAS-BACE1, UAS-APP (#33797) e elav-GAL4 (#5146). Os indivíduos foram mantidos em uma incubadora a 25 °C em um ciclo de 12h:12h claro:escuro e criados em meio de farinha de milho (soja em pó 0,01%, glicose 7,2%, ágar 0,6%, farinha de milho 0,073%, levedura 0,018%, nipagin 0,06% e solução ácida 0,05% p/v).

Moscas *AD-Like* que expressam BACE e APP humano pan-neuronalmente foram obtidas pelo cruzando de moscas elav-GAL4 com UAS-BACE, UAS-APP. As pupas resultantes foram selecionadas de acordo com o fenótipo e sem qualquer marcador genético, como *tubby*, para garantir o genótipo elav-Gal4/+; UAS-BACE, UAS-APP/+ (modelo *AD-Like*).

2.2.2 Tratamentos

O tratamento das moscas foi administrado pela comida e se iniciou de 0 a 2 dias após a eclosão. CPZ foi diluída em água deionizada e 2,5 mL da amostra foram misturados a 1 g de meio de purê de batata enriquecido (75% de purê de batata instantâneo, 15% de extrato de levedura, 9,3% de glicose e 0,07% de nipagin). O meio de tratamento foi trocado a cada dois dias para assegurar integridade do composto. As moscas-controle foram alimentadas com meio de batata em pó enriquecido e solubilizado apenas com água deionizada. Apenas machos foram utilizados e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.3 Ensaio de sobrevivência

A taxa de sobrevivência das moscas foi registrada para avaliar a toxicidade de CPZ (800, 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL). Moscas machos e fêmeas (w1118) foram tratados conforme descrito anteriormente e os indivíduos mortos foram contados a cada dois dias, durante 21 dias. Um total de 90 moscas de cada genótipo e tratamento foi contabilizado. O mesmo teste foi realizado em moscas *AD-Like* com concentrações de CPZ de 1600, 800 e 400 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.4 Ensaio de geotaxia negativa iterativa rápida (RING)

O teste RING foi adaptado de Gargano et al. e conduzido para avaliar o efeito de diferentes tratamentos na capacidade locomotora das moscas (GARGANO *et al.*, 2005). Para garantir um fenótipo semelhante à DA foram utilizadas moscas-controle *elav-Gal4*. Grupos de 30 machos-controle (*elav-Gal4*) e 30 moscas *AD-Like* tratadas com CPZ (1600, 800 e 400 µg/mL) foram transferidos para frascos de vidro (9,5 cm × 2,5 cm) e encaixados em um porta-frasco personalizado. O comportamento dos indivíduos foi avaliado 10 e 15 dias após o tratamento. Antes do teste, as moscas foram expostas à luz e mantidas em ambiente silencioso por 20 minutos, para aclimação. Para o ensaio, o suporte foi batido três vezes na bancada e as moscas tiveram 4 s para subir 5 cm. Esse procedimento foi repetido cinco vezes, registrado em vídeo e analisado por meio do software QuickTime Player 7.7.9. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A média de escalada foi calculada como a porcentagem de moscas de cada grupo que

atingiram a marca de 5 cm, 120 quadros (4 segundos) após o suporte tocar a bancada pela última vez.

2.2.5 Análises histopatológicas

Com o objetivo de avaliar a neurodegeneração das moscas AD-Like, e o efeito da CPZ na regeneração do dano cerebral, foram realizadas análises histológicas dos cérebros das moscas. Para isso, 10 moscas de cada grupo de tratamento foram analisadas de 15 a 17 dias após a eclosão (d.p.e.) e indivíduos *elav-Gal4* foram utilizados como controle. As moscas foram anestesiadas com éter etílico e fixadas em solução de Carnoy (6:3:1, etanol 99%, clorofórmio e ácido acético glacial) por 24 horas. As cabeças foram, então, processadas em uma série graduada de etanol (70, 80, 90 e 99%), xilol e 60% de parafina líquida, por 30 minutos cada. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e seccionadas com 3 µm de espessura em micrótomo semiautomático (SLEE CUT5062). Foram então, desidratadas e coradas com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (Leica) com aumento de 40x e 100x, por meio de um sistema de captura de imagem acoplado (software LAS EZ) (BATISTA *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2013).

2.2.6 Ortólogos e ensaios de qPCR

Para a obtenção da sequência de genes ortólogos ao *ARHGAP21* e *PRUNE2*-humanos, em *D. melanogaster* foi utilizado o banco de referência em dados genéticos e moleculares da família de insetos *Drosophilidae*, FlyBase (<https://flybase.org/>), que engloba programas subsidiários de alinhamento de sequências como o Ensembl Compara, HGNC, Hieranoid, InParanoid, OrthoFinder OrthoInspector (DRYSDALE, 2008). Para o *ARHGAP21* humano foi considerado o gene CG1412 e, para o gene *PRUNE2*-humano foram encontrados dois prováveis ortólogos, o CG3461(pn) e o CG11593. Todas as sequências dos ortólogos foram conferidas individualmente utilizando o Ensembl (<https://www.ensembl.org/>).

Para a quantificação dos transcritos foram utilizadas 40 moscas de cada grupo, as quais foram dissecadas em cabeça e abdomen/torax, seguido de maceração com nitrogênio líquido em TRIzolReagent® (Invitrogen). O RNA foi extraído seguindo as recomendações do fabricante. A transcrição reversa foi

conduzida como já descrito anteriormente e, para a qPCR, também foi utilizado o GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™). Para os ensaios com *D. melanogaster*, o gene que codifica para a proteína ribossomal L32 (RPL32) foi utilizado como referência para os cálculos pelo método Ct comparativo. As sequências dos primers estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sequências dos primers desenhados para amplificação dos genes ortólogos em *D. melanogaster*.

Gene-Alvo	Sequência 5'-3' (forward/reverse)	TA (°C)	Amplicon
<i>RPL32</i>	GACCATCCGCCCAGCATAC CGGCGACGCACTCTGTT	60°C	138bp
<i>CG11593</i>	GCGTAATGTGCCACCTTTTCC CTTTCGCCAAAACCTTTGTGCTC	67°C	163bp
<i>CG3461 (pn)</i>	GCACCTTGGGACGGCAT TCGTGCTCCCGATGACG	60°C	168bp
<i>CG1412</i>	CAGCAGGCTAAGCGATACGGGTT GGTTCTTGGGAAACTCGGG	60°C	131bp

RPL32: Ribosomal protein L32; *CG11593*: *PRUNE2*-ortholog; *CG3461 prune (pn)* *PRUNE2*-ortholog; *CG1412*: *RhoGAP19D (ARHGAP21)*-ortholog). TA: temperatura de anelamento.

2.3 Análises estatísticas

As análises foram conduzidas no software Graphpad Prism 8.0.2 (San Diego, CA, EUA). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata e os dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi empregada para verificar diferenças entre as médias de grupos independentes, cujos dados estavam em distribuição normal pela análise de D'Agostino-Pearson omnibus. O teste t não pareado foi usado para avaliar as diferenças entre as médias entre dois grupos.

Para a análise de sobrevivência das moscas foi utilizado o teste não-paramétrico Kaplan-Meier para estimar a função de sobrevida em relação ao tempo. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando o chi-quadrado. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

A CPZ é um antipsicótico utilizado no tratamento de esquizofrenia já explorado como um possível agente antitumoral (Vlachos et al., 2021). Contudo, sua atividade em células prostáticas ainda não foi descrita. Presentemente, foram utilizadas três linhagens sendo uma não tumorigênica e duas de CaP, tratadas com diferentes concentrações de CPZ por 48 e 72h. Após 48 h, não houve redução da viabilidade em mais de 50%. Contudo, nas três menores concentrações, as células PC-3 foram mais sensíveis ao tratamento quando comparadas à linhagem RWPE-1. (**Figura 1a**). Já no tratamento por 72 h, observou-se uma diminuição na viabilidade das linhagens de CaP LNCaP e PC-3 a partir de 12,5 μ M (**Figura 1b**). A partir de 100 μ M, CPZ foi expressivamente citotóxico à linhagem não tumorigênica. Os resultados evidenciam uma substância ativa no CaP e a importância do tratamento prolongado e do metabolismo da droga para que o efeito esperado possa ser observado nas células transformadas. Para os testes posteriores foi escolhida a concentração de 25 μ M por ser a menor concentração capaz de diminuir a viabilidade das linhagens tumorais LNCaP e PC-3 em comparação com a não-tumoral RWPE-1 (42,3% e 46,4% respectivamente).

