

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUISA NOGUEIRA E SILVA

**EFEITOS CELULAR E MOLECULAR DE PEPTÍDEO MIMÉTICO À ARGONAUTA
4 EM LINHAGENS CELULARES PROSTÁTICAS**

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019

LUISA NOGUEIRA E SILVA

**EFEITOS CELULAR E MOLECULAR DE PEPTÍDEO MIMÉTICO À ARGONAUTA
4 EM LINHAGENS CELULARES PROSTÁTICAS**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Prof (a). Dr (a). Thaise Gonçalves de
Araújo**

**PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019**

LUISA NGUEIRA E SILVA

**Efeitos celular e molecular de peptídeo mimético à Argonauta 4 em linhagens celulares
prostáticas**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

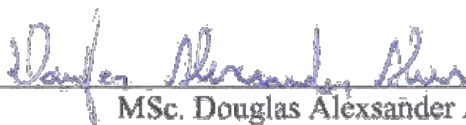
Banca examinadora:



Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – IBTEC
Presidente



MSc. Sara Teixeira Soares Mota – IBTEC
Membro



MSc. Douglas Alexander Alves – IBTEC
Membro

Patos de Minas - MG, dezembro de 2019.

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

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores que contribuem de forma única para o crescimento, evolução e reconhecimento da nossa ciência. Em especial aqueles os quais conheci, principalmente a minha orientadora Thaise, que como ela mesmo diz, mata um leão por dia para ver nosso sucesso e manter um laboratório produzindo estudos de excelente qualidade. Obrigada por essa grande experiência!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, pela proteção e por ser desde sempre meu refúgio e minha força. Sem suas bênçãos e graças eu jamais teria vencido esses 4 anos de grandes batalhas acadêmicas e pessoais. Obrigada por tanto!

À toda a minha família, que sempre foram os maiores apoiadores de tudo isso. Em especial meus amados pais, Braulina e José Adelço, por serem meus exemplos de esforço, dedicação, humildade e coragem, por sempre fazerem tudo o que podem para ver o meu sucesso e felicidade; aos meus irmãos Laura, Caroline e Willian, pelo amor incondicional e por compartilharem a vida comigo. Amo muito todos vocês!

À Profª. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, pela orientação desde o segundo semestre do curso, pela confiança, pela paciência diante das minhas dificuldades, por não me deixar desanimar dessa caminhada e principalmente por me acolher como uma verdadeira mãe no seu grupo de pesquisa; o que sou hoje tem muita inspiração por ela como profissional e pessoa.

À todos os docentes, por contribuírem de forma direta para o meu crescimento científico e formação acadêmica, e a todos os técnicos e funcionários da UFU – Patos de Minas, em especial a Luciana, por toda a dedicação em suas funções.

Aos colegas e membros do Laboratório de Genética e Biotecnologia – GBio e Laboratório de Cultura de Células Animais – LACCA por toda a colaboração e prestatividade.

À Isabela, ao Douglas, à Raquel, à Paulinha, à Carina e à Adriane, por dividirem seus conhecimentos comigo, pela parceria em incansáveis experimentos, nos momentos difíceis e nas alegrias. Desejo a vocês muito sucesso em todas as suas pesquisas.

Ao MSc. Douglas Alexsander Alves pela disponibilidade em participar da banca examinadora e a MSc. Sara Mota, não somente por ter aceito o convite para fazer parte desse momento, mas também por ter sido a responsável pelo meu primeiro passo na iniciação científica quando entrei na Biotecnologia. Obrigada por fazer parte da minha história!

À toda minha turma, aos que permaneceram e compartilham desse mesmo momento. Espero que seja um final de ciclo especial e que a graça de um bom estágio/mestrado/emprego caia sobre todos nós.

Ao Elcana e a Pequi, por serem os melhores presentes da graduação. Agradeço de coração por todos os momentos que vivemos, toda a paciência com meu mau humor matinal, os lanches na Amelinha, os trabalhos em grupo, por dividirem praticamente tudo comigo nesses

últimos anos. Tenham certeza que cheguei até aqui por apoio de vocês e levarei nossa amizade para a vida toda.

Às amigadas da vida: Isa, Carol, Kaka, Shurek, Laisão, Iara, Marina, Marilian, Carol Oliveira e Tamara. Obrigada por serem os melhores, por todo o carinho, amor e cumplicidade, principalmente nessa reta final, por comemorarem comigo cada conquista como se fossem suas.

Aos amigos de Rio Paranaíba, repúblicas Methiolatte e Macaúba, por tornarem a minha vida universitária mais divertida e cheia de boas lembranças. Gratidão por abrirem as suas portas e permitirem que eu me sinta acolhida em toda visita.

À Conceito Eventos, juntamente com todas as recepcionistas que fizeram e fazem parte da equipe, de forma especial a chefe Gabi, pela oportunidade de trabalhar com vocês e poder pagar os boletos.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é um importante problema de saúde pública com incidência e mortalidade crescentes, em índices alarmantes. Seu diagnóstico precoce é imprescindível para a cura, e se mostra desafiador, frente à uma doença assintomática e de crescimento lento. Nesse cenário, RNAs não codificantes (ncRNA) têm emergido como moléculas-chave na compreensão da biologia tumoral, destacando-se o *Prostate Cancer Associated 3 (PCA3)*, considerado um RNA longo não codificante (lncRNA) específico a condições malignas do órgão. Esse gene encontra-se envolvido no controle da sobrevivência de células neoplásicas, na regulação hormonal, na modulação da transição epitélio-mesenquimal e no processo de angiogênese. Portanto, é notória a necessidade de melhor compreender seu mecanismo transcricional, para assim definir novos caminhos terapêuticos contra o CaP. Propomos a utilização da nanobioplataforma de *Phage Display* para a descoberta de ligantes regulatórios do *PCA3*, visando modular sua expressão. Para isso, peptídeos ligantes à sua região promotora e miméticos à Argonauta 4 (AGO4) foram previamente selecionados. No presente estudo, a avaliação dos efeitos celulares mediados pelo tratamento com os fagos miméticos a AGO4 foi conduzida por ensaios de MTT. Para a linhagem RWPE-1 (não tumorigênica), os tratamentos por 24 horas com 10^5 ufc e 48 horas com 10^7 ufc foram citotóxicos ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Para a linhagem LNCaP (hormônio responsiva) o tratamento por 24 horas com 10^5 ufc diminuiu a viabilidade celular. Já a 10^9 ufc observou-se efeito proliferativo ($p < 0,01$). Para a linhagem PC3 (resistente à castração), após 48 horas, os fagos titulados a 10^5 ufc induziram a proliferação celular ($p < 0,05$). Quanto aos transcritos dos genes *AGO4*, *PRUNE2* e *PCA3*, estes se mostraram superexpressos na linhagem LNCaP comparados à PC3. Após tratamentos com as partículas fágicas, não foi verificada alteração na expressão mediada pelo peptídeo mimético à AGO4. Como a expressão de *PCA3* é regulada por andrógenos, sugerimos que estudos posteriores sejam realizados sem a suplementação de soro. Além disso, fatores transcricionais adicionais também devem ser incluídos, uma vez que hipotetizamos que apenas a AGO4 não seja suficiente na ativação do promotor do gene *PCA3*.

Palavras-chave: Câncer de próstata, lncRNA, peptídeo recombinante.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is an important public health problem with increasing incidence and mortality rates. The early diagnosis is essential for curing. However, the disease is challenge due to no specific symptoms and slow progression. In this scenario, non-coding RNAs have emerged as key molecules for understanding the tumor biology. Notably the Prostate Cancer Associated 3 (PCA3), a long non-coding RNA (lncRNA), is a specific marker for PCa, associated with neoplastic cell control, hormone regulation, epithelial mesenchymal transition and angiogenesis processes. In this context, is needed to better understand its transcriptional mechanism to define new therapeutic targets. We explored Phage Display nanoplatform for the discovery of PCA3 regulatory ligands, aiming to modulate its expression. Mimetic peptides to Argonauta 4 (AGO4) were previously selected by our group. In the present study, we evaluated the effects of AGO4 mimetic phages in prostate cells through MTT assays. For RWPE-1 (non-tumorigenic) cell line, treatments for 24 hours at 10^5 cfu and 48 hours at 10^7 cfu were cytotoxic ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). For LNCaP (responsive hormone) cell line, treatment for 24 hours with 10^5 cfu decreased cell viability, and with 10^9 cfu ($p < 0.01$) presented proliferative effect. For PC3 (castration resistant) cell line, after 48 hours, phages titrated at 10^5 cfu induced cell proliferation ($p < 0.05$). Considering qPCR assays, AGO4, PRUNE2 and PCA3 genes are overexpressed in LNCaP lineage compared to PC3. After treatment with phage particles, no change in AGO4 mimetic peptide-mediated expression was observed. As PCA3 expression is regulated by androgens, we suggest that further studies may be performed without serum supplementation. In addition, other transcriptional factors should also be included as we hypothesize that AGO4 alone do not activate PCA3 expression.

Key words: Prostate Cancer, lncRNA, recombinant peptide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADARs: Adenosinas desaminases
AGO: Argonauta
AGO4: Argonauta 4
AR: Receptor de Andr geno
B2M: Beta-2-Microglobulina
BAD: gene promotor de morte associado a Bcl-2
CaP: C ncer de Próstata
cDNA:  cido Desoxirribonucleico Complementar
CPRC: C ncer de Próstata Resistente   Castra o
DEPC: Dietil Pirocarbonato
DHT: Diidrotestosterona
DMEM: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DNA:  cido Desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsRNA: RNA de fita dupla
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
EIF2C: Fatores de inicia o eucarióticos
ERBB2: Receptor tirosina-proteína quinase
FBS: Soro Fetal Bovino
FSH: Hormônio f liculo estimulante
GST: Genes Supressores de tumores
HKGs: *housekeeping genes*
HPB: Hiperplasia Prostática Benigna
IFNB1: Fibrilina-1
IMDM: Meio de Dulbecco Modificado de Iscove
ITGB1: integrina β -1
LB: *Luria Bertani* (meio de cultura LB)
LH: Hormônio luteinizante
LHRH: Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
Linker 1: Domínio N-terminal, L1
Linker 2: Domínio N-terminal, L2
lncRNAs: RNAs longos não codificantes
MAP2K1: Proteína quiinase 1 ativada por mitógeno
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MHC: moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
miRNAs: microRNAs
MMLV-RT: Enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murino de Moloney.
mRNA:  cido Ribonucleico Mensageiro/RNA mensageiro
MTSS1: Proteína supressora metastática 1
MTT:brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
ncRNA: RNAs não codificantes
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
Oct4: Fator de transcri o ligador de octâmero 4
PAP: Fosfatase  cida Prostática
pb: Pares de Base
PBS: soluço salina tamponada

PCa: *Prostate Cancer*
PCA3: *Prostate Cancer Associated 3*
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PhD: *Phage Display*
PIK3R1: subunidade reguladora da fosfatidilinositol 3-quinase α
piRNAs: RNAs que interagem com PIWI
PRUNE2: Protein prune homolog 2
PSA: Antígeno Prostático Específico
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RdDM: metilação de DNA direcionada por RNA
RdRp: RNA polimerase dependente de RNA
RISC: Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA: Ácido Ribonucleico
RNase: Ribonuclease
RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
RT: Transcrição Reversa
siRNAs: Pequenos RNAs interferentes / *small interference RNA*
snoRNAs: Pequenos RNAs nucleolares
snRNAs: Pequenos RNAs nucleares
Sox2: Região determinadora de sexo Y-2
ssDNA: DNA de fita simples
ssRNA: RNA de fita simples
TERT: atividade da telomerase
VEGFA: Fator de crescimento endotelial vascular A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Definindo o câncer.....	14
2.2 O Câncer de Próstata e seus atuais desafios.....	15
2.3 <i>Prostate Cancer Associated 3 (PCA3)</i>	21
2.4 <i>Phage Display</i> na busca de fatores de transcrição.....	22
2.5 Argonauta 4.....	25
3 OBJETIVOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Linhagens Celulares	29
4.2 Purificação das partículas virais recombinantes.....	30
4.3 Ensaios de MTT	31
4.4 Extração do RNA total.....	31
4.5 Transcrição reversa.....	32
4.6 PCR convencional para amplificação do gene de referência	32
4.7 Ensaios de qPCR	33
4.8 Análises estatísticas	34
5 RESULTADOS	34
5.1 Resposta celular ao tratamento com MTT	34
5.2 Resposta molecular ao tratamento com os fagos recombinantes	35
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	45
REFERENCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP) é conhecidamente um problema de saúde pública que acomete um número crescente de homens. São previstos, para o Brasil, segundo o INCA, 68.220 casos novos da doença a cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2018). Além disso, os custos médicos ultrapassarão os 12 bilhões de dólares em países desenvolvidos até 2020 (YEH et al., 2016). Muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e progressão do CaP. A identificação de RNAs longos não codificante (lncRNAs) associados à tumorigênese tem revolucionado a pesquisa e aberto novos caminhos no estudo da biologia de tumores.

O *Prostate Cancer Associated 3 (PCA3)* é expresso especificamente na próstata e apresenta-se superexpresso no CaP. Sua estrutura molecular intriga pesquisadores em todo o mundo e seu funcionamento transcricional, com isoformas expressas em diferentes condições biológicas e patológicas, tem ampliado os métodos clínicos de diagnóstico. Indiscutivelmente é um oncogene-chave, cuja regulação permanece desconhecida. Em um cenário desafiador, a nanobioplataforma de *Phage Display* (PhD) tem se mostrado robustas na seleção de ligantes, sejam estes agonistas, antagonistas ou mesmo fatores transcricionais. Trata-se de uma ferramenta biotecnológica em nítida expansão, de caráter inovador ao gerar moléculas com ampla aplicabilidade clínica, além de permitir a identificação de ligantes envolvidos em processos regulatórios.

De fato, a habilidade de se isolar moléculas funcionais a partir de um amplo repertório de bacteriófagos recombinantes torna o PhD uma ferramenta poderosa para se encontrar ligantes raros. É um método econômico e altamente eficiente que possibilita a seleção de peptídeos longos, curtos, lineares ou cíclicos. Em estudo anterior, nosso grupo de pesquisa selecionou peptídeos miméticos à Argonauta 4 (AGO4), uma proteína que compõe o complexo de silenciamento gênico. Esse peptídeo se ligou à região promotora do *PCA3* sugerindo seu papel na regulação desse gene (ALVES, 2016).

Utilizamos, portanto, a tecnologia de PhD e seus fagos recombinantes para compreender a regulação transcricional do gene *PCA3*. Validar essas moléculas significa compreender a tumorigênese prostática, o que permitirá, por conseguinte, desenvolver novas estratégias para seu tratamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definindo o câncer

O desenvolvimento biológico humano é um processo complexo e altamente regulado. Nesse sentido, é necessário que haja um equilíbrio molecular, para que o organismo realize suas funções essenciais (REDZOVIC; DINTINJANA; NACINOVIC, 2016). O câncer resulta de inúmeras lesões genéticas que conduzem à transformação celular, a qual se caracteriza pelo desequilíbrio no mecanismo de reparo do DNA, na proliferação, no controle do ciclo celular e na apoptose. A partir do momento em que as células se transformam, estas adquirem a capacidade de invadir tecidos e proliferar em diferentes focos, caracterizando, assim, as metástases (HANAHA; WEINBERG, 2000; HAGAN; SHARROCKS, 2002).

O processo de carcinogênese envolve diferentes agentes mutagênicos incluindo os oncoiniciadores, capazes de provocar diretamente o dano genético, os oncopromotores, que atuam sobre as células iniciadas, transformando-as em malignas, e os oncoaceleradores, que promovem a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Morfologicamente, acontecem mudanças no citoesqueleto e surgem componentes específicos e novas proteínas de superfície. Essas células evadem aos mecanismos de defesa, proliferando, migrando e gerando novos vasos sanguíneos para sua manutenção (HLATKY; HAHNFELDT, 2014).

O câncer pode ser causado tanto por fatores ambientais quanto em decorrência da predisposição genética. Cerca de 95% dos casos são esporádicos, frutos de mutações, translocações cromossômicas, amplificações de genes e mudanças epigenéticas provenientes de exposição a agentes carcinogênicos. Dentre estes se destacam as gorduras trans e saturadas da dieta, o fumo, a obesidade, patógenos (como vírus e bactérias), radiação e poluição ambiental (LIMA; SILVA; ALVES, 2017). Molecularmente, os genes relacionados à carcinogênese podem ser divididos em supressores de tumores (GST) e oncogenes. Os GST codificam proteínas que controlam a proliferação celular. Já os oncogenes apresentam um efeito oposto, conduzindo à malignidade (NAOUM, 2014).

Quanto à histologia, as neoplasias podem acometer tecidos epitelial, conjuntivo, glandular ou muscular. Como divulgado pelo Manual de Oncologia Clínica no Brasil – MOC (2018), foram estimados cerca de 18,1 milhões de novos casos de cânceres, com 9,6 milhões de mortes, mundialmente. No que diz respeito à incidência, o CaP representa 7,1% do total de neoplasias no cenário mundial. No Brasil, é o segundo câncer com maior incidência entre os

homens, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma (INCA, 2019). O número de pacientes diagnosticados vem crescendo no país devido à evolução dos métodos de diagnósticos, melhoria na qualidade dos sistemas de informação e pelo aumento na expectativa de vida (INCA, 2018). Mundialmente, ocupa a sexta posição no *ranking* dos mais comuns, responsável por 10% do total das neoplasias identificadas (BAUMGART; HAENDLER, 2017).

2.2 O Câncer de Próstata e seus atuais desafios

A próstata é uma glândula masculina situada abaixo da bexiga urinária, envolvendo a porção inicial da uretra. Produz parte do líquido seminal que nutre os espermatozoides liberados durante a relação sexual. Esse órgão se desenvolve antes mesmo do nascimento, aumentando seu tamanho gradativamente com a idade. Sua atividade se relaciona diretamente à ação androgênica, sendo a testosterona o principal hormônio, que, após convertida em diidrotestosterona pela enzima 5-alfa reductase, atua na sinalização molecular e no controle transcricional de diferentes genes (ONCOGUIA, 2016).

Os tumores originários da próstata podem ser benignos, como a hiperplasia prostática benigna (HPB), ou malignos como os adenocarcinomas (mais comuns), sarcomas, carcinomas de pequenas células e carcinoma de células transicionais, sendo os dois últimos muito raros. Em geral, o câncer possui desenvolvimento lento e indolente, o que dificulta seu diagnóstico e compromete a sobrevida do paciente, sobretudo nos casos metastáticos (TONON, 2009). Tal evolução desencadeia a morte de células endoteliais, facilitando a migração das células malignas pelos vasos sanguíneos até encontrarem um novo local para colonizarem. No caso do CaP, os principais tecidos acometidos são ossos e pulmão (ALARCÓN; TAVAZOIE, 2016).

Dentre os fatores de risco, destacam-se a idade e a hereditariedade. É considerado o tumor maligno da terceira idade, uma vez que 3/4 dos casos ocorrem em homens a partir dos 65 anos (INCA, 2018). Em relação ao histórico familiar, o risco para o CaP aumenta cerca de 2,2 vezes quando um parente de 1º grau, sendo pai ou irmão, é acometido pelo problema; de 4,9 vezes quando dois parentes de 1º grau são portadores do tumor e de 10,9 vezes quando três parentes de 1º grau têm a doença. Portanto, quanto maior o número de casos na família, maior a chance de se desenvolver o câncer (GOMES et al., 2008).

Os demais fatores incluem a etnia, sendo mais frequente em homens com descendência africana, e a nacionalidade, já que a doença é mais comum na América do Norte, noroeste da Europa e menos frequente na Ásia. Nesses casos, situações como o intensivo rastreamento nos países desenvolvidos e diferenças no estilo de vida correlacionam-se com o número de casos

diagnosticados (RAWLA, 2019). Além disso, dietas ricas em gordura saturada e pobres em fibras, obesidade (responsável por alterações na resposta imunológica), tabagismo, com a exposição ao cádmio, e ambiente ocupacional também são considerados aspectos que podem aumentar as chances da doença (GOMES et al., 2008).

A prevenção acontece, então, a partir do momento em que informações acerca do assunto são veiculadas e disseminadas à toda a sociedade. Nesse sentido, quando são conhecidos os fatores de risco, as pessoas adotam um comportamento preventivo aderindo a bons hábitos alimentares, praticando atividades físicas, evitando o uso de cigarros e, principalmente, buscando acompanhamento médico regular (GOMES et al., 2008).

Nos estágios iniciais, o CaP é completamente assintomático, sendo que o nódulo ou endurecimento da próstata é o único sinal clínico observado durante o exame de toque retal. Com o passar do tempo, os pacientes podem sentir dificuldade de urinar, jato de urina fraco, aumento do número de micções, presença de sangue na urina ou dor e queimação durante a urinação (SROUGI, 2003). Entretanto, tais sintomas não são exclusivos dos casos malignos, ou seja, são também observados no crescimento benigno da glândula prostática, o qual é um evento comum em homens acima de meia-idade. Dessa forma, é necessário que haja uma melhora nos métodos diagnósticos, auxiliando a avaliação médica e definindo melhor as estratégias de tratamento (COSTA, 1997; CORRÊA et al., 2003; INCA, 2008; PAIVA, 2008).

Os homens que desenvolvem metástase a partir do CaP apresentam sintomas diferentes dos urinários. Dores no períneo, alterações do funcionamento intestinal, dores ao nível dos rins e nos ossos, cansaço, perda de força e de peso, são algumas das manifestações clínicas provocadas pela extensão da doença. Os indivíduos podem ainda apresentar fraturas espontâneas sem qualquer tipo de trauma, considerada fratura patológica (REGGIO, 2005; TONON, 2009). Visando, então, a diminuição da mortalidade e melhor qualidade de vida, o *screening*, ou o rastreio em uma população assintomática (de risco) se torna uma estratégia no controle da doença (DAMIÃO et al., 2015). Como essa detecção precoce é de grande importância para maiores possibilidades de cura, a Sociedade Brasileira de Urologia recomenda a dosagem anual do antígeno prostático específico, conhecido como PSA, e o toque retal em homens entre 50 e 80 anos. Em geral, os indivíduos que possuem parentes de primeiro grau com diagnóstico de CaP são indicados a realizar este procedimento mais cedo, por volta dos 45 anos (BELINELO et al., 2014).

O PSA é uma glicoproteína identificada no líquido seminal, produzida principalmente pelo tecido prostático. O exame é realizado em laboratório, medindo-se seus níveis séricos. Caso o resultado apresentar-se acima do normal (2,5 ng/ml para homens entre 40 e 50 anos e

até 4,0 ng/ml entre 50 e 60 anos), significa que existem alterações na glândula. Entretanto não indica malignidade (KIRBY, R., 2016). O uso desse procedimento isolado não é recomendável, já que 25% dos portadores de CaP tem PSA menor que 4 ng/ml. Além disso, a hiperplasia benigna também é responsável pela elevação desses valores (KOWALSKI et al., 2002; TONON, 2009). Portanto, o risco de biópsia desnecessária permanece substancial. Considerando que 80% dos tumores estão localizados na zona periférica da glândula prostática, o toque retal continua sendo um método amplamente divulgado e realizado pela comunidade médica. É um exame que permite avaliar diversos aspectos da próstata (NETTINA, 2003), como seu tamanho e forma, sua consistência e sensibilidade (dor, incômodo ou assintomático à pressão com o dedo). Quando em estágio normal ou de HPB, o órgão apresenta caráter fibroelástico. Quando ocorre o desenvolvimento do câncer, esse se torna endurecido ou firme (TONON, 2009).

Adicionalmente, os seguintes exames também são realizados: (1) dosagem da fosfatase ácida sérica, uma enzima produzida no epitélio prostático que tem seu nível elevado na corrente sanguínea devido ao desenvolvimento da lesão (COSTA, 1994; TONON, 2009); (2) ultrassonografia transretal, capaz de caracterizar o tamanho ou volume do tumor, sua localização, grau e padrão de crescimento, assimetria prostática e irregularidade ou ruptura capsular; (3) ressonância magnética (FACUNDES, 2002; SROUGI; CURY, 2006; TONON, 2009); (4) tomografia computadorizada, que permite melhor análise do envolvimento dos linfonodos (TAMAGHO; MCANINCH, 1994; FACUNDES, 2002; SROUGI; CURY, 2006; TONON, 2009) e (5) ecografia abdominal ou transretal para avaliação dos rins e das vias urinárias altas (pélvis e ureteres) (FRIEDENREICH, 2001; TONON, 2009).

Após diagnóstico, o CaP é classificado histologicamente de acordo com a extensão da doença, o comprometimento dos linfonodos e a presença/ausência de metástases (Tabela 1). Para a escolha do tratamento, além dessa análise, são considerados os níveis séricos do PSA e a graduação de Gleason (CANCER, 2016; LOBLER et al., 2012). Esta é baseada na padronização da indiferenciação celular. Se o tecido se assemelha ao normal é atribuído um grau baixo e o elevado remete a um pior prognóstico. Como os tumores na próstata muitas vezes possuem áreas com diferentes graus, um único valor dessa pontuação deve ser determinado resultando da soma das duas áreas que compõem a maior parte da lesão (JEDROSZKA et al., 2017).

Tabela 1: Estadiamento patológico do Câncer de Próstata.

Classificação patológica	Características do tumor
T1	Clinicamente não palpável ou visível por método de imagem;
T1a	Achado incidental (tumor < 5%);
T1b	Encontrada durante ressecção transuretral da próstata sendo > 5%;
T1c	Encontrado por biópsia de agulha após níveis elevados do Antígeno Prostático Específico (PSA);
T2	Confinado à próstata;
T2a	Identificado em metade de um dos lobos da próstata;
T2b	Presente em mais da metade de apenas um dos lobos da próstata
T2c	Encontrado em ambos os lobos da próstata;
T3	Apresenta-se além da capsula prostática;
T3a	Extraprostático, mas sem comprometimento das vesículas seminais;
T3b	Encontrado nas vesículas seminais;
T4	Em tecidos próximos da próstata (exceto nas vesículas seminais);
NX	Os gânglios linfáticos regionais não foram avaliados;
N0	Sem comprometimento linfonodal;
N1	Linfonodos próximos comprometidos;
M0	Ausência de metástase;
M1	A lesão se espalhou para além dos gânglios linfáticos próximos;
M1a	Metástase à distância;
M1b	Metástase óssea;
M1c	Comprometimento de pulmões, fígado, ou cérebro (com ou sem lesões nos ossos);

Fonte: Cancer Research uk, 2016a.

Nesse sentido, o tratamento para os pacientes é condizente com a gravidade da doença, sendo o tumor definido como risco baixo a intermediário ou metastático (risco alto e muito alto) (DAMIÃO et al., 2015). A prostatectomia radical, considerada a primeira opção de tratamento, é muito eficaz e curativa para tumores iniciais. O método consiste na retirada do órgão e das vesículas seminais. Apesar da sua eficiência trata-se um procedimento extremamente invasivo (RHODEN; AVERBECK, 2010). A radioterapia, uma das opções de tratamento, se baseia em administrar radiações externas ou internas (braquiterapia) sobre a próstata para destruir as células cancerígenas. Entretanto, esse feixe de radiação pode atingir outros tecidos próximos à

glândula, provocando efeitos colaterais. Trata-se de uma opção pós-cirúrgica, mas que também pode ser utilizada em pacientes com a doença já avançada (TONON, 2009).

De maneira sistêmica, são adotadas a quimioterapia e/ou hormonioterapia. A primeira, consiste na administração de quimioterápicos. Essas drogas são citotóxicas devido à sua inespecificidade, atingindo células normais, o que ocasiona diversos efeitos colaterais como queda de cabelo, náuseas, aftas, diarreia, anemia, baixa da imunidade e redução no número de plaquetas (INCA, 2016).