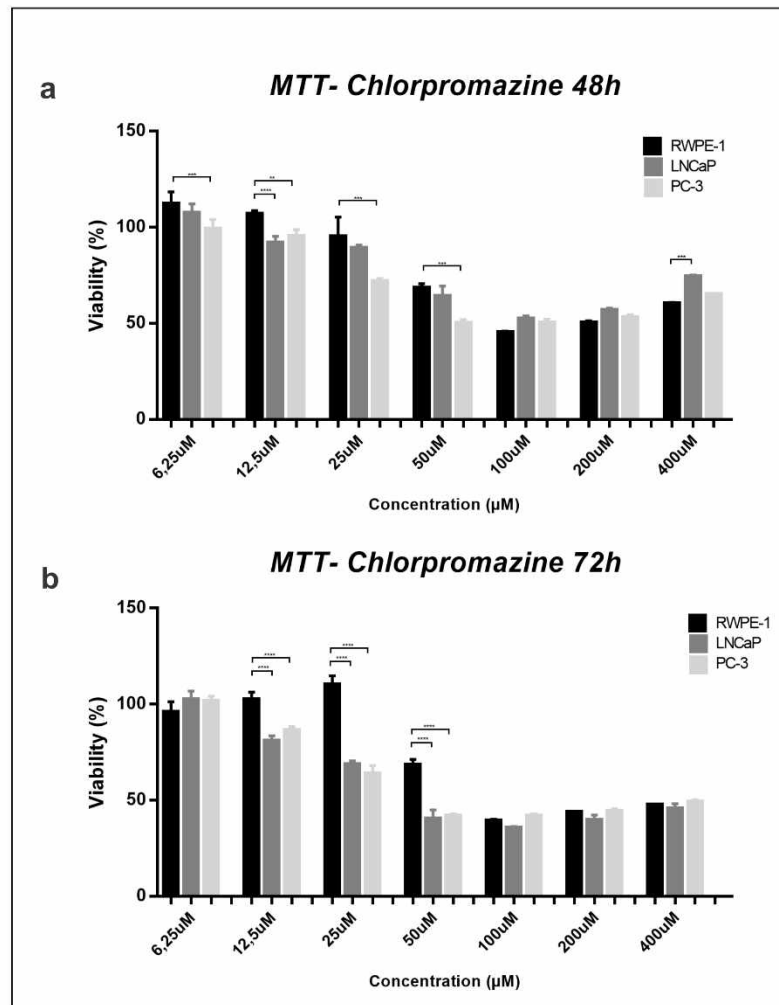


Figura 1. Avaliação da viabilidade das células prostáticas RWPE-1, LNCaP e PC-3 após tratamento com Clorpromazina. (a) Tratamentos conduzidos por 48 h. (b) Tratamentos conduzidos por 72 h. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata. A significância estatística está indicada como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Molecularmente, tem sido descrito o papel de CPZ na transcrição gênica e no intrincado processo regulatório relacionado à diferenciação celular (KAMGAR-DAYHOFF; BRELIDZE, 2021). Genes da família ARHGAP têm sido associados à esquizofrenia e ao CaP (GUO *et al.*, 2017; LAZARINI *et al.*, 2013; SEKIGUCHI *et al.*, 2020) e nosso grupo de pesquisa também identificou a correlação entre *ARHGAP21* e o gene *PCA3* (Capítulo 2 desta tese-Artigo 1) levantando questões acerca da possível modulação desses genes pela CPZ em tumores prostáticos. De fato, o gene *PCA3*, apresentado na literatura como CaP específico (LEE; DOBI; SRIVASTAVA, 2011; LEMOS *et al.*, 2019b), também se encontra expresso no fluido

cérebro-espinhal humano (GUI *et al.*, 2015a), sugerindo a existência de vias de sinalizações comuns entre doenças neuronais e tumores prostáticos.

Portanto, foi realizado um ensaio de qPCR para quantificar os transcritos dos genes *PCA3*, *PRUNE2*, *AR* e *ARHGAP21* (**Figura 2**) após o tratamento de 72h com 25 μ M de CPZ. Na **Figura 2a** é possível observar a expressão de *PCA3* sendo diminuída em 18,16% $\pm$ DP (Desvio Padrão) ($p < 0,05$), e a de *PRUNE2* (**Figura 2b**) aumentada em 23,99% $\pm$ DP ($p < 0,05$) após o tratamento com CPZ na linhagem LNCaP, caracterizada por expressar o gene *PCA3* (LEMOS *et al.*, 2016a). Os níveis transcricionais de *AR* (**Figura 2c**) não diferiram estatisticamente. Considerando a expressão de *ARHGAP21* (**Figura 2d**), os comportamentos entre as linhagens divergiram. Seus níveis transcricionais diminuíram 37,25% $\pm$ DP ($p < 0,05$) e 24,27% $\pm$ DP ($p < 0,05$) na linhagem não tumorigênica RWPE-1 e na linhagem tumoral hormônio-independente PC-3, respectivamente. Em LNCaP houve um aumento na expressão desse gene em 37,92% $\pm$ DP ($p < 0,05$) após o tratamento com CPZ. De fato, CPZ modula os transcritos do gene *PCA3*, seu regulador antisenso *PRUNE2* e *ARHGAP21*.