A hormonioterapia ou bloqueio hormonal consiste na privação de andrógenos com o objetivo de reduzir o nível dos hormônios masculinos no corpo. Como esses estimulam o crescimento prostático, sua supressão é importante para conter o avanço da doença e aumentar a sobrevida dos pacientes (PONTES, 2018). Análogos do hormônio regulador do hormônio luteinizante (LHRH) controlam o sistema hipotalâmico-pituitário liberador de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), responsáveis pela produção testicular de testosterona. Um dos principais mecanismos de ação inclui a regressão apoptótica do tumor e, em geral, os medicamentos são administrados por via oral e podem ser complementares a outras metodologias (FRANCO e SOUHAMI, 2015). A castração (orquiectomia), ou retirada cirúrgica dos testículos, também é utilizada, já que elimina os órgãos que produzem o hormônio masculino (TONON, 2009). Apesar da melhora na resposta terapêutica, a privação hormonal também apresenta efeitos colaterais como fadiga, perda da libido, diminuição da densidade óssea, alterações musculares, fogachos e, em alguns casos, complicações cardiovasculares (ROLIM et al., 2018). Além disso, as células malignas podem se tornar resistentes à castração após 12 a 18 meses do seu início (MADEIRA, 2017).

O CaP resistente à castração (CPRC) define um estágio avançado da doença com características heterogêneas. Nestes casos, há a elevação assintomática do PSA e/ou o desenvolvimento de lesões metastáticas difusas, comprometendo o quadro clínico dos pacientes. As alterações moleculares descritas e associadas ao CPRC incluem: mutações, amplificação e *splicing* no gene que codifica para o Receptor de Andrógeno (AR); alterações no metabolismo androgênico intratumoral; desregulação do AR por fatores de crescimento e alterações em proteínas correguladoras (LI et al., 2018; SADI et al., 2011).

Diante da complexidade do CaP e da presença de quadros clínicos graves, ferramentas diagnósticas mais precisas e capazes de detectar a lesão precocemente, assim como alvos terapêuticos eficazes são essenciais. Os marcadores tumorais são moléculas produzidas pelo tumor ou pelo próprio organismo em resposta à presença e ao desenvolvimento da neoplasia, capazes de auxiliar no diagnóstico, prognóstico, predição e direcionamento terapêutico

(RODRIGUES; SALES, 2013; KALIA, 2015). Nesse cenário, os RNAs não codificantes (ncRNA) têm emergido como uma alternativa promissora. Os ncRNAs são transcritos que não codificam proteínas, mas apresentam um papel significativo no fluxo e na regulação do funcionamento celular ao reprimirem ou degradarem alvos específicos envolvidos na proliferação e morte celulares, metabolismo energético e tumorigênese (DOU et al., 2018).

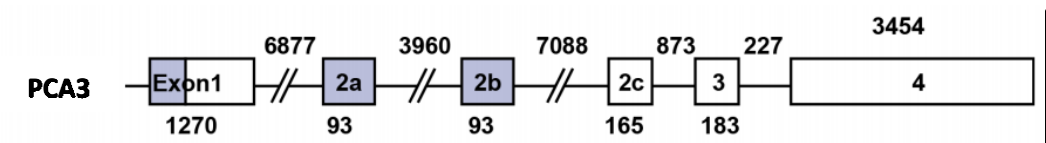
Essas moléculas de RNAs podem ser agrupadas de acordo com seu comprimento, localização e/ou função, quais sejam, RNAs longos não codificantes (lncRNAs), microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs interferentes (siRNAs), pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNAs) e RNAs que interagem com PIWI (piRNAs) (FERNANDES et al., 2019). Transcritos de diferentes regiões genômicas e posteriormente processados, esses RNAs podem ser classificados, ainda, em duas categorias: (i) como ncRNAs constitutivos, geralmente pequenos, variando de 50 a 500 nucleotídeos expressos em todos os tipos de células e necessários para a viabilidade celular; e (ii) como ncRNA reguladores, que atuam diretamente no controle da expressão gênica nos níveis epigenético, transcricional e pós-transcricional. Estes possuem tamanhos variados de até 200 nucleotídeos e exercem suas funções interagindo com outras moléculas, como os próprios RNAs ou proteínas (ZHANG et al., 2019).

Os lncRNAs apresentam mais de 200 nucleotídeos, sendo encontrados tanto no núcleo quanto no citoplasma (BARROS, 2016). Constituem um grupo bastante heterogêneo de RNAs, desempenhando diferentes funções. Sua biogênese é muito semelhante ao do mRNA (FERNANDES et al., 2019), já que ambos são transcritos pela RNA polimerase II e a maioria é processada, poliadenilada e tem a adição do *cap-5'*; além de apresentarem sequência promotora proximal altamente conservada, éxons, íntrons e estruturas secundárias (STEPIEŃ et al., 2018). Essas moléculas podem ser reguladas por fatores de transcrição amplamente descritos e relacionados a tumores como p53, fator nuclear kappa B (NF- κ B), Sox2 (Região determinadora de sexo Y-2) e Oct4 (Fator de transcrição ligador de octâmero 4) (FERNANDES et al., 2019). Os lncRNAs podem, inclusive, apresentar expressão variável conforme o órgão afetado e agressividade da lesão (LI e CHEN, 2013; YAO et al., 2016; E et al., 2018). O *PCAT3* é assim classificado e desempenha um papel crucial na tumorigênese prostática.

2.3 Prostate Cancer Associated 3 (PCA3)

O *PCA3* é um lncRNA cuja expressão encontra-se intimamente relacionada à próstata em condições malignas, o que tem evidenciado seu importante papel como biomarcador CaP-específico. Localiza-se no braço longo do cromossomo 9, caracterizado por uma alta densidade de códons de parada e sítios de poliadenilação, sem produto proteico (Figura 1). Sua região promotora apresenta um polimorfismo de repetição curta (TAAA), apontada como um fator de risco para o CaP (WANG; LIU; YAO; 2014). Além disso, novas isoformas também já foram descritas, o que corrobora sua complexidade molecular (DMITRY et al, 2017).

Figura 1: Estrutura do gene *PCA3*. De 1 a 4 estão representadas em caixas brancas os éxons previamente descritos por Bussemakers e cols, em 1999. Em cinza os dois novos éxons, 2a e 2b, além de uma nova parte do éxon 1 (CLARKE et al., 2009). Portanto, o *PCA3* é composto por 6 éxons, em que ocorre o *splicing* alternativo do éxon 2a (93pb), do éxon 2b (93 pb) e do éxon 2c (165pb). Adaptado de Goulart, 2014.



Recentemente, sua detecção aumentou a precisão diagnóstica em pacientes chineses submetidos à primeira biópsia de próstata, independente dos níveis de PSA, ressaltando seu papel na seleção de pacientes de alto risco (CHUNHUA et al, 2018). Ao contrário do PSA, sugere-se que os transcritos do *PCA3* são menos influenciados pela idade do paciente, inflamação e volume do órgão, traumas ou biopsias prévias. Em 2002, De Kok e colaboradores relataram que o *PCA3* é superexpresso em 95% dos tecidos com CaP em comparação com a região peritumoral não maligna. Atualmente, é detectado e quantificado não somente em biópsias, mas também na urina, uma vez que moléculas oriundas do tumor são liberadas pelos ductos da próstata e atuam como marcadores extracelulares (CHUNHUA et al, 2018).

O gene *PCA3* desempenha papéis essenciais em diversos processos celulares e funções biológicas. Atua na via de sinalização relacionada à E-caderina (proteína responsável pela manutenção da integridade epitelial e das interações célula-célula), como modulador da atividade transcricional dos genes alvo do AR, além de controlar os níveis transcricionais do supressor de tumor *PRUNE2* (*Protein prune homolog 2*) (ARRIAGA-CANON, 2018). De fato, o *PCA3* é organizado em orientação antisense ao intron 6 do gene *PRUNE2*, modulando sua

expressão. Seu transcrito primário anela com o *PCA3* formando um RNA de fita dupla, o qual se torna alvo de adenosinas desaminases (ADARs) que editam adenosina para inosina, suprimindo a expressão do *PRUNE2*. Nesse contexto, a superexpressão de *PCA3* diminui a expressão do *PRUNE2*, o que induz a proliferação de células malignas (SMOLLE et al., 2017).

Na angiogênese, o *PCA3* regula a expressão de importantes genes como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e fibrilina-1 (IFNB1). Na adesão celular, modula a proteína supressora metastática 1 (MTSS1) e integrina β -1 (ITGB1) e na transdução de sinal o receptor tirosina-proteína quinase (ERBB2), a subunidade reguladora da fosfatidilinositol 3-quinase α (PIK3R1) e a proteína quinase 1 ativada por mitógeno (MAP2K1). Também influencia a apoptose, regulando o gene promotor de morte associado a Bcl-2 (BAD), e a atividade da telomerase (TERT) (LEMOS et al., 2016).

Já foi demonstrado que o gene *PCA3* não possui nenhum iniciador conhecido. Além disso, regiões ricas em GC não foram encontrados em posições consenso de sua região promotora. Supõe-se que sua transcrição começaria em outras posições, uma vez que não apresenta TATA-box (LAI et al. 2017). Diante de sua intrincada organização molecular e seu papel chave na tumorigênese da próstata, esse lncRNA tem desafiado a oncologia. Portanto, torna-se evidente a necessidade de se obter moléculas capazes de modular sua expressão e assim, permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O PhD, enquanto tecnologia combinatorial, permite a obtenção de moléculas miméticas, além de ser uma técnica extremamente eficiente na seleção *in vitro* de diferentes ligantes em condições programadas e inéditas, diferentemente das utilizadas em técnicas convencionais (HUANG et al., 2015). Desenvolvido *in vitro*, esse processo de seleção pode ser modificado para enriquecer clones altamente exclusivos que se ligam a epítomos específicos ou a sequencias de interesse como promotores e reguladores (GLUMAC et al., 2019).

2.4 Phage Display na busca de fatores de transcrição

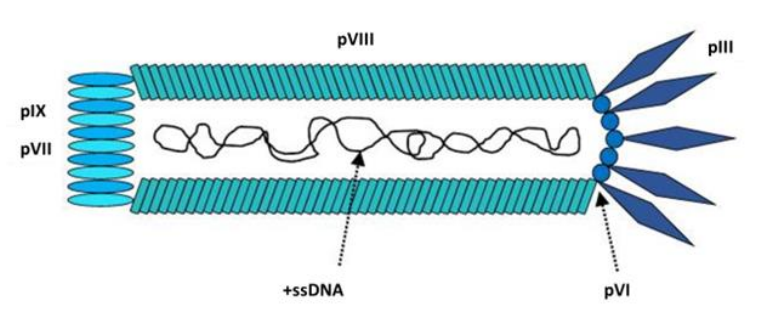
Primeiramente descrita por Smith em 1985, o PhD é uma técnica de manipulação genética que adapta os princípios básicos da engenharia genética e da química combinatoria, utilizando bacteriófagos como vetores. Estes carregam em seu genoma sequências de DNA codificantes para pequenas moléculas bioativas (SMITH e PETRENKO, 1997; SMITH, 1985), as quais são apresentadas e enriquecidas a partir de uma vasta biblioteca com mais de 10^{10} variantes (SMITH, 1985).

Em geral, são utilizados os bacteriófagos filamentosos da família Inoviridae (M13, fd, f1) (SIDHU, 2001) que parasitam bactérias Gram-negativas e que, necessariamente, apresentam pilus F. Esses vírus aproveitam da maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir, sem provocar lise na célula hospedeira; apenas induzindo um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

O DNA exógeno de interesse é inserido em um local específico na sequência nucleotídica que codifica para uma das proteínas de revestimento do fago. Após infecção do hospedeiro bacteriano pelas partículas virais, ocorre a expressão de seus genes e os aminoácidos codificados são expressos como parte da proteína de revestimento. Por conseguinte, uma proteína em fusão é exibida na superfície exposta do bacteriófago. O poder dessa tecnologia resulta de sua capacidade em estabelecer uma conexão entre fenótipo (peptídeo exibido) e genótipo (sequência de DNA codificante) (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016).

O fago M13 contém um DNA de fita simples (ssDNA) com 6407 pb, incluindo nove genes que codificam 11 proteínas diferentes. É um bacteriófago geneticamente modificado que apresenta uma região lacZ e um sítio múltiplo de clonagem inserido próximo à origem de replicação. Apresenta também dois sítios de restrição, *KpnI* e *EagI* utilizados na construção de bibliotecas (BARBAS, 2001) e diferentes proteínas estruturais expressas em seu capsídeo, quais sejam pIII, pVIII, pVI, pVII e pIX. A pVIII é a principal proteína de revestimento e apresenta cerca de 2700 cópias ao longo da estrutura viral. Já a pIII é estruturalmente a mais complexa e essencial para a infectividade do fago, uma vez que se liga ao pilus F bacteriano (PELTOMAA et al., 2019) (Figura 2).

Figura 2: Estrutura do bacteriófago M13. Este é constituído por um capsídeo proteico formado pela proteína de camada principal (pVIII) e as proteínas de camada menor (pIII e pVI em uma extremidade e pVII e pIX na outra).
Fonte: Adaptado de Ledsgaard et al., 2018.

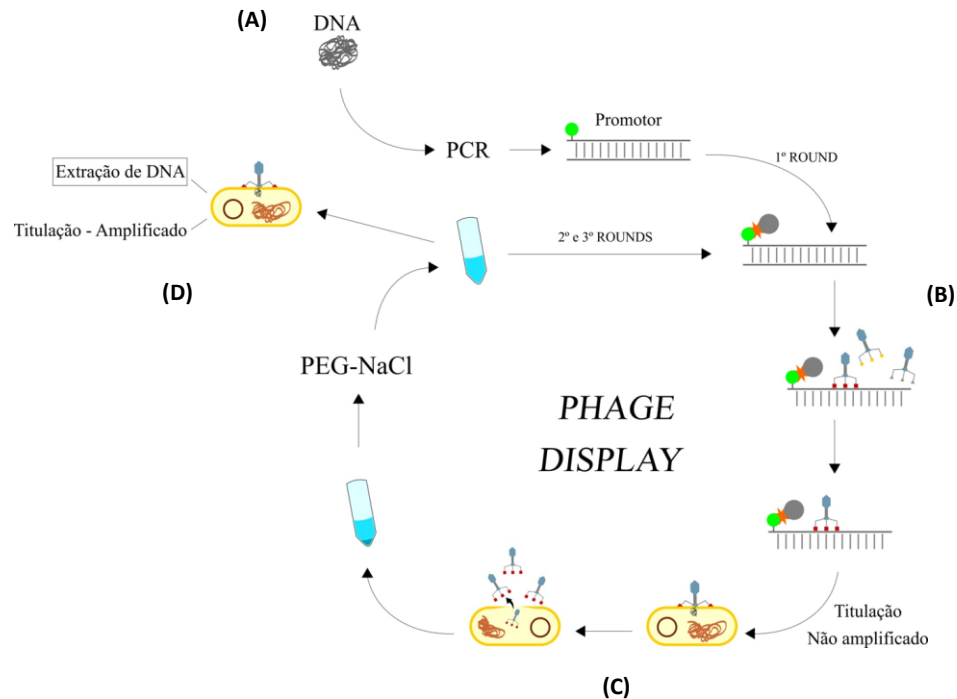


Uma das características marcantes da tecnologia de PhD é a abundância de recombinantes presentes nas bibliotecas, o que torna essa técnica rápida, confiável e de alto rendimento. Portanto, peptídeos funcionais com características desejadas podem ser selecionados de uma maneira direta e eficaz, por meio de uma estratégia baseada em seleção por afinidade chamada *biopanning* ou biosseleção (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016).