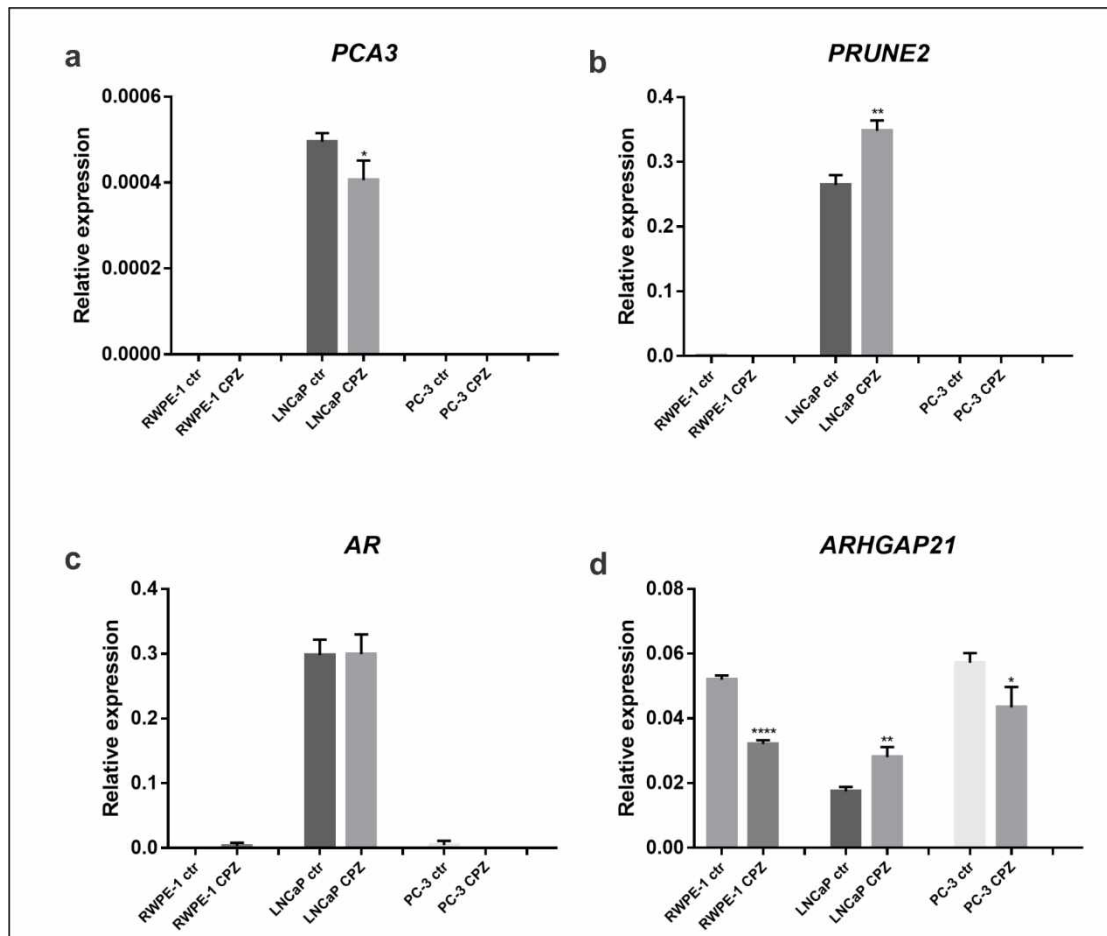


Figura 2. Perfil transcricional de linhagens de células prostáticas após tratamento por 72h com 25 μ M de Clorpromazina (CPZ). Células não tratadas foram usadas como controle (ctr). (a) Níveis de expressão relativa do gene *PCA3* (*Prostate Cancer Associated 3*). (b) Níveis de expressão relativa do gene *PRUNE2* (*Prune Homólogo 2*). (c) Níveis de expressão relativa do gene *AR* (*Androgen Receptor*). (d) Níveis de expressão relativa de *ARHGAP21* (*Rho GTPase activating protein 21*). A significância estatística é indicada como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

O CaP é uma doença associada à idade, sendo este também um fator de risco para desordens neurológicas degenerativas como DA (QIU; KIVIPELTO; VON STRAUSS, 2022), o qual apresenta características moleculares e patológicas semelhantes à esquizofrenia (SAVONENKO *et al.*, 2008). Utilizamos, então, *D. melanogaster* elav-GAL4 > UAS-BACE1, APP (*AD-like*) como organismo modelo de DA, no intuito de identificar o papel desses genes, bem como os efeitos da CPZ sobre esta doença. Primeiramente foi avaliada a toxicidade do fármaco e sua influência/interferência sobre a sobrevivência das moscas elav-GAL4. Os

resultados apresentados na **Figura 3a** mostram que, em relação ao controle sem tratamento, a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu a sobrevivência dos indivíduos. Já nas concentrações de 400 $\mu\text{g/mL}$ e 800 $\mu\text{g/mL}$, houve um aumento na sobrevivência em 25,97% e 44,52%, respectivamente, durante 21 dias. Nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferenças significativas em relação ao controle e, portanto, não foram utilizadas nos testes subsequentes. Ainda, foram avaliadas as taxas de eclosão de cada tratamento (**Figura 3b**) e, em todas as concentrações de CPZ, houve um aumento na taxa de eclosão em relação ao controle não-tratado. Estes dados evidenciam a não-toxicidade nem prejuízos no ciclo de vida das moscas utilizando CPZ nas concentrações estabelecidas nesse estudo, com exceção da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, esses resultados nos levaram a investigar os efeitos em uma concentração de CPZ ainda maior, 1600 $\mu\text{g/mL}$, refazendo o ensaio de toxicidade em moscas *AD-Like* nas maiores concentrações (**Figura 3c**). Contudo, mesmo na concentração de 1600 $\mu\text{g/mL}$ não houve indícios de toxicidade para as moscas *AD-Like*, bem como nas concentrações de 400 $\mu\text{g/mL}$ e 800 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3c**).

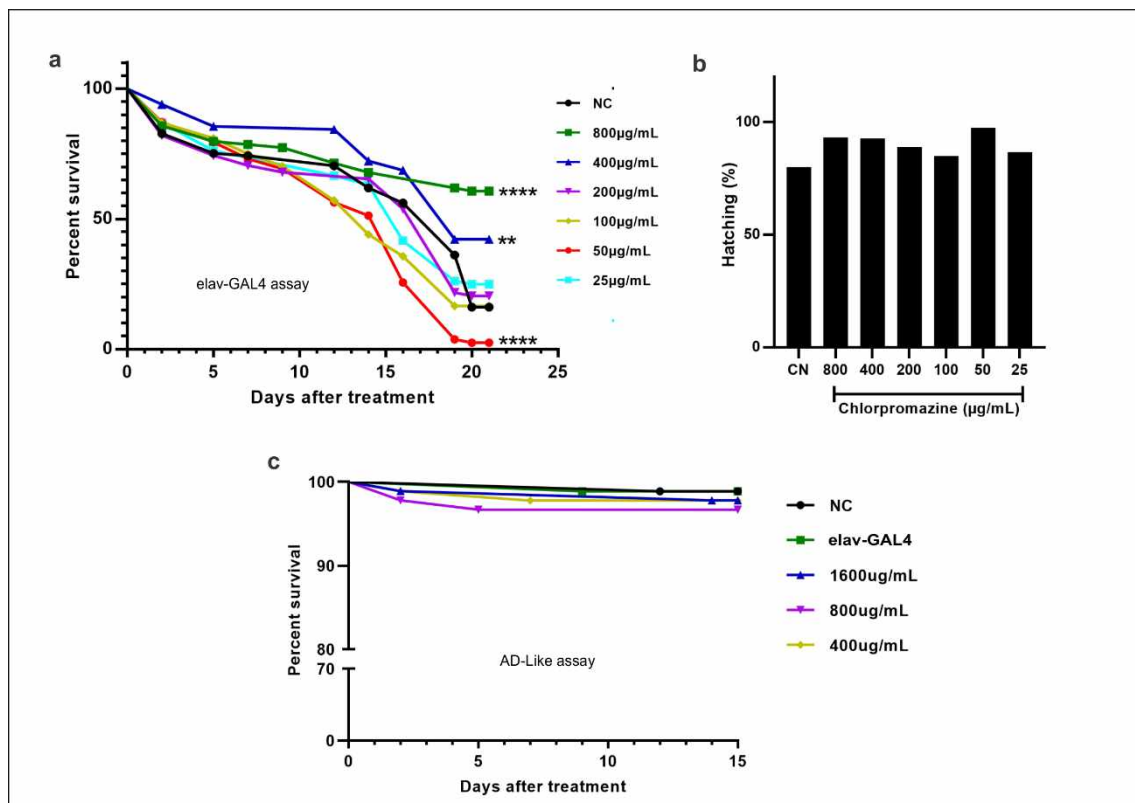


Figura 3. Efeito do tratamento com CPZ sobre a sobrevivência e taxa de eclosão em *D. melanogaster*. (a) Taxa de sobrevivência de *D. melanogaster* elav-GAL4 após tratamento durante 21 dias com 25 a 800 µg/mL de Clorpromazina (CPZ) e (b) respectiva taxa de eclosão ($n \geq 90$ em cada grupo). (c) Taxa de sobrevivência de moscas *D. melanogaster* elav-GAL4 >UAS-BACE1, APP (*AD-Like*) após 15 dias de tratamento com 400 a 1600 µg/mL de CPZ. Os resultados de sobrevivência foram comparados com moscas não tratadas (NC). Moscas elav-GAL4 referem-se ao controle negativo (sem fenótipo de Alzheimer). A significância estatística é indicada como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Para validar o fenótipo de DA, as moscas foram submetidas ao teste de escalada, uma vez que essa capacidade é comprometida nos indivíduos *AD-Like* (BATISTA *et al.*, 2021; MALTA *et al.*, 2022). Conforme **Figura 4** houve uma redução na capacidade de escalada das moscas *AD-Like* em $38,56\% \pm DP$ ($p < 0,01$) em relação às moscas-controle elav/Gal4 sem DA. Com relação ao efeito da CPZ sobre a escalada, quando a 400 µg/mL, o fármaco reduziu a escalada em $40,62\% \pm DP$ em relação às moscas *AD-Like* não tratadas, respectivamente. Contudo, na concentração de 1600 µg/mL, houve melhora na escalada de $31,94\% \pm DP$ ($p < 0,05$) em relação ao grupo não tratado.

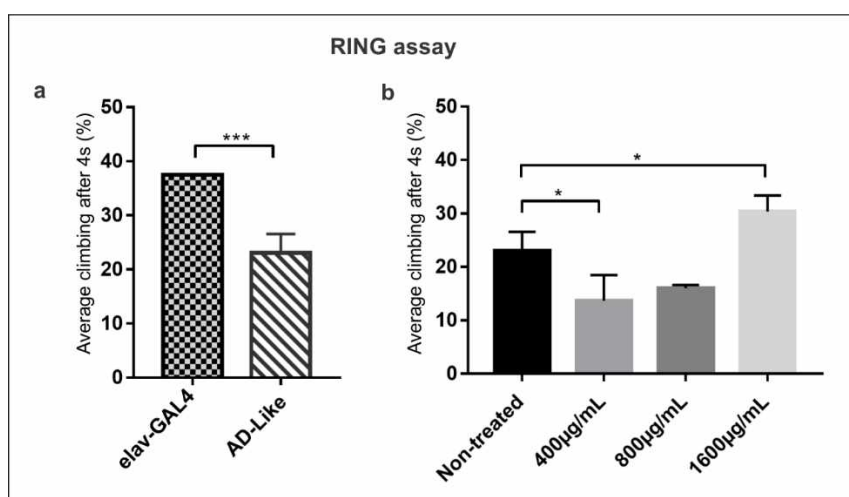


Figura 4. Ensaio de geotaxia negativa iterativa rápida (RING). (a) Capacidade de escalada de moscas *AD-Like* comparada a indivíduos elav-GAL4. (b) Capacidade de escalada de moscas *AD-Like* após tratamento com água (veículo) e CPZ (400 µg/mL, 800 µg/mL e 1600 µg/mL) após 15 dias. ($n \geq 30$ em cada tratamento). A significância estatística é indicada como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para verificar a ação da CPZ na redução da neurodegeneração, realizamos uma análise histopatológica do cérebro de moscas *AD-Like* tratadas por 15 dias após a eclosão (**Figura 5**). A ocorrência de neurodegeneração se manifesta pelo aparecimento de lesões vacuolares na região central do cérebro. As moscas tratadas com 800 e 1600 $\mu\text{g/mL}$ de CPZ (**Figuras 5e** e **5f**, respectivamente) apresentaram características histológicas semelhantes ao grupo controle elav-GAL4 (**Figura 5a-b**), livre de vacúolos. Nos cortes histológicos do grupo controle e do grupo tratado com 400 $\mu\text{g/mL}$ (**Figuras 5c** e **5d**, respectivamente), o cérebro apresenta numerosas lesões vacuolares. Portanto, o tratamento das moscas com 400 $\mu\text{g/mL}$ reduz a capacidade de escalada, associada à presença de vacúolos no cérebro. Já o tratamento com 1600 $\mu\text{g/mL}$ melhora a capacidade de escalada, além de reduzir a presença dos vacúolos nos cortes histológicos.

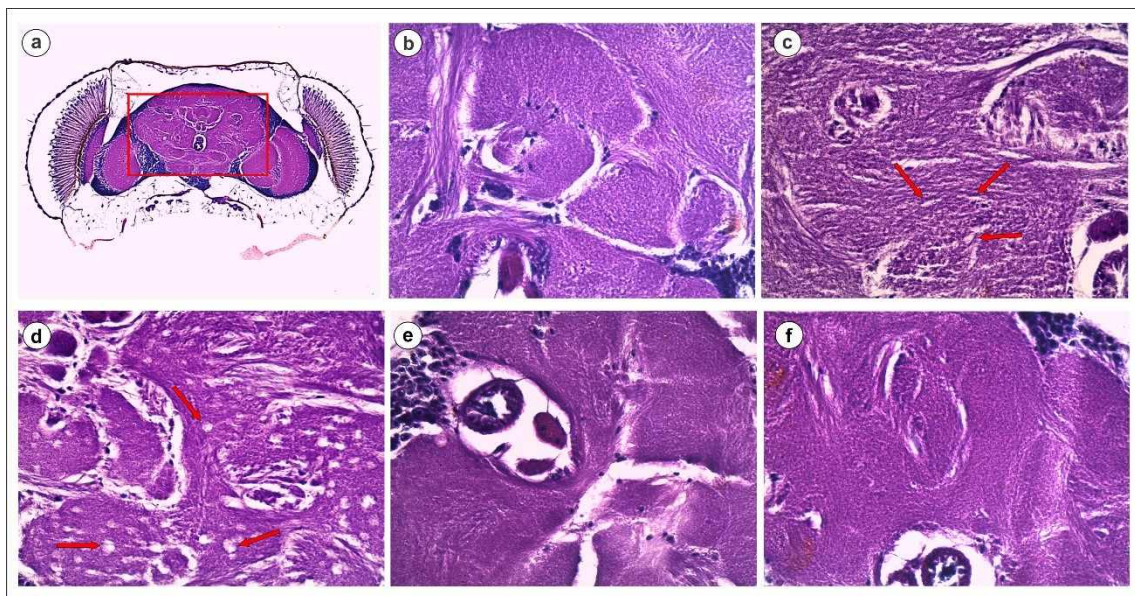


Figura 5. Histologia do cérebro de *D. melanogaster AD-like* tratada e não tratada com Clorpromazina. O painel representa seções de parafina de 3 μm do mesencéfalo de moscas de 15 dias após a eclosão. (a) Controle: elav-Gal não tratada (aumento de 40x), indicando as áreas do cérebro onde as imagens foram capturadas para análise. (b) elav-GAL4 não tratada, 100x. (c) Mosca *AD-Like* tratadas com água (diluente), 100x. (d) Mosca *AD-Like* tratadas com Clorpromazina (400 $\mu\text{g/mL}$), 100x. (e) (c) Mosca *AD-Like* tratadas com Clorpromazina (800 $\mu\text{g/mL}$), 100x; (f) Mosca *AD-Like* tratadas com Clorpromazina (1600 $\mu\text{g/mL}$), 100x. As setas vermelhas indicam os vacúolos de neurodegeneração.

Filogeneticamente, o gene *PCA3* surgiu em primatas, supostamente a partir de uma sequência viral incorporada ao DNA ancestral (LEMONS *et al.*, 2016b; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Clarke *et al.* encontraram homólogos de *PCA3* humanos em 14 mamíferos complexos, incluindo 4 primatas não humanos (CLARKE *et al.*, 2009). Nesse contexto, apenas, os genes homólogos em *D. melanogaster* ao *PRUNE2* (CG4361-Pn e CG11593) e *ARHGAP21* (CG1412 RhoGAP19D) humanos foram avaliados (**Figura 6**).

É interessante notar que nas moscas elav-Gal4, todos os genes homólogos se encontram mais expressos na cabeça que no tórax/abdômen (**Figura 6**). Em moscas *AD-Like* esse perfil permanece para os homólogos ao *PRUNE2* CG4362 (**Figura 6a**) e, especialmente, CG11593 (**Figura 6b**). Não há diferença na expressão de CG1412 entre cabeça e tórax/abdômen de moscas *AD-Like* (**Figura 6c**). Além disso, para o modelo, a expressão dos genes homólogos foi superior nas moscas *AD-Like* ($p < 0,05$), tanto na cabeça quanto no tórax/abdômen, em relação às elav/Gal4, as quais não apresentam o fenótipo neurodegenerativo.