Nesse processo, uma população de partículas de fagos (incluindo uma biblioteca de peptídeos aleatórios) é incubada com o alvo de interesse por um período determinado. Os fagos cujos peptídeos apresentados se ligam ao alvo são capturados, enquanto os fagos não ligados ou fracamente ligados são removidos. Os fagos de interesse são, então, eluídos utilizando-se soluções ácidas, ligantes competidores, agentes desnaturantes ou enzimas proteolíticas. Os fagos recuperados são então propagados infectando células hospedeiras bacterianas. Embora as etapas acima mencionadas possam enriquecer partículas de fago com alta afinidade para o alvo, o conjunto de peptídeos ainda é relativamente heterogêneo. Com isso, é necessário que estes sejam expostos ao alvo por mais algumas rodadas. Tipicamente, três a cinco ciclos de seleção são suficientes para alcançar ligantes promissores, os quais são identificados pelo sequenciamento do DNA encapsidado (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016).

Para a seleção dos peptídeos ligantes a região promotora do gene *PCA3*, Alves (2016) utilizou uma biblioteca de fagos PhD-12 mer (New England Biolabs, Beverly, 115 MA, EUA) (Figura 3). Os fagos provenientes do terceiro ciclo de seleção foram isolados e seu DNA extraído e sequenciado. As sequências correspondentes aos peptídeos selecionados foram deduzidas usando a ferramenta *ExPASy Proteomics e Sequence Analysis*, e alinhadas localmente pela ferramenta *BLASTP*™. Alguns dos peptídeos alinharam com a AGO4 e foram utilizados no presente estudo (ALVES, 2016).

Figura 3: Etapas do processo de biosseleção conduzidas por Alves (2016). Primeiramente foi realizada a amplificação da região promotora do gene *PCA3* por PCR (A); em seguida, foram conduzidos três ciclos de seleção (B). Os fagos selecionados foram amplificados em *Escherichia coli* (C). Por fim, o DNA foi extraído (D) e os peptídeos identificados por sequenciamento e análises *in silico*. Fonte: Adaptado de Alves, 2016.



A tecnologia de PhD foi uma das grandes evoluções da biologia molecular com importante aplicação nas ciências biomédicas. Com relação ao CaP sabe-se que, atualmente, as terapias sistêmicas, como a quimioterapia, sejam isoladas ou em associação, podem desencadear efeitos colaterais severos (DUFFY e CROWN, 2014). A técnica PhD associada à tecnologia de construção de bibliotecas combinatórias pode gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e tratamento individualizados (ARAÚJO T. G., 2009). Além disso, permite identificar moléculas-chave responsáveis por coordenar o funcionamento de oncogenes, o que pode conduzir a uma melhor compreensão molecular de diferentes marcadores, culminando em possíveis estratégias de intervenção.

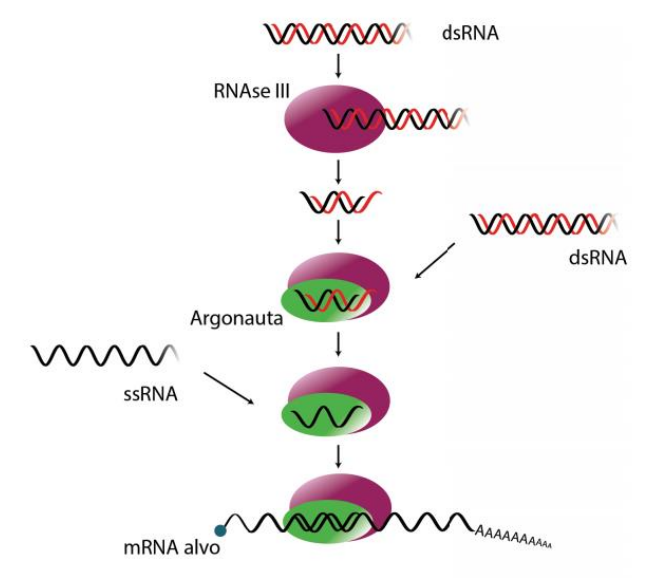
2.5 Argonauta 4

As Argonautas (AGO) compreendem uma família de proteínas altamente conservadas implicadas em mecanismos de silenciamento gênico pós transcricional direcionado por pequenos ncRNA, com a clivagem e degradação do RNA alvo. Em nível transcricional, as AGO

nucleares direcionam a formação de heterocromatina nos locais alvo (ALMEIDA, 2019; CARMELL et al, 2002). As vias de RNA de interferência (RNAi) estão associadas a esse processo (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009) com funções altamente especializadas e distintas em diferentes grupos de eucariotos (CERUTTI e CASAS-MOLLANO, 2006) coordenando o desenvolvimento embrionário, fertilidade e resposta antiviral (BERNSTEIN et al., 2003; DE FARIA et al., 2013).

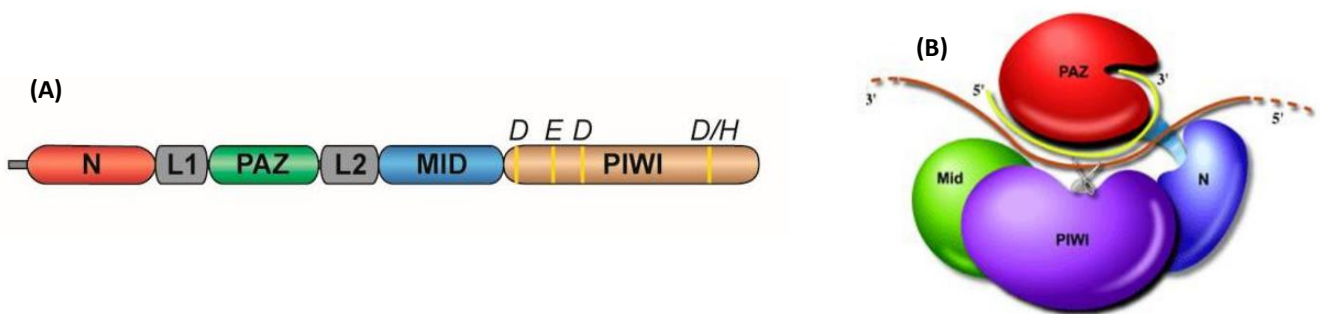
O primeiro experimento envolvendo RNAi foi descrito em 1998 por Craig Mello e Andrew Fire com a introdução artificial de RNA de fita dupla (dsRNA) no nematelminto *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998). No mecanismo de RNAi, o dsRNA é inicialmente clivado em pequenos siRNA (*small interference RNA*), em um tamanho de 21-25 nucleotídeos, por uma RNAase III-*simile*, denominada DICER (Figura 4). Os fragmentos são, então, incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (BRODERICK et al., 2011), composto por proteínas da família AGO (rde-4, rde-1 e drh-1/2) em *Caenorhabditis elegans* ou AGO 2 em *Drosophila melanogaster* (SANCHEZ-VARGAS et al., 2004; VALDMANIS et al., 2012) com atividade helicase. A fita antisense do siRNA guia o RISC para o RNA alvo o qual é clivado pela nuclease do complexo. Além disso, os siRNAs podem funcionar como moldes para a síntese de mais dsRNAs pela RNA polimerase RdRp em um processo de amplificação e disseminação do sinal de RNAi (ZOU et al., 2019). Essa via de silenciamento gênico pós-transcricional ativada por dsRNA é definida como clássica e envolve, em geral a regulação da expressão de genes por miRNAs e a inibição da infecção viral e de transposons por siRNAs (DO AMARAL, 2008). Entretanto, existem outras vias de RNAi que, mesmo com mecanismos de ação distintos, são compostas por proteínas da família AGO, as quais se associam a pequenos ncRNAs (ENDER e MEISTER, 2010).

Figura 4: Representação geral da via de RNA de interferência (RNAi). RNAs de dupla-fita (dsRNAs) são reconhecidos por uma proteína RNase do tipo III e processados em moléculas menores que são, então, carregadas pela proteína efetora Argonauta (AGO). Após a seleção da fita guia, o complexo maduro busca por mRNAs alvos complementares à sequência do pequeno RNA, culminando na inibição da tradução e regulando a expressão gene-específica. Fonte: Adaptado de Soares, 2015.



Proteínas AGO são caracterizadas pela presença de dois domínios principais: PAZ e PIWI, além de outros segmentos estruturais, incluindo os domínios N-terminal, L1 (*Linker 1*), L2 (*Linker 2*) e MID (Figura 5A) (JOSHUA-TOR e HANNON, 2011; LISITSKAYA, ARAVIN e KULBACHINSKIY, 2018). O domínio PIWI possui, além de uma ribonuclease H que acomoda o pequeno ncRNA, um conjunto de três aminoácidos conservados que direcionam a clivagem do mRNA alvo, conhecida como tríade catalítica DDH. O domínio PAZ possui um domínio de ligação a ácidos nucleicos que se liga à região 3' do pequeno ncRNA e orienta o seu posicionamento dentro do domínio PIWI (Figura 5B) (SOARES, 2015). Em geral, a diversidade de proteínas AGO em um organismo está correlacionada diretamente à presença de ncRNAs com origem e funções distintas (CERUTTI e CASAS-MOLLANO, 2006; BATISTA e MARQUES, 2011).

Figura 5: Representação esquemática da organização dos domínios de proteína Argonata em mamíferos e direcionamento da clivagem do mRNA guiado por AGO. Em (A) os resíduos conservados necessários para sua atividade de endonuclease (tríade catalítica DEDX (onde X é D ou H) indicada em amarelo no domínio PIWI – D é ácido aspártico, E ácido glutâmico e H histidina). Em (B) O ncRNA (em amarelo) liga-se por sua terminação 3' no sulco do domínio PAZ. A extremidade 5' associa-se a outra terminação do sulco. O mRNA (em marrom) acomoda-se entre os domínios N-terminal, PAZ e MIDI. O sítio ativo do domínio PIWI (mostrado como tesouras) cliva o mRNA antisenso ao ncRNA guia. Fonte: Adaptado de Schuster, Miesen e van Rij, 2019; Song et al., 2004.



De acordo com suas características, as AGOs são divididas em três classes: (I) AGOs multifuncionais; (II) AGOs associados a siRNA; e (III) AGOs associadas a piRNA. O genoma humano expressa quatro parálogos de Argonoutas, AGO1, AGO2, AGO3 e AGO4, que são conhecidos também como fatores de iniciação eucarióticos (EIF2C1, EIF2C2, EIF2C3 e EIF2C4). Todos surgiram de um único gene ancestral, porém, três destas AGO1, AGO3 e AGO4, possuem a mesma orientação no cromossomo humano 1p34.3. A proteína AGO2 funciona como uma endonuclease, clivando o mRNA nas regiões de pareamento completo com siRNAs ou miRNAs, enquanto as AGO1/3/4 são consideradas cataliticamente inativas para a clivagem endonucleolítica (VALDMANIS et al., 2012; ZHANG et al., 2018).

Na última década, estudos apontaram uma forte conexão entre pequenos ncRNA e modificações específicas na metilação do DNA, o que resulta em controle de elementos transponíveis e estabilidade genômica por silenciamento gênico. Um dos mecanismos responsáveis por esse silenciamento, extensivamente estudado nos últimos anos, é a metilação de DNA direcionada por RNA (RdDM), descoberta pela primeira vez em plantas e descrita como modificação epigenética mediada por ncRNA. A proteína AGO4, diferente em algumas sequências de aminoácidos dos domínios N-terminal e PIWI da AGO2, desempenha um papel crucial nesse processo e, portanto, na regulação da expressão gênica, o que justifica sua catálise inativa (HE et al., 2009; LAHMY et al., 2016; CHARLETPET et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito modulatório do peptídeo mimético à AGO4, expresso fusionado à pIII do fago M13, sobre linhagens celulares prostáticas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Cultivar as linhagens prostáticas não-tumorigênicas (RWPE-1) e tumorigênicas (LNCaP e PC3);
- ✓ Purificar o fago expressando peptídeo mimético a AGO4 para o tratamento das linhagens prostáticas;
- ✓ Avaliar o efeito na proliferação celular mediado pelo tratamento com o fago recombinante por meio de ensaios de MTT;
- ✓ Avaliar o efeito modulatório do fago recombinante sobre a expressão dos genes *AGO4*, *PRUNE2* e *PCA3*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

Foram utilizadas três linhagens celulares: RWPE-1 (não tumorigênica), LNCaP (hormônio-dependente) e PC3 (resistente à castração) cultivadas em seus respectivos meios. O meio RPMI (produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 50 ug/mL de gentamicina e utilizado no cultivo das células LNCaP e PC3. O meio IMDM (Meio de Dulbecco Modificado de Iscove) suplementado com 10% de FBS, 50 ug/mL de gentamicina, 169 ug/mL de extrato de pituitária e 2 ug/mL de EGF (Fator de Crescimento Epidérmico) foi utilizado para o cultivo da RWPE-1. As células foram mantidas na incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado em dias alternados até que essas atingissem 80% de confluência para serem utilizadas nos experimentos.