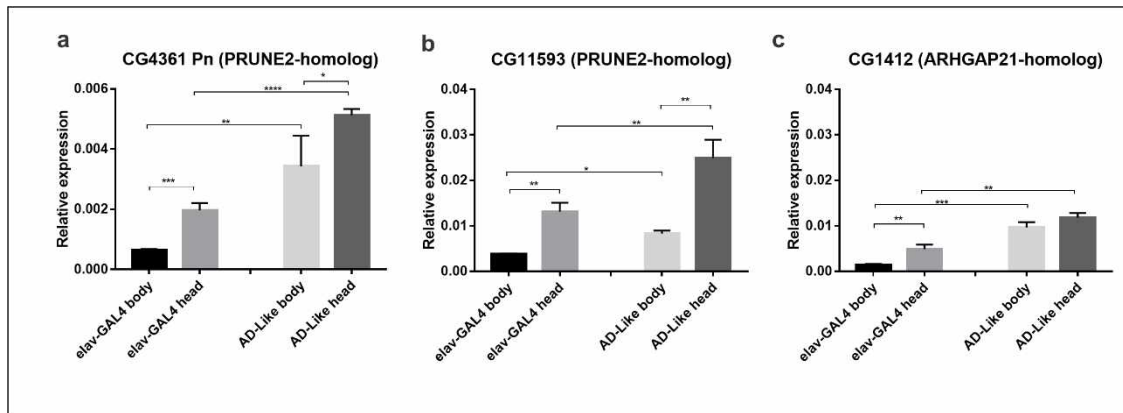


Figura 6: Expressão relativa de genes ortólogos ao *PRUNE2* e *ARHGAP21* em *D. melanogaster* elav-GAL4 e *AD-Like*. (a) Expressão de CG4361-Pn (ortólogo de *PRUNE2*) em elav-GAL4 e em *AD-Like* comparando tórax/abdômen versus cabeça. (b) Expressão de CG11593 (ortólogo de *PRUNE2*) em elav-GAL4 e em *AD-Like* comparando tórax/abdômen versus cabeça. (c) Expressão de CG1412 *RhoGAP19D* (ortólogo de *ARHGAP21*) em elav-GAL4 e em *AD-Like* comparando tórax/abdômen versus cabeça. A significância estatística é indicada como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Após o tratamento com CPZ (**Figura 7**), em relação a CG4361-Pn (ortólogo de *PRUNE2*), quando analisados o tórax/abdômen (**Figura 7a**) e a cabeça (**Figura 7b**), houve uma maior expressão do gene em ambas as regiões após o tratamento em comparação com o *AD-Like* ($p < 0,05$). Esse aumento foi menos expressivo na maior concentração (1.600 µg/mL). Com relação ao gene CG11593 (ortólogo de *PRUNE2*), quando analisado no tórax/abdômen das moscas (**Figura 7c**), seus transcritos aumentaram em 75% ±DP no tratamento com 400µg/mL de CPZ, sendo esse incremento menor no tratamento com 1.600 µg/mL. Na cabeça (**Figura 7d**), apesar do gene CG11593 estar mais expresso em moscas *AD-Like*, o tratamento de CPZ não alterou sua expressão.

Para o gene CG1412 (ortólogo de *ARHGAP21*), quando analisados o tórax/abdômen das moscas (**Figura 7e**), seus níveis de expressão aumentaram 160% ±DP em relação ao grupo *AD-Like* sem tratamento, quando CPZ foi utilizada a 400 µg/mL. Entre os tratamentos, a menor expressão foi verificada quando CPZ foi utilizada a 1600µg/mL ($p < 0,05$). Nas cabeças das moscas tratadas com CPZ houve um aumento nos níveis de CG1412 (**Figura 7f**).

Portanto, houve uma correlação entre o fenótipo de DA, o tratamento com CPZ e o perfil de expressão dos genes homólogos ao *PRUNE2* e *ARHGAP21*, em que a expressão desses genes foi aumentada com o tratamento com CPZ, sobretudo na concentração de 400 ug/mL, uma dose que apresentou toxicidade e nenhuma melhora no fenótipo de DA. Já em concentrações superiores, como a de 1600 ug/mL observou-se ainda expressão aumentada desses genes, e melhora no desempenho de drosófilas machos com fenótipo DA.

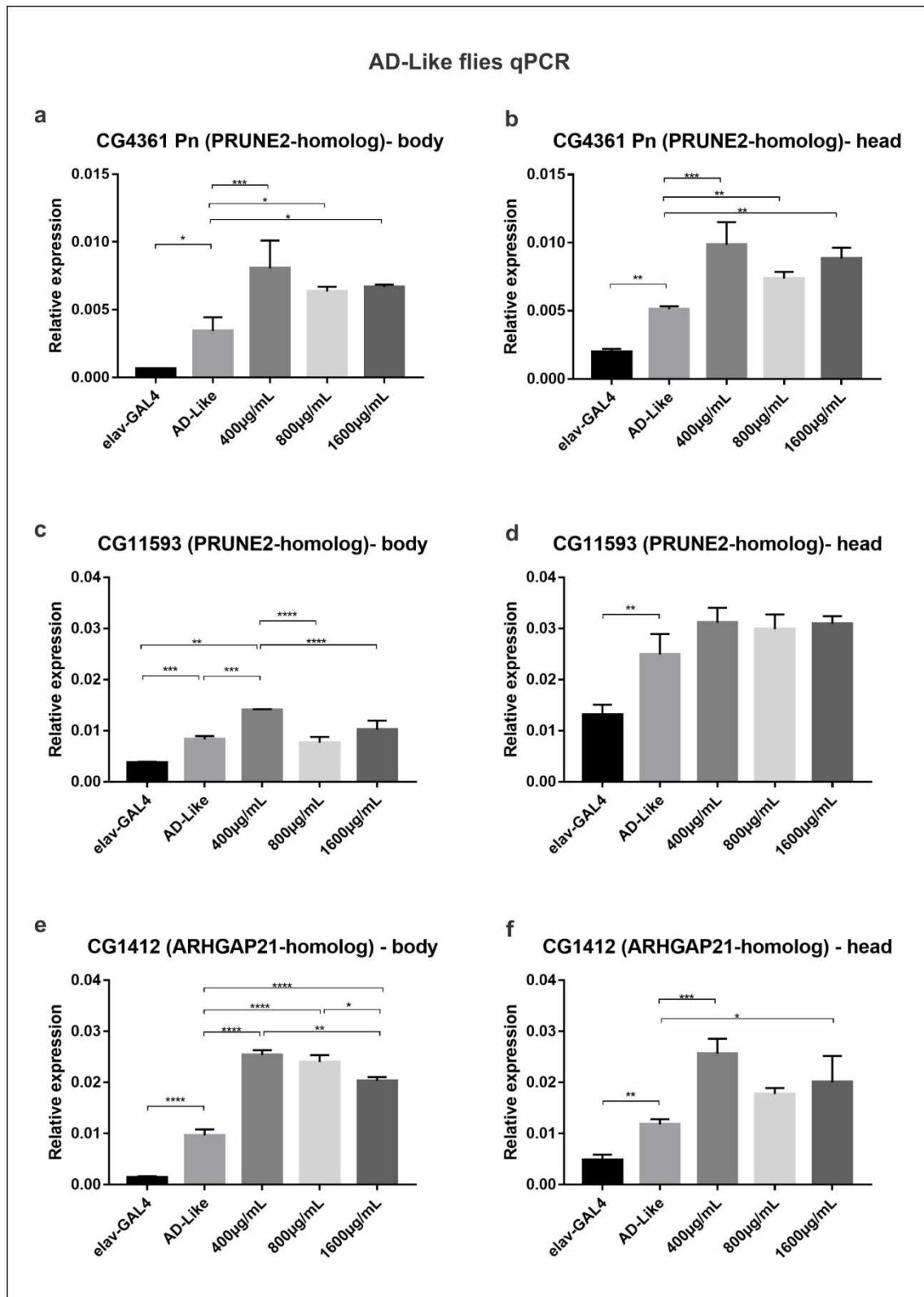


Figura 6. Expressão relativa de genes ortólogos ao *PRUNE2* e *ARHGAP21* em *D. melanogaster* AD-Like. (a) Expressão no tórax/abdômen de *CG4361-Pn* (ortólogo de *PRUNE2*). (b) Expressão na cabeça do gene *CG4361-Pn*. (c) Expressão no tórax/abdômen de *CG11593* (ortólogo de *PRUNE2*). (d) Expressão na cabeça de *CG11593*. (e) Expressão

no tórax/abdômen do gene *CG1412 RhoGAP19D* (ortólogo de *ARHGAP21*). (f) Expressão na cabeça do gene *CG1412 RhoGAP19D*. elav-GAL4 foi usado como controle negativo para o modelo de doença de Alzheimer. Moscas *AD-Like* foram tratadas com 400µg/mL, 800µg/mL e 1600µg/mL de CPZ. Moscas *AD-Like* sem qualquer tratamento foram utilizadas como controle positivo para a doença de Alzheimer. (n ≥ 40 em cada tratamento). A significância estatística é indicada como * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

4. DISCUSSÃO

Com o advento da medicina moderna e o modelo socio-estrutural favorecendo a longevidade dos seres humanos, há um aumento na incidência de doenças associadas a idade como o CaP e a DA. De fato, os eventos moleculares e a intrincada rede de mecanismos que conduzem à transformação maligna e à progressão tumoral podem ser comuns a outras doenças crônicas, incluindo neurodegenerativas. A presença de *PCA3* em exossomos circulantes do líquido cérebro-espinhal corroboram esse fato (GUI *et al.*, 2015a) e sustentam uma ponte molecular entre o CaP e DA. Exossomos também são importantes na cascata metastática de tumores (WORTZEL *et al.*, 2019) e, no CaP, já foram identificadas vesículas extracelulares com transcritos do *PCA3* (DUIJVESZ *et al.*, 2011; HENDRIKS *et al.*, 2016). Neste estudo, estabelecemos, pela primeira vez, a relação entre o eixo *PCA3-ARHGAP21-PRUNE2* no CaP e DA, bem como os efeitos do tratamento com CPZ em ambas as doenças, modulando os genes-alvo.

Quando células de CaP foram tratadas com CPZ, a droga se mostrou ativa e menos citotóxica à linhagem não-tumorigênica após 72 horas. O efeito visualizado apenas no maior tempo de tratamento pode estar relacionado à capacidade da CPZ em inibir a síntese de DNA, reprimindo a proliferação e/ou modulação de fatores de transcrição que geram respostas a longo prazo (KAMGAR-DAYHOFF; BRELIDZE, 2021). Considerando os gene-alvo, em células LNCaP, CPZ diminuiu os níveis de *PCA3*, o qual sabidamente é um oncogene transdominante negativo capaz de conduzir à edição do *PRUNE2* por meio da formação de uma unidade funcional dentro de um *locus* alélico (SALAMEH *et al.*, 2015; SMOLLE *et al.*, 2017). Portanto, o aumento nos níveis transcricionais de *PRUNE2* sinalizam para o efeito da droga no eixo de estudo. Já os transcritos de *ARHGAP21* aumentaram na LNCaP. Como

nosso grupo de pesquisa demonstrou o papel desse gene na regulação positiva da transcrição de *PCA3* (dados não publicados – Capítulo 2- Artigo 1) sugerimos que esta seja uma tentativa das células tumorais de restabelecer os níveis de *PCA3*, ativando sua transcrição, para, assim, sustentar sua malignidade. Nas células PC-3, hormônio-independente e que não expressam *PCA3*, houve uma diminuição nos transcritos de *ARHGAP21*.

Em PC-3 o silenciamento de *ARHGAP21* gera uma diminuição na proliferação celular, principalmente via RhoA (Ras homolog family member A) e RhoC (Ras homolog family member C) (LAZARINI *et al.*, 2013). Portanto, além de modular o gene *PCA3*, CPZ também é capaz de atuar em mecanismos associados à progressão do CaP, o que a torna interessante enquanto estratégia de controle da doença. De fato, o chamado reposicionamento de drogas tem se mostrado uma alternativa eficaz para a utilização de drogas em doenças além daquelas para as quais foram desenvolvidas. Há uma economia de custos financeiros e de tempo, o que se mostra extremamente relevante para problemas crônicos, epidemiologicamente alarmantes e de difícil tratamento (XUE *et al.*, 2018).

A expressão diferencial de *PCA3* em doenças neurodegenerativas já vem sendo descrita nos últimos anos, sugerindo o seu papel tanto como biomarcador, quanto relacionado na patogênese de Alzheimer e Parkinson, (GAROFALO *et al.*, 2021; GUI *et al.*, 2015b; LEMOS *et al.*, 2019a). Nossos ensaios em *D. melanogaster*, em consonância com dados já publicados (MALTA *et al.*, 2022), validou o modelo da DA, caracterizado pela super-expressão de A β via sistema driver/responder (Chakraborty *et al.*, 2011; da Costa Silva *et al.*, 2022) com fenótipo característico de neurodegeneração visualizado na histologia e capacidade reduzida de escalada em comparação às moscas controle. Com o tratamento com CPZ, em suas maiores concentrações, houve reversão de tais características, com melhora do fenótipo de neurodegeneração evidente no tratamento com 1600 $\mu\text{g/mL}$. Ueda *et al.* descreveu o efeito protetivo de clorpromazina contra a toxicidade de A β em culturas primárias de neurônios corticais de camundongo, com redução no influxo de Ca $^{2+}$ em canais de cálcio tipo L (UEDA *et al.*, 1997). Também já foi descrito efeito neuroprotetor em células PC12, utilizada em estudos de neurociência e toxicologia (KIM *et al.*, 2000).

Contudo, o uso clínico de CPZ é controverso, sendo a depressão um de seus efeitos colaterais (JIANG *et al.*, 2017), o que pode agravar o processo associado ao Alzheimer e, possivelmente, contribuir para a sua etiologia devido aos efeitos no sistema colinérgico cerebral (OKEN, 1995). Mulsant e colaboradores, inclusive, associaram quadros de pacientes com depressão psicótica grave com a administração inadequada de medicação neuroléptica (MULSANT *et al.*, 1997). De fato, nossos dados evidenciam a importância da dose da droga a ser administrada e seu tempo de uso. Além do agravamento do fenótipo de DA quando CPZ foi utilizada a 400 µg/mL, os ensaios de expressão gênica e modulação dos ortólogos evidenciam um aumento dos transcritos nas menores concentrações. Nossos resultados sugerem que a superpressão de *PRUNE2* e *ARHGAP21*, por meio da análise de seus ortólogos, estão relacionados ao fenótipo de DA, no qual ocorre reversão nas maiores concentrações de CPZ.

A literatura científica carece de informação sobre o papel de *PRUNE2* em doenças neurodegenerativas, mas este tem sido apresentado como um gene de susceptibilidade para DA. Em cérebros de camundongo, sua expressão é predominante em neurônios dos núcleos motores do nervo craniano e neurônios motores, atuando como pró-apoptótico em células neuronais (LI *et al.*, 2011). Ao analisar o genótipo de pacientes com Alzheimer, Potkin *et al.* encontraram correlação entre a atrofia do hipocampo e mutações no gene *PRUNE2* (POTKIN *et al.*, 2009). Quanto ao *ARHGAP21*, seus níveis de expressão são diminuídos após tratamento com verbenalin, composto que teve atividade neuroprotetora em ensaios *in vitro* com células de neuroblastoma SHSY5Y com redução na toxicidade induzida pelo amiloide beta (FERDOUSI *et al.*, 2020), o que pode ser um indício que níveis elevados de *ARHGAP21* podem favorecer a progressão da DA.

Por fim, destacamos as interações medicamentosas, que necessitam ser cuidadosamente avaliadas, sobretudo em pacientes idosos que, em geral, apresentam comorbidades, inclusive CaP e DA. Nesse contexto, evidenciamos a importância de serem desenvolvidas novas gerações da droga, mapeando a modulação da via *PCA3-ARHGAP21-PRUNE2*, em uma interface entre engenharia genética, bioinformática e outras ferramentas de biologia molecular.

CONCLUSÃO

O CaP e o Alzheimer são duas doenças que acometem um expressivo número de indivíduos em idade avançada. Neste estudo, correlacionamos a expressão de *PRUNE2* e *ARHGAP21*, envolvidos no mecanismo de regulação via *PCA3*, com ambas as doenças. Além disso, a CPZ agiu sobre células tumorais prostáticas e reverteu o fenótipo de DA em *D. melanogaster*, modulando os genes-alvo. Propomos um mecanismo molecular comum ao CaP e DA, abrindo novas possibilidades de desenhos terapêuticos, os quais necessitam ser amplamente investigados.