4.2 Purificação das partículas virais recombinantes

Para a purificação do fago expressando peptídeo mimético a AGO4, a cepa ER2738 da bactéria *E. coli* foi primeiramente amplificada, até atingir a fase exponencial ($OD_{600nm}=0,3$) em 100 mL de meio LB (*Luria Bertani*) acrescido de tetraciclina 100 $\mu\text{L/mL}$. Posteriormente, foi adicionado 30 μL do sobrenadante do fago mimético e o meio então foi mantido a 37°C por 16 horas sob agitação a 280 rpm. No dia seguinte, o conteúdo foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde adicionou-se 1/6 de PEG/NaCl 2,5M. Este foi mantido a 4°C por 16 horas, seguido de nova centrifugação por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Foi acrescido 1 mL de PBS (tampão fosfato salino) 1x para diluir o precipitado, o qual foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Adicionou-se, novamente, 1/6 do volume de PEG/NaCl e a solução foi mantida em gelo por 1 hora. Após esse período, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante formado foi descartado. Acrescentou-se 100 μL de PBS 1x para solubilização do precipitado de fagos. Para realizar os tratamentos, o fago foi filtrado em uma membrana de 0,22 μm . Para isso, acrescentou-se 150 μL de PBS para umedecer o filtro antes da filtragem da amostra.

Finalmente, o fago foi quantificado no espectrofotômetro, com leituras nos comprimentos de onda de 269 nm (absorbância de fagos) e 320 nm (absorbância de bactérias). Para o cálculo do título viral foi utilizada a fórmula (F1):

$$\frac{ufc}{uL} = \frac{(A_{269} - A_{320}) * 6 \times 10^{16}}{7222} \quad (F1)$$

Onde:

ufc – unidades formadoras de colônia

A₂₆₉ – Absorbância no comprimento de onda a 269 nm

A₃₂₀ – Absorbância no comprimento de onda a 320 nm

6×10^{16} – Constante da equação

7222 – Número de nucleotídeos do genoma do fago

4.3 Ensaios de MTT

Para avaliar o efeito do fago expressando peptídeo mimético a AGO4 na proliferação, as células foram tripsinizadas e contadas utilizando a câmara de contagem pela exclusão do azul de tripano. Em seguida, 10^4 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. No dia seguinte, o meio completo foi descartado e assim iniciado o tratamento adicionando os fagos nos seguintes títulos: 10^9 , 10^7 e 10^5 fagos/poço. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Após 24 e 48h de tratamento foi então adicionado 20 μ L MTT/poço (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium). A placa foi coberta com papel alumínio e deixada na incubadora a 37°C, 5% de CO₂ durante 4 horas. Transcorrido esse tempo, foi retirado o MTT e adicionou-se 50 μ L da solução de SDS (20% de SDS, 50% de dimetilformamida) em cada poço. A placa foi novamente coberta com papel alumínio e deixada em lugar escuro por 16 horas. Poços com células não tratadas foram utilizadas como controle do experimento. Por fim, a placa foi lida no espectrofotômetro no comprimento de 570 nm. Para os cálculos do ensaio foi utilizada a fórmula (F2):

$$Razão normalizada(\%) = \frac{A_{AGO4}/AMC_{AGO4}}{AS/AMC_{SELV}} \times 100 \quad (F2)$$

Onde:

A_{AGO4} – Absorbância absoluta para o fago mimético à AGO4

AMC_{AGO4} ($\bar{x}_{ctl\ AGO4}$) – Absorbância média do controle sem tratamento da AGO4

AS – Absorbância absoluta para o fago selvagem (sem peptídeo fusionado à pIII)

AMC_{SELV} ($\bar{x}_{ctl\ SELV}$) – Absorbância média do controle sem tratamento do fago selvagem (sem peptídeo fusionado à pIII)

4.4 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total das linhagens tumorais LNCaP e PC3, foi utilizado o reagente TRIzol® Reagent (Life Technologies), seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade do material foi verificada em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) e para visualização foram acrescidos formamida (Dinâmica Química Contemporânea) e Gel Red 1X (Uniscience).

As imagens foram visualizadas por luz ultravioleta e fotodocumentadas pelo equipamento Transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (PG Instruments) e a razão das leituras 260 nm/280 nm, utilizada também como parâmetro qualitativo. Por fim, o RNA foi armazenado à -80°C para subseqüentes análises.

4.5 Transcrição reversa

A transcrição reversa (RT) foi preparada utilizando-se 1 µg de RNA total extraído das linhagens LNCaP e PC3, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de Tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) (Invitrogen) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros (Invitrogen). O volume final para cada reação foi ajustado para 20 µL utilizando água tratada com inibidor de RNase (Dietil Pirocarbonato) (Sigma-Aldrich). Reações sem a presença do material genético foram preparadas a fim de verificar possíveis contaminantes exógenos.

As amostras foram incubadas no termociclador ProFlex (Applied Biosystems) durante 1 hora a 37°C e, posteriormente, aquecidas a 95°C por 5 min, para que assim ocorresse a desnaturação do híbrido RNA-cDNA e inativação da enzima MMLV-RT. O cDNA foi, então, armazenado a -20°C até amplificação.

4.6 PCR convencional para amplificação do gene de referência

A qualidade do cDNA obtido foi confirmada por meio da amplificação de um fragmento de 94 pb do gene de referência Beta-2-Microglobulina (*B2M*). Foram utilizadas as seguintes condições para esta reação: 1X de tampão de PCR (0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 5 pmoles dos *primers* (Invitrogen) (5' AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA 3' e 5' TGTTGATGTTGGATAAGAGAA 3'), 1 U Platinum®Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 2 µL de cDNA e água de injeção (Isofarma), utilizada para completar o volume final da reação para 20 µL.

A ciclagem ocorreu em termociclador ProFlex (Applied Biosystems) após desnaturação inicial a 95°C durante 4 min. Posteriormente, foram completados 28 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, de anelamento a 59°C por 40 s e de extensão a 72°C por 50 s. Finalmente foi

realizada uma extensão final de 72°C por 5 min. O produto foi resolvido em gel de agarose 1,5%, utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X corado com Gel Red 1X (Uniscience), visualizado por luz ultravioleta e fotodocumentado pelo equipamento Transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.7 Ensaios de qPCR

Para o tratamento das linhagens celulares tumorais prostáticas com os fagos expressando o peptídeo mimético a AGO4, 10⁵ células foram plaqueadas em placas de 6 poços. Os parâmetros foram estabelecidos a partir dos resultados do MTT, sendo que foram adicionadas 10⁹ partículas virais na linhagem LNCaP, mantidas por 24 horas e 10⁵ partículas virais na PC3, cultivadas por 48 horas. Poços sem tratamento foram mantidos como controle. Os experimentos foram realizados em triplicata. Posteriormente, o RNA total foi extraído e procederam-se as análises de expressão de transcritos.

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi empregada para a quantificação relativa dos genes *AGO4*, *PCA3* e *PRUNE2*, utilizando o gene *B2M* como referência. Para cada um dos alvos foi construída a curva padrão relativa, para validação do método Cq comparativo. As curvas obtidas determinaram a eficiência de amplificação dos genes alvo em relação à do gene de referência. Para estimar a eficiência (Ef) dos ensaios de qPCR foi realizado o cálculo: $Ef = (10 - 1/slope - 1) \times 100$.

As reações, realizadas em duplicata para cada um dos genes, foram conduzidas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) e preparadas para um volume final de 10 µL, contendo 2 µL de cDNA, tampão SYBR®Green (Applied Biosystems), oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen) e água de injeção (Isotarma). Os parâmetros e reagentes utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros e reagentes utilizados na quantificação relativa dos transcritos dos genes Argonauta 4 (*AGO4*), *Protein prune homolog 2* (*PRUNE 2*) e Antígeno 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*) por qPCR

Gene	Sequência 5'- 3'	Tampão (µL)	Primers (µL)	Tempo e temperatura de anelamento
<i>AGO4</i>	F: TGACCCACTGTGGACAGATGAA R: CCTGCCACTATATTACAGACCTCG	4,5	0,3	65 °C por 2 min
<i>PRUNE2</i>	F: GCTACCAGATGATTGACAGACGG R: GGGATCAGCCCACTGAGTTC	5,0	1,0	60 °C por 1 min
<i>PCA3</i>	F: CGAGGGAGACCAGGAAGAT R: ATCGATGACCCAAGATGGCG	4,0	0,5	62 °C por 2 min
<i>B2M</i>	F: AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA R: TGTTGATGTTGGATAAGAGAA	5,0	1,0	60 °C por 1 min

4.8 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o software *GraphPad Prism 7.0* e foram calculadas a média e os desvios padrão para cada tratamento. Após avaliação da distribuição dos dados, foi empregado o teste de ANOVA e a análise de múltiplas comparações de Bonferroni. Nos dados referentes à quantificação dos níveis de mRNA foi utilizado o teste t unipareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

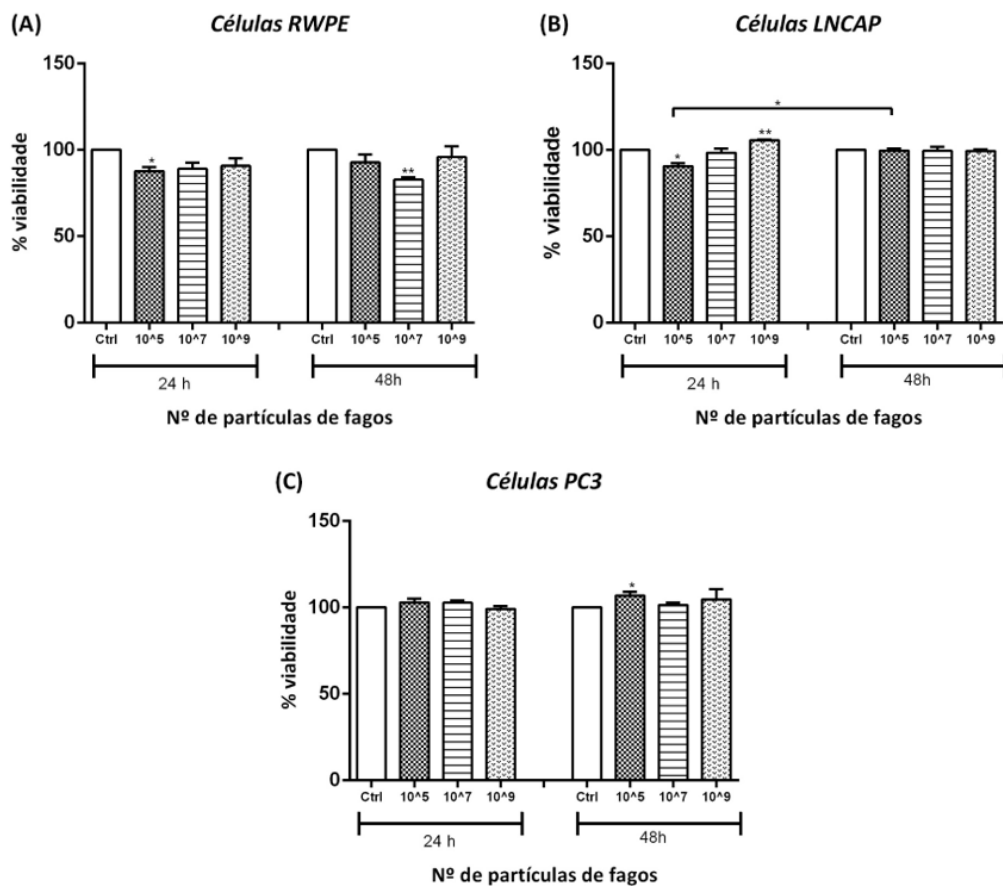
5 RESULTADOS

5.1 Resposta celular ao tratamento com MTT

Sabe-se que ensaios de MTT quantificam a redução deste em formazan. Tal reação permite a visualização de um aumento na atividade mitocondrial, a qual está diretamente ligada a viabilidade e proliferação celulares (DA SILVA et al., 2013). Os efeitos celulares mediados pelo tratamento com os fagos miméticos à *AGO4* estão representados na Figura 6. Para a linhagem RWPE-1 (Figura 6A), os tratamentos por 24 horas com 10^5 ufc e 48 horas com 10^7 ufc conduziram a uma diminuição significativa da viabilidade ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Houve uma diminuição na viabilidade da linhagem LNCaP após 24 horas de tratamento com 10^5 ufc, enquanto com 10^9 ufc observou-se efeito proliferativo ($p < 0,01$) (Figura 6B). Comparando-se os tempos de tratamento, o título 10^5 induziu menos a proliferação após 24 horas, quando comparado a 48 horas ($p < 0,05$). Finalmente, sobre os tratamentos da

linhagem PC3, estes não demonstraram diferença estatística em relação ao controle após 24 horas. No entanto, após 48 horas, 10^5 ufc induziram a proliferação celular ($p < 0,05$) (Figura 6C).

Figura 6: Efeito celular mediado pelo fago expressando peptídeo mimético a Argonauta 4 em modelos celulares prostáticos. Os ensaios foram conduzidos em (A) RWPE – não tumorigênica, (B) LNCaP – hormônio dependente e (C) PC3 – resistente à castração por 24 e 48 horas. Foram testadas quatro titulações dos fagos 10^5 , 10^7 e 10^9 ufc/poço. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Os valores apresentados foram normalizados com os referentes ao fago selvagem (não expressa o peptídeo fusionado à proteína pIII). Ctrl: controle sem tratamento.