REFERENCIAS

2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 16, n. 3, p. 391–460, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/alz.12068>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

BALLENTINE CARTER, H.; COFFEY, Donald S. The prostate: An increasing medical problem. *The Prostate*, v. 16, n. 1, p. 39–48, 1 jan. 1990. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pros.2990160105>>. Acesso em: 4 out. 2022.

BATISTA, Letícia Leandro *et al.* Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease. *Scientific Reports 2021 11:1*, v. 11, n. 1, p. 1–12, 27 maio 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-90749-8>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

BRANDÃO, Caroline Ribeiro. Empregando a proteômica para compreender os mecanismos de ação dos antipsicóticos em oligodendrócitos humanos [recurso eletrônico]: Employing proteomics to understand the mechanisms of action of antipsychotics in human oligodendrocytes. *Dissertação de mestrado*, 2018. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/1060483>>. Acesso em: 5 out. 2022.

BREIJYEH, Zeinab *et al.* Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules 2020, Vol. 25, Page 5789*, v. 25, n. 24, p. 5789, 8 dez. 2020a. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/24/5789/htm>>. Acesso em: 6 out. 2022.

BREIJYEH, Zeinab *et al.* Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules 2020, Vol. 25, Page 5789*, v. 25, n. 24, p. 5789, 8 dez. 2020b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/24/5789/htm>>. Acesso em: 28 out. 2022.

BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

CAO, Yang *et al.* Dnr1 mutations cause neurodegeneration in *Drosophila* by activating the innate immune response in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 19, p. E1752–E1760, 7 maio 2013. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1306220110>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

CHAKRABORTY, Ranjita *et al.* Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's Disease Model: Pharmacological Rescue of Cognitive Defects. *PLOS ONE*, v. 6, n. 6, p. e20799, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020799>>. Acesso em: 26 set. 2022.

CLARKE, Raymond A. *et al.* New Genomic Structure for Prostate Cancer Specific Gene PCA3 within BMCC1: Implications for Prostate Cancer Detection and Progression. *PLOS ONE*, v. 4, n. 3, p. e4995, 25 mar. 2009. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004995>>. Acesso em: 27 out. 2022.

CSATARY, Laszlo K. CHLORPROMAZINES AND CANCER. *The Lancet*, v. 300, n. 7772, p. 338–339, 12 ago. 1972. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673672929558/fulltext>>. Acesso em: 5 out. 2022.

DA COSTA SILVA, Jéssica Regina *et al.* Differential gene expression by RNA-seq during Alzheimer's disease-like progression in the *Drosophila melanogaster* model. *Neuroscience Research*, v. 180, p. 1–12, 1 jul. 2022. Acesso em: 26 set. 2022.

DE-PAULA, Vanessa J. *et al.* Alzheimer's disease. *Subcellular Biochemistry*, v. 65, p. 329–352, 29 maio 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5416-4_14>. Acesso em: 9 out. 2022.

DRYSDALE, Rachel. FlyBase : a database for the *Drosophila* research community. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 420, p. 45–59, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-583-1_3>. Acesso em: 7 nov. 2022.

DUIJVESZ, Diederick *et al.* Exosomes as Biomarker Treasure Chests for Prostate Cancer. *European Urology*, v. 59, n. 5, p. 823–831, 1 maio 2011. Acesso em: 26 set. 2022.

DURAND, Xavier *et al.* Progensa™ PCA3 test for prostate cancer. <http://dx.doi.org/10.1586/erm.10.122>, v. 11, n. 2, p. 137–144, mar. 2014. Disponível

em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erm.10.122>>. Acesso em: 9 out. 2022.

FERDOUSI, Farhana *et al.* Microarray analysis of verbenalin-treated human amniotic epithelial cells reveals therapeutic potential for Alzheimer's Disease. *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 6, p. 5516, 3 mar. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7138585/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)>. Acesso em: 26 set. 2022.

FERREIRA, Luciana Bueno; NEVES, Adriana Freitas; *et al.* Abstract 201: DD3/PCA3 non-coding RNA regulates prostate cancer cell survival and modulates AR signaling. 15 abr. 2012, [S.l.]: American Association for Cancer Research (AACR), 15 abr. 2012. p. 201–201. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/72/8_Supplement/201>. Acesso em: 27 maio 2021.

FERREIRA, Luciana Bueno; PALUMBO, Antonio; *et al.* PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer*, v. 12, n. 1, p. 507, 6 nov. 2012. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-507>>. Acesso em: 23 fev. 2021.

FERRI, Cleusa P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, v. 366, n. 9503, p. 2112–2117, 17 dez. 2005. Acesso em: 5 out. 2022.

FREITAS NEVES ORIENTADOR, Adriana; RICARDO GOULART, Luiz. *VARIAÇÕES TRANSCRICIONAIS DOS GENES AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 E PSMA E IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CÂNCER DE PRÓSTATA*. . [S.l.: s.n.], 2007. . Acesso em: 13 fev. 2021.

GARGANO, Julia Warner *et al.* Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, v. 40, n. 5, p. 386–395, 1 maio 2005. Acesso em: 6 nov. 2022.

GAROFALO, Maria *et al.* Advances with Long Non-Coding RNAs in Alzheimer's Disease as Peripheral Biomarker. *Genes* 2021, Vol. 12, Page 1124, v. 12, n. 8, p. 1124, 24 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4425/12/8/1124/htm>>. Acesso em: 27 set. 2022.

GUI, Ya Xing *et al.* Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, v. 6, n. 35, p. 37043–37053, 2015a. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4741914/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)>. Acesso em: 26 fev. 2021.

GUI, Ya Xing *et al.* Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, v. 6, n. 35, p. 37043, 11 nov. 2015b. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4741914/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)>. Acesso em: 26 set. 2022.

GUO, Weiyun *et al.* Association of ARHGAP18 polymorphisms with schizophrenia in the Chinese-Han population. *PLOS ONE*, v. 12, n. 4, p. e0175209, 1 abr. 2017. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175209>>. Acesso em: 7 nov. 2022.

HAMPEL, Harald *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/141/7/1917/5023826>>. Acesso em: 29 nov. 2022.

HENDRIKS, Rianne J. *et al.* Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary sediments and exosomes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 54, n. 3, p. 483–492, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2015-0599/html?casa_token=qOEKA8e8xH0AAAAA%3A3HluM31rgSUF9GjfzBKADB_6u_HDxFxiUNMTOfvFMERyB5JamCsM-oFoSGW40IgBMrURDX31pb0>. Acesso em: 26 set. 2022.

HESSELS, Daphne; SCHALKEN, Jack A. *The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. Nature Reviews Urology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrurol.2009.40>>. Acesso em: 27 maio 2021. , maio 2009

JIANG, Ming Di *et al.* Drug induces depression-like phenotypes and alters gene expression profiles in Drosophila. *Brain Research Bulletin*, v. 132, p. 222–231, 1 jun. 2017. Acesso em: 20 set. 2022.

KAMGAR-DAYHOFF, Pareesa; BRELIDZE, Tinatin I. Multifaceted effect of chlorpromazine in cancer: implications for cancer treatment. *Oncotarget*, v. 12, n. 14, p. 1406, 7 jul. 2021. Disponível em: <pmc/articles/PMC8274723/>. Acesso em: 19 out. 2022.

KIM, Tae-Suk *et al.* The Effects of Psychotropic Drugs on the beta-Amyloid-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells. *Journal of Korean Neuropsychiatric Association*, p. 936–943, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>. Acesso em: 20 set. 2022.

LABUZEK, Krzysztof *et al.* Chlorpromazine and loxapine reduce interleukin-1 β and interleukin-2 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *European Neuropsychopharmacology*, v. 15, n. 1, p. 23–30, 1 jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X04000574>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

LAZARINI, Mariana *et al.* ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1832, n. 2, p. 365–374, 2013.

LEE, George Leighton; DOBI, Albert; SRIVASTAVA, Shiv. *Prostate cancer: Diagnostic performance of the PCA3 urine test. Nature Reviews Urology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <www.nature.com/nrurol>. Acesso em: 10 fev. 2021. , 11 abr. 2011

LEITÃO, Catarina *et al.* The Impact of Lifestyle on Prostate Cancer: A Road to the Discovery of New Biomarkers. *Journal of Clinical Medicine* 2022, Vol. 11, Page 2925, v. 11, n. 10, p. 2925, 22 maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/11/10/2925/htm>>. Acesso em: 4 out. 2022.