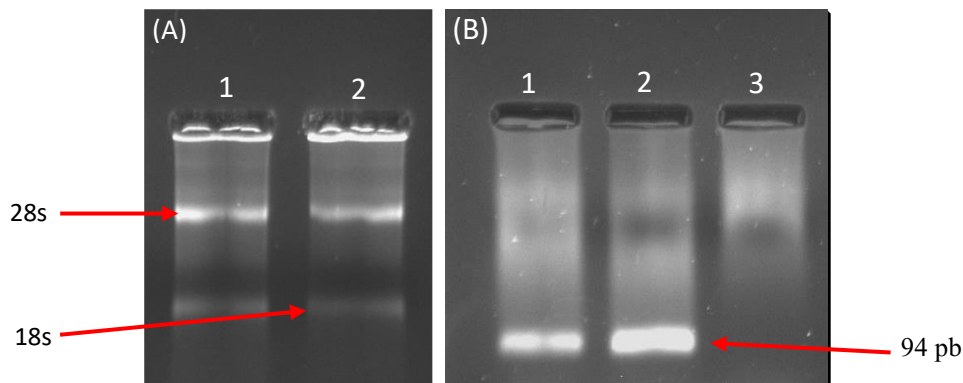


5.2 Resposta molecular ao tratamento com os fagos recombinantes

A resposta molecular aos fagos expressando peptídeo mimético à AGO4 foi avaliada nas linhagens tumorais após tratamento e extração de RNA. Hipotetizou-se que a expressão de *PCA3* seja modulada e, por conseguinte a do *AGO4* e do *PRUNE2*. A qualidade do material

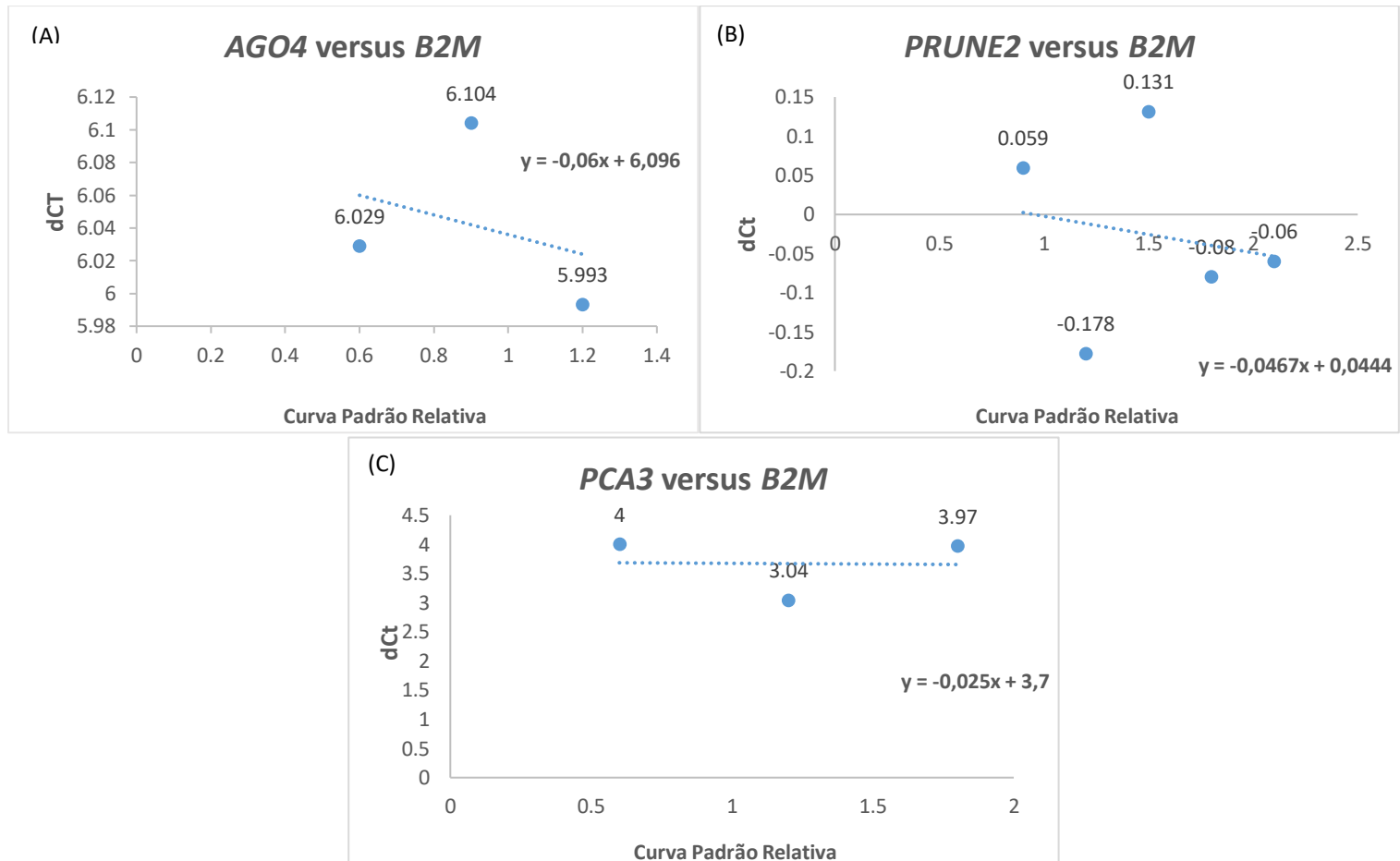
extraído foi avaliada pela razão das leituras de absorvância a 260 e 280 nm, a qual se mostrou próxima de 2,0, pelo padrão eletroforético do RNA total e pela amplificação do gene de referência *B2M*. Na Figura 7A verifica-se a presença das bandas ribossomais 18S e 28S, autenticando a amostra obtida. Além disso, foi possível visualizar a banda de 94 pb do gene *B2M*, o que viabilizou a utilização do cDNA em ensaios posteriores (Figura 7B).

Figura 7: Validação da qualidade do RNA total utilizado nas análises moleculares. Em (A) Padrão eletroforético do RNA total extraído para as linhagens LNCaP (1) e PC3 (2). Em (B) amplificação do fragmento de 94 pb do gene de referência *Beta-2-Microglobulina (B2M)*. 1 e 2: linhagens prostáticas LNCaP e PC3, respectivamente; 3: controle negativo para a amplificação do gene *B2M*. As setas identificam as bandas visualizadas.



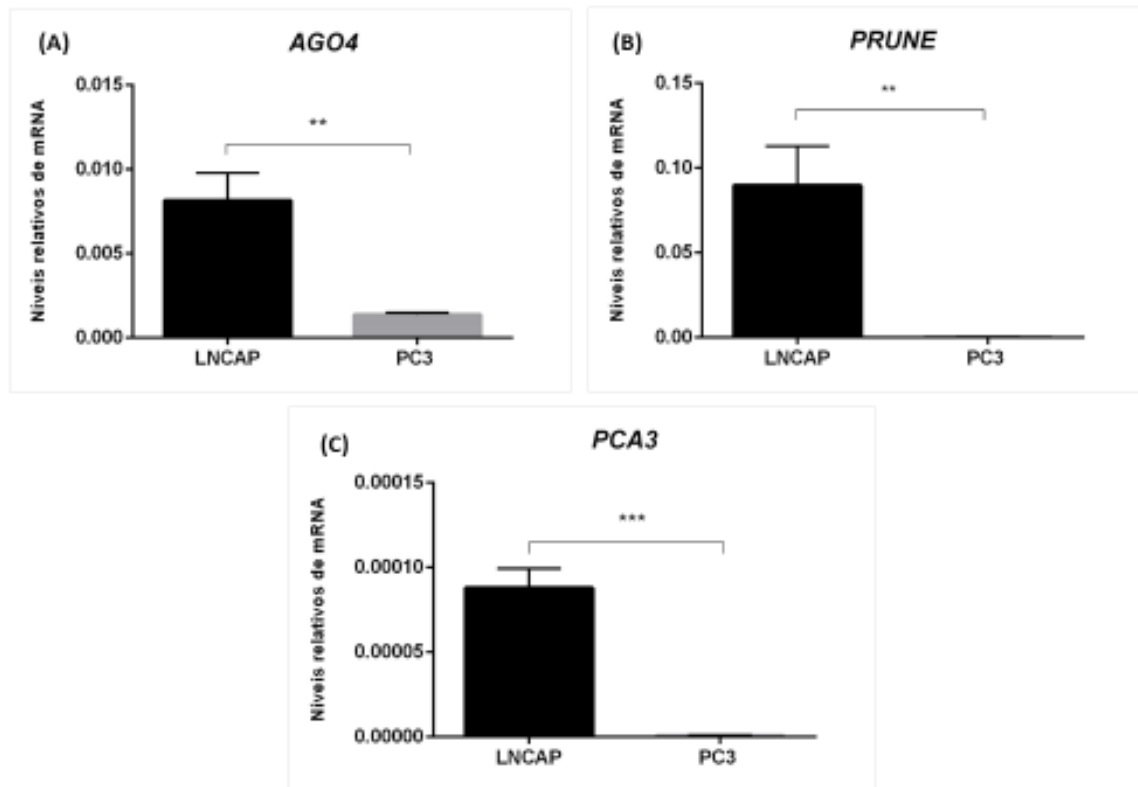
Após padronização do RNA extraído, foi necessário validar o método Cq comparativo. A curva padrão relativa foi construída para cada um dos alvos, normalizados com o gene *B2M*. A eficiência encontra-se representada na Figura 8 e o gráfico foi gerado por regressão linear no software Microsoft Excel®. A eficiência próxima de 100% para todos os genes possibilita a quantificação relativa dos transcritos.

Figura 8: Validação do método Cq comparativo para a quantificação relativa dos transcritos, por qPCR. Em (A) Argonauta 4 (*AGO4*); em (B) *Protein prune homolog 2 (PRUNE 2)* e em (C) *Prostate Cancer Associated 3 (PCA3)*. O gene *Beta-2-Microglobulina (B2M)* foi utilizado como referência.



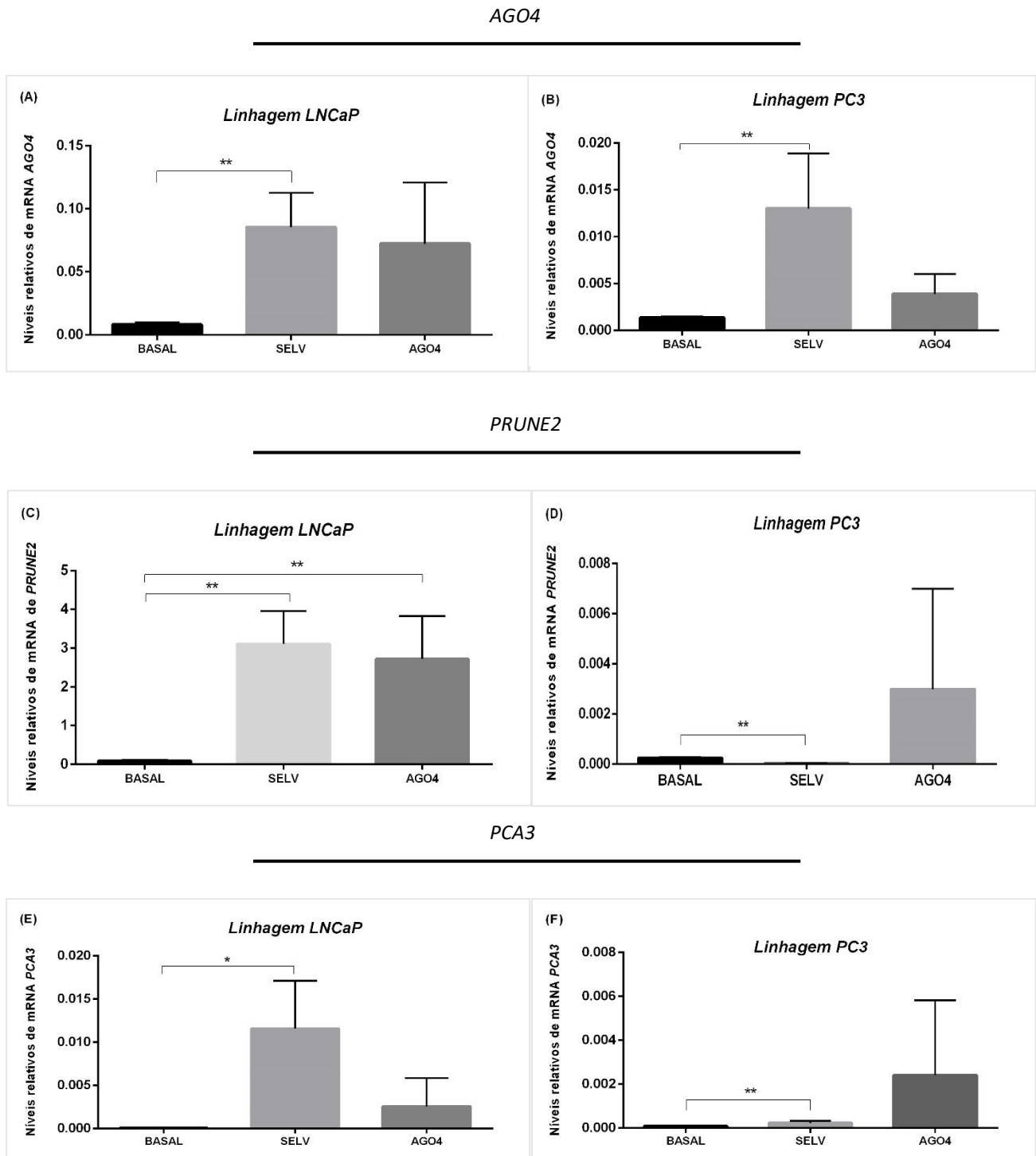
Observando os perfis de expressão gênica para cada um dos alvos (Figura 9), os níveis relativos de mRNA se mostraram maiores na linhagem LNCaP quando comparados com a linhagem PC3. Consistente com relatos anteriores (VAN BOKHOVEN et al., 2003), confirmamos que o *PCA3* é mais expresso na linhagem celular de próstata dependente de androgênio – LNCaP. Na Figura 9A, os níveis transcricionais do gene *AGO4* se mostraram mais elevados na linhagem LNCaP com $p < 0,05$, quando comparados à linhagem PC3. Esse mesmo padrão de expressão foi observado para o gene *PRUNE2* na Figura 9B, com significância de $p < 0,05$. Por fim, representado na Figura 9C, os níveis relativos de mRNA de *PCA3* encontra-se mais expresso em LNCaP, com $p < 0,001$.

Figura 9: Quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes Argonauta 4 (*AGO4*), *Protein prune homolog 2* (*PRUNE 2*) e *Prostate Cancer Associated 3* (*PCA3*) por qPCR em duas linhagens prostáticas (LNCaP e PC3). Em A, expressão do gene *AGO4*; em B, expressão do gene *PRUNE2* e em C, expressão do gene *PCA3* (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).



Após o tratamento com os fagos recombinantes expressando o peptídeo mimético à *AGO4*, não se verificou efeito modulatório do peptídeo fusionado à pIII do fago M13. Na Figura 10A, os níveis relativos de mRNA do gene *AGO4* na linhagem LNCaP, se mostraram elevados após tratamento com o fago selvagem ($p < 0,01$). O mesmo comportamento foi observado para a linhagem PC3 (Figura 10B). Para os níveis dos transcritos do gene *PRUNE2*, representados na Figura 10C para linhagem LNCaP e Figura 10D para linhagem PC3, a expressão também foi mediada pelo fago selvagem ($p < 0,01$). Houve diferença estatística com $p < 0,01$ entre a expressão mediada pelo fago mimético à *AGO4* e a expressão basal das células LNCaP. Por fim, a Figura 10E e 10F, apresentam a expressão dos transcritos do gene *PCA3*, na linhagem LNCaP e PC3, respectivamente. Ambas tiveram níveis maiores dos transcritos mediados pelo fago selvagem com $p < 0,05$ em LNCaP e $p < 0,01$ em PC3.

Figura 10: Quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes Argonauta 4 (*AGO4*), *Protein prune homolog 2* (*PRUNE 2*) e *Prostate Cancer Associated 3* (*PCA3*) por qPCR nas linhagens prostáticas LNCaP e PC3 após tratamento com os fagos recombinantes. Em A e B, expressão do gene *AGO4* em LNCaP e PC3, respectivamente; em C e D, expressão do gene *PRUNE2* em LNCaP e PC3, respectivamente; em E e F a expressão do gene *PCA3* em LNCaP e PC3, respectivamente (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



6 DISCUSSÃO

O CaP desafia as práticas clínicas devido à sua heterogeneidade em nível de (i) expressão gênica, com diferentes padrões de marcadores expressos em uma mesma lesão, (ii) genético, com múltiplos rearranjos genômicos e mutações e (iii) na resposta do paciente a terapias comuns, refletindo a necessidade de busca de alvos e estratégias terapêuticas inéditos (FRAME E MAITLAND, 2019). Nesse contexto, ferramentas quantitativas precisas e novos biomarcadores se tornam imprescindíveis.

Genes codificantes e não codificantes de proteínas têm sido identificados a fim de se estabelecer uma conduta individualizada e promissora no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. LncRNAs se destacam como marcadores atrativos (ALSHALALFA et al., 2017) agindo tanto como supressores de tumor quanto oncogenes, afetando o cenário clínico-patológico, o prognóstico e a resposta à terapia (XU et al., 2018). Destacam-se por sua sensibilidade, especificidade e custo benefício quando comparados a outras moléculas empregadas em metodologias já estabelecidas. Além disso, fornecem uma percepção dinâmica da regulação dos eventos celulares, assim como são mais estáveis na maioria dos fluidos corporais (PARDINI et al., 2019). Portanto, considerando a complexidade molecular de tumores prostáticos e o controle simultâneo de diferentes genes, lncRNAs são candidatos a fornecer subsídios para o entendimento dessa complexa rede de regulação gênica (FRAME E MAITLAND, 2019).

O presente estudo objetivou compreender fatores responsáveis por mediar a expressão do gene *PCA3*, um lncRNA específico e superexpresso no CaP, cuja utilização clínica é notória e sua dosagem na urina já foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o diagnóstico da doença (FENSTERMAKER et al., 2017). Contudo, seu funcionamento molecular permanece desconhecido. Segundo Frame e Maitland (2019), o *PCA3* está envolvido em vias de sobrevivência do CaP controlando o crescimento e a viabilidade celulares, sobretudo via sinalização androgênica. Portanto, sugere-se que sua expressão nos tecidos da próstata seja rigidamente regulada (FERREIRA, 2012), embora não se conheça os fatores envolvidos em sua modulação.

Avaliamos os efeitos celular e molecular de peptídeos miméticos a AGO4 fusionados à pIII de bacteriófagos recombinantes, previamente selecionados por PhD como ligantes à região promotora do gene *PCA3*. Para isso, utilizamos as linhagens prostáticas RWPE (não-tumorigênica), LNCaP (hormônio-dependente), e PC3 (resistente à castração). Além disso,

estabelecemos a expressão dos transcritos dos genes *AGO4*, *PRUNE2* e *PCA3* nas duas linhagens tumorigênicas utilizando a técnica de qPCR.

O desenvolvimento de tumores, incluindo o de próstata, está associado a produtos gênicos alterados ou desregulados que afetam funções críticas como divisão e diferenciação celulares, assim como aspectos relacionados com a angiogênese, morte e adesão celulares. Um melhor entendimento dessas mudanças moleculares e a identificação de vias bioquímicas importantes podem fornecer uma base translacional, impactando a prática clínica (MATOS, 2008). Regiões promotoras controlam esse funcionamento gênico. A ligação de fatores de transcrição aos elementos de resposta (sequências específicas na região promotora) induz alterações conformacionais no gene e, dessa forma, influencia a capacidade de ligação da RNA-polimerase à região promotora (PATRICIO, 2019). Conhecer esses fatores é desvendar o fluxo molecular do processo carcinogênico, e, portanto, se mostra interessante na interrupção de vias malignas de sinalização *downstream*. Portanto, elucidar o comportamento de um determinado gene, como o *PCA3*, durante o estado patológico de um indivíduo, como no CaP, possibilita o desenvolvimento de melhores opções de diagnóstico, prognóstico e tratamento.

O Phd é uma ferramenta robusta para tal fim, ao possibilitar a descoberta de partículas miméticas e ligantes envolvidas em diversas doenças. Teoricamente, clones individuais de bibliotecas de fagos podem ser rastreados diretamente quanto à ligação ao alvo. A essência dessa tecnologia reside na ligação física entre o fenótipo do fago que exibe a proteína ou peptídeo em sua superfície e o genótipo codificante. Esse *link* permite a seleção de um único peptídeo exibido com a característica desejada, a partir de inúmeras variantes codificadas (PELTOMAA et al., 2019). Fagos recombinantes expressando peptídeos miméticos à *AGO4* foram previamente selecionados por nosso grupo de pesquisa enquanto ligantes à região promotora do *PCA3* (ALVES, 2018).

As diferentes proteínas AGO apresentam particularidades bioquímicas e se associam a tipos específicos de pequenos RNAs. A *AGO4*, por exemplo, é cataliticamente inativa, ou seja, não possui atividade endonucleásica e não é capaz de clivar os mRNAs, o que intensifica as evidências quanto ao seu papel regulatório. Além disso, o complexo RISC realiza ainda o recrutamento das proteínas GW182/TNRC6 mediadas por *AGO4* e complexos efetores a jusante, a fim de facilitar todo o processo de silenciamento pós transcricional (BRIDGE, 2017). Em *Arabidopsis thaliana* a metilação do DNA dirigida por RNA (RdDM) tem como componente chave a participação da *AGO4*. Nesse processo ocorre o pareamento de bases entre 24 nucleotídeos, pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e transcritos que direcionam o complexo de metilação para os *locus* alvo (OLIVER; SANTOS; PRADILLO, 2017). Os

lncRNAs formam uma espécie de arcabouço molecular que direciona a metiltransferase DRM2 (*Domains Rearranged Methyltransferase 2*), a qual catalisa a metilação da citosina em todos os contextos de sequência (CG, CHG e CHH, onde H representa A, C ou T). Dessa forma, a metilação do DNA nesses loci mantém a transcrição em um estado repressivo e, portanto, desempenha um papel fundamental no ajuste da expressão dos elementos genômicos (KHANG AU; DENNIS; WANG, 2017).

Em um primeiro momento, realizamos ensaios de MTT e avaliamos o perfil inibitório ou proliferativo após tratamento das células com os fagos recombinantes. Desenvolvido em 1983 por Tim Mosmann, esse teste colorimétrico quantitativo de avaliação da viabilidade celular é atualmente um dos principais testes de citotoxicidade utilizados em pesquisas devido a sua simplicidade, rapidez, custo baixo, alta precisão e elevada reprodutibilidade (MARTINS et al., 2017). Baseia-se no uso do sal brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT) para avaliar a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. A redução do MTT, de cor amarelada, a um produto insolúvel de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazan, ocorre apenas em células viáveis (mitocôndrias ativas), refletindo o estado funcional da cadeia respiratória celular. A quantidade de cristais de formazan formados e consequente intensidade da coloração púrpura são diretamente proporcionais ao número de células viáveis presentes. A densidade óptica (OD) resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983; DUARTE, 2015). Os resultados obtidos neste estudo revelaram que as partículas recombinantes utilizadas são capazes de induzir a proliferação celular nos títulos de 10^9 para a linhagem LNCaP e 10^5 para a linhagem PC3. A necessidade de titulações distintas para a visualização dos efeitos celulares evidenciam as diferenças moleculares entre as linhagens tumorais cultivadas, uma vez que a LNCaP é dependente de andrógeno e a PC3 um modelo celular resistente a castração. Hipotetizamos que o efeito celular observado ocorreu após modulação do gene *PCA3* pelo peptídeo mimético à AGO4. Para isso, transcritos dos genes *AGO4*, *PCA3* e *PRUNE2* foram quantificados nas linhagens tumorigênicas.

Sabe-se que LNCaP e PC3 têm sido as linhagens celulares de CaP mais usadas, justamente por apresentarem características significativamente diferentes. A linhagem LNCaP, isolada por Schuurmans e Mulder, em 1977, foi derivada de fragmentos de biópsias de uma metástase situada nos nódulos linfáticos de homem de 50 anos de idade. Estas células apresentam baixo potencial de ancoragem e não formam uma monocamada uniforme em cultura celular, crescendo em *clusters*, uma vez que não sofrem inibição da proliferação por contato e expressam marcadores de diferenciação luminal AR e PSA, consequentemente, são

dependentes de andrógenos, e a retirada destes inibe seu crescimento (MOROZ, 2013). Sabe-se ainda que essa linhagem apresenta alta expressão de *PCA3* (LEMOS et al., 2016). Já a linhagem PC3, isolada de metástase de uma vértebra lombar, crescem muito aderidas aos frascos de cultura, bem como em arcabouços tridimensionais. São classicamente conhecidas por serem andrógeno-independentes, sem expressão de AR e modelos de CaP resistente à castração (MOROZ, 2013). Portanto, em nosso estudo utilizamos duas linhagens tumorigênicas que representam os subtipos de CaP até então conhecidos. Estas encontram bem descritas na literatura permitindo, assim, que um monitoramento efetivo do microambiente que se encontram possa ser realizado. Sendo assim, levando em consideração suas individualidades, é possível avaliar sua atividade e a expressão de moléculas específicas que são características do tecido que constituem (SEIM et al., 2017). Para a análise molecular dos efeitos do peptídeo mimético à AGO4 quantificamos, por qPCR os transcritos dos genes *AGO4*, *PCA3* e *PRUNE2*.

Essa técnica foi escolhida devido à sua alta sensibilidade e especificidade, permitindo a avaliação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições, o que caracterizou a quantificação relativa (MOLAUDZI e MOLEPO, 2019). Adotamos a estratégia semi-quantitativa, baseada no método Cq comparativo, o qual necessita de um gene de referência para a normalização dos dados. Os principais genes de referência - também denominados *housekeeping genes* (HKGs) - funcionam como controles internos para a normalização da expressão gênica. Um dos principais requisitos para a sua escolha é a sua presença constante em todas as amostras testadas com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. Seguindo esse raciocínio, as flutuações decorrentes a variações de pipetagem e consequentemente na concentração final dos reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações de RT ou de PCR seriam corrigidas pela expressão do gene constitutivo (JULIAN et al., 2016).

Neste estudo, utilizamos o gene *B2M* como referência, o qual codifica a proteína β_2 - *microglobulina*, um componente extracelular das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, presente em todas as células nucleadas do corpo humano. A escolha de um gene constitutivo usado para essa normalização de dados permite determinar, de forma precisa e confiável, a expressão gênica, assim como facilita as análises de curvas padrão (MIDDHA et al., 2019). O gene *B2M* já foi otimizado por nosso grupo de pesquisa e também já utilizado em ensaios prévios (CURTO et al., 2019; MARTINS, 2018; MOTA, 2017; KATZ, 2014).

Os transcritos dos três genes se mostraram significativamente aumentados na linhagem LNCaP quando comparados à PC3. Esses dados sugere uma atividade orquestrada e relacionada

a vias de promoção do CaP, as quais estão reprimidas durante a progressão da doença. O gene *PCA3*, como já mencionado, encontra-se expresso apenas na linhagem hormônio-responsiva e nossos resultados confirmam os já publicados na literatura (LEMOS et al., 2016). Estudos anteriores identificaram o *PRUNE2* como uma variante do gene que codifica a proteína alvo que abriga o *locus PCA3*, classificando este como um RNA intrônico. O *PCA3* controla a atividade de PRUNE através de um mecanismo regulador exclusivo que envolve a formação de um RNA de fita dupla *PRUNE2/PCA3* que sofre edição pela proteína adenosina desaminase convertendo adenosina em inosina. PRUNE2 é um supressor tumoral regulado pelo gene *PCA3* (SALAMEH et al., 2015). Portanto, apesar dos transcritos elevados de *PRUNE2* em LNCaP, estes podem sofrer edição mediada por *PCA3* de maneira andrógeno dependente (SALAMEH et al., 2015). Além disso, sugerimos que a AGO4 também esteja correlacionada à sinalização androgênica e em processos associados à promoção do CaP. Nesse contexto, estudos posteriores devem ser realizados sem a suplementação de soro e ensaios de silenciamento gênico ou repressão da expressão por CRISPR são necessários para comprovar o papel da AGO4 na tumorigênese prostática.

Após tratamentos com as partículas fágicas, não foi verificada alteração na expressão mediada pelo peptídeo mimético à AGO4. De fato, a ativação ou repressão de um gene pode demandar múltiplos fatores (TANENBAUM et al., 2014) e apenas o peptídeo utilizado não foi suficiente para o aumento ou decréscimo expressivo dos transcritos dos genes analisados. Portanto, rejeitamos a hipótese levantada quanto aos resultados observados no ensaio MTT e sugerimos que o *PCA3* atue como *scaffold* para AGO4 e metiltransferases, modulando a tumorigênese prostática por outras vias ainda não elucidadas.