LEMOS, Ana Emília Goulart *et al.* PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumor Biology* 2016 37:8, v. 37, n. 8, p. 11339–11348, 9 mar. 2016a. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5012-3>>. Acesso em: 3 out. 2022.

LEMOS, Ana Emília Goulart *et al.* PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumor Biology*, v. 37, n. 8, p. 11339–11348, 1 ago. 2016b. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5012-3>>. Acesso em: 27 maio 2021.

LEMOS, Ana Emília Goulart *et al.* The long non-coding RNA PCA3: an update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. *Oncotarget*, v. 10, n. 61, p. 6589, 11 nov. 2019a. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6859920/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33059920/)>. Acesso em: 26 set. 2022.

LEMOS, Ana Emília Goulart *et al.* The long non-coding RNA PCA3: an update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. *Oncotarget*, v. 10, n. 61, p. 6589, 11 nov. 2019b. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6859920/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33059920/)>. Acesso em: 27 out. 2022.

LI, Shimo *et al.* The expression and localization of Prune2 mRNA in the central nervous system. *Neuroscience Letters*, v. 503, n. 3, p. 208–214, 10 out. 2011. Acesso em: 26 set. 2022.

LITKE, Rachel *et al.* Modifiable Risk Factors in Alzheimer Disease and Related Dementias: A Review. *Clinical Therapeutics*, v. 43, n. 6, p. 953–965, 1 jun. 2021. Acesso em: 4 out. 2022.

LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco *et al.* History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Annals of clinical psychiatry: official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*, v. 17, n. 3, p. 113–135, jul. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16433053/>>. Acesso em: 4 out. 2022.

MALTA, Serena Mares *et al.* Identification of bioactive peptides from a Brazilian kefir sample, and their anti-Alzheimer potential in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports* 2022 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–12, 30 jun. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-022-15297-1>>. Acesso em: 26 set. 2022.

MANN, Sukhmanjeet Kaur; MARWAHA, Raman. Chlorpromazine. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, p. 925–929, 17 maio 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553079/>>. Acesso em: 9 out. 2022.

MAROTTE, Delphine *et al.* Irradiation of localized prostate cancer in the elderly: A systematic literature review. *Clinical and Translational Radiation Oncology*, v. 35, p. 1–8, 1 jul. 2022. Acesso em: 28 nov. 2022.

MORTENSEN, P. B. Neuroleptic medication and reduced risk of prostate cancer in schizophrenic patients. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 85, n. 5, p. 390–393, 1 maio 1992. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0447.1992.tb10325.x>>. Acesso em: 5 out. 2022.

MULSANT, Benoit H. *et al.* Low use of neuroleptic drugs in the treatment of psychotic major depression. *The American journal of psychiatry*, v. 154, n. 4, p. 559–561, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9090348/>>. Acesso em: 27 set. 2022.

NOBARI, Hadi *et al.* A Brief Overview of the Effects of Exercise and Red Beets on the Immune System in Patients with Prostate Cancer. *Sustainability* 2022, Vol. 14, Page 6492, v. 14, n. 11, p. 6492, 26 maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2071-1050/14/11/6492/htm>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

OKEN, R. J. Antihistamines, a possible risk factor for alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, v. 44, n. 1, p. 47–48, 1 jan. 1995. Acesso em: 26 set. 2022.

OSPINA-ROMERO, Monica *et al.* Association Between Alzheimer Disease and Cancer With Evaluation of Study Biases: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open*, v. 3, n. 11, p. e2025515–e2025515, 2 nov. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2772918>>. Acesso em: 5 out. 2022.

PERNAR, Claire H. *et al.* The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 12, p. a030361, 1 dez. 2018. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/8/12/a030361.full>>. Acesso em: 2 out. 2022.

PODCASY, Jessica L.; EPPERSON, C. Neill. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/cepperson>, v. 18, n. 4, p. 437–446, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.31887/DCNS.2016.18.4/cepperson>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

POTKIN, Steven G. *et al.* Hippocampal Atrophy as a Quantitative Trait in a Genome-Wide Association Study Identifying Novel Susceptibility Genes for Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, v. 4, n. 8, p. e6501, 7 ago. 2009. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006501>>. Acesso em: 26 set. 2022.

QIU, Chengxuan; KIVIPERTO, Miia; VON STRAUSS, Eva. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.2/cqiu>, v. 11, n. 2, p. 111–128, 2022. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.31887/DCNS.2009.11.2/cqiu>>. Acesso em: 5 out. 2022.

REY, Marie Josèphe *et al.* Guidelines for the dosage of neuroleptics. I: Chlorpromazine equivalents of orally administered neuroleptics. *International Clinical Psychopharmacology*, v. 4, n. 2, p. 95–104, 1 abr. 1989. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/2568378>>. Acesso em: 9 out. 2022.

SALAMEH, Ahmad *et al.* PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 27, p. 8403–8408, 7 jul. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26080435/>>. Acesso em: 9 fev. 2021.

SARI MOTLAGH, Reza *et al.* The Risk of New Onset Dementia and/or Alzheimer Disease among Patients with Prostate Cancer Treated with Androgen Deprivation Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Urology*, v. 205, n. 1, p. 60–67, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.auajournals.org/doi/10.1097/JU.0000000000001341>>. Acesso em: 5 out. 2022.

SAVONENKO, A. V. *et al.* Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 14, p. 5585–5590, 8 abr. 2008. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0710373105>>. Acesso em: 19 out. 2022.

SEKIGUCHI, Mariko *et al.* ARHGAP10, which encodes Rho GTPase-activating protein 10, is a novel gene for schizophrenia risk. *Translational Psychiatry* 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–15, 22 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41398-020-00917-z>>. Acesso em: 7 nov. 2022.

SMOLLE, Maria A. *et al.* Current Insights into Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 473, v. 18, n. 2, p. 473, 22 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/2/473/htm>>. Acesso em: 26 set. 2022.

SOREQ, Lilach *et al.* Long Non-Coding RNA and Alternative Splicing Modulations in Parkinson's Leukocytes Identified by RNA Sequencing. *PLOS Computational Biology*, v. 10, n. 3, p. e1003517, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003517>>. Acesso em: 5 out. 2022.

TEIXEIRA, Andre A *et al.* Going viral? Linking the etiology of human prostate cancer to the PCA3 long noncoding RNA and oncogenic viruses. *EMBO Molecular Medicine*, v. 9, n. 10, p. 1327–1330, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.15252/emmm.201708072>>. Acesso em: 7 nov. 2022.

UEDA, Keiichi *et al.* Chlorpromazine reduces toxicity and Ca²⁺ uptake induced by amyloid β protein (25–35) in vitro. *Brain Research*, v. 748, n. 1–2, p. 184–188, 14 fev. 1997. Acesso em: 26 set. 2022.

VLACHOS, Nikolaos *et al.* Repurposing Antipsychotics for Cancer Treatment. *Biomedicines* 2021, Vol. 9, Page 1785, v. 9, n. 12, p. 1785, 28 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9059/9/12/1785/htm>>. Acesso em: 19 out. 2022.

WANG, Yue; LIU, Xiao Jun; YAO, Xu Dong. *Function of PCA3 in prostate tissue and clinical research progress on developing a PCA3 score. Chinese Journal of Cancer Research*. [S.l.]: AME Publishing Company. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4153936/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24153936/)>. Acesso em: 19 maio 2021. , 2014

WEI, John T. *et al.* Can Urinary PCA3 Supplement PSA in the Early Detection of Prostate Cancer? *Journal of Clinical Oncology*, v. 32, n. 36, p. 4066, 12 dez. 2014. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4265117/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24265117/)>. Acesso em: 3 out. 2022.

WORTZEL, Inbal *et al.* Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Developmental Cell*, v. 49, n. 3, p. 347–360, 6 maio 2019. Acesso em: 26 set. 2022.

XUE, Hanqing *et al.* Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 10, p. 1232, 13 jul. 2018. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6097480/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3097480/)>. Acesso em: 20 set. 2022.