7 CONCLUSÃO

O peptídeo mimético à AGO4 induziu a proliferação das linhagens LNCaP e PC3 após 24 e 48 horas de tratamento nos títulos 10^9 e 10^5 , respectivamente. Contudo, os resultados moleculares demonstraram apenas o efeito do fago selvagem, sugerindo o papel do *PCA3* como *scaffold* para a AGO4 na modulação da tumorigênese prostática. Os resultados apontaram que maiores níveis dos transcritos dos genes *AGO4*, *PRUNE2* e *PCA3* são encontrados na linhagem celular LNCaP (hormônio-responsiva) quando comparados com a linhagem PC3 (resistente à castração), sugerindo a correlação dos três genes com a sinalização androgênica. Estudos adicionais, incluindo silenciamento e CRISPR, são necessários para elucidar o papel da AGO4 no CaP e sua associação ao *PCA3* e para a comprovação das hipóteses levantadas nesse estudo.

REFERENCIAS

AGHEBATI-MALEKI, L. et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. **J Biomed Sci**, v. 23, n. 66. 2016. Doi:10.1186/s12929-016-0285-9.

ALARCÓN C. R; TAVAZOIE S. F. Cancer: Endothelial-cell killing promotes metastasis. **Nature**. 2016 Aug v. 11, n. 536 (7615), p. 154-5. 3 Aug 2016. DOI: 10.1038/nature19465.

ALMEIDA, Miguel Vasconcelos et al. Maternal and zygotic gene regulatory effects of endogenous RNAi pathways. **PLoS genetics**, v. 15,2 e1007784. 13 Feb. 2019. Doi:10.1371/journal.pgen.1007784.

ALSHALALFA M, et al. Low PCA3 expression is a marker of poor differentiation in localized prostate tumors: exploratory analysis from 12,076 patients. **Oncotarget**, v. 8(31), p. 50804–50813. 7 Feb 2017. Doi:10.18632/oncotarget.15133.

ALVES, Douglas Alexsander. Mapeamento de epítomos baseado em peptídeos na caracterização do anticorpo FabC4. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.811>. Acesso em: 20 de out de 2019.

ARAÚJO, T.G. et al. Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breast cancer: A transcriptional disequilibrium. **Acta Histochemica**, v. 116, p. 1178-1184, 2014.

ARRIAGA-CANON, C. et al. The use of long non-coding RNAs as prognostic biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 9, p. 20872-20890. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25038>. Acesso em: 20 Jul 2018.

AZZAZY H. M. E; HIGHSMITH W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 425-445. Sep 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)>.

BARBAS C. F. et al. Phage Display: A Laboratory Manual. **The Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 4, p. 487-488, 2001.

BATISTA, T. M.; MARQUES, J. T. RNAi pathways in parasitic protists and worms. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1504-14, Aug 24 2011.

BAUMGART S. J.; HAENDLER B. Exploiting Epigenetic Alterations in Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1017, 2017.

BELINELO, R. G. S., et al. **Exames de rastreamento para o câncer de próstata: vivência de homens**, Escola Anna Nery Revista de Enfermagem, v. 18, n. 4, p.697-704, 2014. Doi: 10.5935/1414-8145.20140099.

BERNSTEIN, E. et al. Dicer is essential for mouse development. **Nat Genet**, v. 35, n. 3, p. 215-7, Nov 2003.

BRASIL - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Quimioterapia**. Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acesso em: 12 ago. 2018.

BRASIL - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Câncer de próstata**. 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao+>. Acesso em: 05 abr. 2018.

BRASIL - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Câncer de próstata**. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 09 nov. 2019.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA. **Incidência de cancer no Brasil**. Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 10 ago. 2018.

BRIDGE, K. S. et al. Argonaute Utilization for miRNA Silencing Is Determined by Phosphorylation-Dependent Recruitment of LIM-Domain-Containing Proteins. **Cell Reports**, v. 20, n. 1, p. 173-187, 2017.

BRODERICK J. et al. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. **RNA**, v. 17, n. 10, p. 1858–1869, 2011.

CANCER RESEARCH UK. **Age and Cancer**. Dez. 2016. Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer/age-and-cancer>. Acesso em 11 ago. 2018.

CANCER RESEARCH UK. **TNM Staging**. July 2016. Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/prostate-cancer/stages/tnm-staging>. Acesso em 11 ago. 2018.

CANCER. **Prostate cancer stages**, 2016. Disponível em:
<<http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-staging>>.
Acesso em: 17 out. 2016.

CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 16, p. 2733–2742. 2002. Doi: 10.1101/gad.1026102.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-55. Fev 2009. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675692/>>. Acesso em: 31 out. 2019.

CERUTTI, H.; CASAS-MOLLANO, J. A. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Curr Genet**, v. 50, n. 2, p. 81-99. Aug 2006. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583075/>>. Acesso em: 31 out 2019.

CHALERTPET, K. et al. Argonaute 4 as an Effector Protein in RNA-Directed DNA Methylation in Human Cells. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 645.
Doi:10.3389/fgene.2019.00645. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6620710/>>. Acesso em: 31 out. 2019.

CIENCIA NEWS. **Biologia do câncer**, 2016. Disponível em:
<http://www.ciencianews.com.br/index.php/publicacoes/artigos-cientificos/biologia-do-cancer/>. Acesso em: 9 nov 2016.

CIENCIA NEWS. **Imunologia do câncer**, 2016. Disponível em:
<http://www.ciencianews.com.br/index.php/publicacoes/artigos-cientificos/imunologia-do-cancer/>. Acesso em: 10 nov 2016.

COSTA; CORRÊA et al.; INCA; PAIVA, E. P. **Conhecimentos, atitudes e práticas acerca da detecção do câncer de próstata**, Tese de doutorado, 2008. Disponível em:
<http://www.abennacional.org.br/Trabalhos/Elenir_Pereira_de_Paiva.pdf>. Acesso em: 10 nov 2016.

CURTO, Pedro et al. Macrophages Infected by a Pathogen and a Non-pathogen Spotted Fever Group *Rickettsia* Reveal Differential Reprogramming Signatures Early in Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 97. 10 Apr. 2019.
Doi:10.3389/fcimb.2019.00097.

DAMIÃO, R. et al. **Controle do câncer: novos horizontes**, Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, v. 14, 2015. Disponível em:
http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=541. Acesso em: 21 out 2016.

DE FARIA, I. J. et al. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. **J Interferon Cytokine Res**, v. 33, n. 5, p. 239-53. May 2013.

DE KOK et al. DD3PCA3, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors Jacques B. Cancer Research, v. 62, p. 2695–2698, May 1, 2002.

DMITRY V. M. D. et al Prostate Cancer Academy 2017 Summaries. **Reviews Urology**, v. 19, n. 4, p. 252-260, 2017.

DO AMARAL, Raquel Juliana Vionette. **Expressão do gene Argonauta em populações naturais de *Aedes aegypti* e sua relação com a resposta à infecção viral mediada por RNA**. 2008. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

DOU, Yuhong et al. Plasma small ncRNA pair panels as novel biomarkers for early-stage lung adenocarcinoma screening. **BMC genomics**, v. 19 (1), p. 545. 20 Jul. 2018. Doi:10.1186/s12864-018-4862-z.

DUARTE, Cláudia Regina Appio. **Avaliação da citotoxicidade in vitro de composições de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea**. 2015. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Saúde Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de PósGraduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

E, Stępień et al. The circulating non-coding RNA landscape for biomarker research: lessons and prospects from cardiovascular diseases. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 39 (7), p. 1085-1099. 7 Jun 2018. Doi:10.1038/aps.2018.35.

ENDER, C.; MEISTER, G. Argonaute proteins at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 11, p. 1819-23, Jun 2010.

FANG, Chih-Yeu et al. Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. **PloS one**, v. 12,6 e0178960. 7 Jun. 2017. Doi:10.1371/journal.pone.0178960.

FERNANDES, Juliane C R et al. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. **Non-coding RNA**, vol. 5 (1), p. 17. 17 Feb. 2019. Doi:10.3390/ncrna5010017.

FERREIRA LB et al. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. **BMC Cancer**, v.2012, n. 12, p.507.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Fev 1998.

FRANCO, Rejane Carolina e SOUHAMI, Luis. Radioterapia e Hormonioterapia no Câncer de Próstata de Risco Intermediário: uma Revisão Crítica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 61(2), p. 155-163. 27 Feb. 2015.

GLUMAC, Paige M et al. The identification of a novel antibody for CD133 using human antibody phage display. **The Prostate**, v. 78,13 p. 981-991. Sep 2018. Doi:10.1002/pros.23656.

GOLDEN, Ryan J et al. An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. **Nature**, v. 542, p. 7640. 9 Feb 2017. Doi:10.1038/nature21025.

GOMES, R., et al. **As Representações da Masculinidade e o Ser Homem**, Fazendo Gênero 8 - Corpo, Violência e Poder, 2008. Disponível em: <http://www.fazendogenero.ufsc.br/8/sts/ST56/Gomes-Nascimento-Rebello_56.pdf>. Acesso em: 21 out 2016.

HANAHAN D; WEINBERG R. A; HAGAN, I.; SHARROCKS, A. D. **Understanding cancer: from the gene to the organism**, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/secure/sci-hub.cc/pmc/articles/PMC1084113/#kvfl100c3>. Acesso em: 10 nov 2016.

HE X.-J.; HSU Y.-F.; ZHU S.; WIERZBICKI A. T., PONTES O., PIKAARD C. S., et al. (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4-and RNA-binding protein. **Cell**, v. 137 (3), p. 498–508. Doi: 10.1016/j.cell.2009.04.028.

HLATKY L; HAHNFELDT P. Beyond the Cancer Cell: Progression-Level Determinants Highlight the Multiscale Nature of Carcinogenesis Risk. **Cancer Research**, v. 74, ed. 3, fev. 2014. DOI: 10.1158 / 0008-5472.CAN-13-2508.

HSING, A. W., TSAO, L., DEVESA, S. S. **International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality**, International Journal of Cancer, 1999. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000101\)85:1%3C60::AID-IJC11%3E3.0.CO;2-B/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0215(20000101)85:1%3C60::AID-IJC11%3E3.0.CO;2-B/full). Acesso em: 22 out. 2016.

HUANG, Haiming et al. Selection of recombinant anti-SH3 domain antibodies by high-throughput phage display. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 24,11, p. 1890-900. Nov 2015. Doi:10.1002/pro.2799.

JAN S Z. et al. Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. **Development.**, v. 144, n. 20, p.3659–3673, 2017. Doi: 10.1242/dev.152413.

JEDROSZKA D. et al. Markers of epithelial-to-mesenchymal transition reflect tumor biology according to patient age and Gleason score in prostate câncer, **PLoS One**, v. 12, n. 12. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5714348/#idm139858613094480title>>. Acesso em: 12 ago 2018.

JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G. J. Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 10, p. a003772, Oct 2011.

KHANG AU P.C.; DENNIS E. S.; WANG M. Analysis of Argonaute 4-Associated Long Non-Coding RNA in Arabidopsis thaliana Sheds Novel Insights into Gene Regulation through RNA-Directed DNA Methylation. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 8, p. 198, 2017.

KILPIVAARA, O., AALTONEN, L. A. **Diagnostic Cancer Genome Sequencing and the Contribution of Germline Variants**, Science, v. 339, p. 1559-1562, 2013. DOI: 10.1126/science.1233899.

KIRBY, R. **The role of PSA in detection and management of prostate cancer**, 2016. PMID: 27337755.

KOHAAR I, PETROVICS G, SRIVASTAVA S. A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. **Int J Mol Sci.**, v. 20, p. 1813. 2019. Doi:10.3390/ijms20081813.

LAHMY S. et al. Evidence for ARGONAUTE4–DNA interactions in RNA-directed DNA methylation in plants. **Genes Dev.**, v. 30 (23), p. 2565–2570. 2016. Doi: 10.1101/gad.289553.116.

LAI J. et al. A microsatellite repeat in *PC43* long non-coding RNA is associated with prostate cancer risk and aggressiveness. **Sci Rep.**, v. 7, p.16862, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-16700-y.

LARMAN H. B. et al. Descoberta de autoantígenos com um peptídeo humano sintético. **Biotecnologia natural**, v. 29, n. 6, p.535-541, 2011.

LEDGAARD et al. Basics of Antibody Phage Display Technology. **Toxins (Basel)**, v.10(6), p. 236. 9 Jun 2018. Doi:10.3390/toxins10060236.

LEMOS A.E., et al. PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. **Tumour Biol**, v. 37, p. 11339–11348. 2016. Doi: 10.1007/s13277-016-5012-3.

LI, Chi Han and CHEN, Yangchao. Targeting long non-coding RNAs in cancers: Progress and prospects. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, 8, p. 1895-1910. Aug 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.030>>. Acesso em: 9 Nov 2019.

LI, Qiuhui et al. Linking prostate cancer cell AR heterogeneity to distinct castration and enzalutamide responses. **Nature communications**, v. 9 (1), p. 3600. 6 Sep. 2018. Doi:10.1038/s41467-018-06067-7.

LIAO Y, XU K. Epigenetic regulation of prostate cancer: the theories and the clinical implications. **Asian J Androl.**, v. 21(3), p. 279 –290, 2019. Doi:10.4103/aja.aja_53_18.

LIM M.C.J., et al. RNAs as Candidate Diagnostic and Prognostic Markers of Prostate Cancer-From Cell Line Models to Liquid Biopsies. **Diagnostics (Basel)**, v. 8(3), p. 60, 2018. Doi:10.3390/diagnostics8030060.

LIMA L R; SILVA I L C; ALVES D C. Research and prevalence of risk factors for the lifting and development of prostate cancer and PSA elevation: a literature review. **Rev. Interd. Ciên. Saúde**, v. 4, n.1, p. 11-16, 2017. Disponível em: <<http://www.ojs.ufpi.br/index.php/rics/article/view/6723/3890>>. Acesso em: 10 ago 2018.

LISITSKAYA, L., ARAVIN, A. A., & KULBACHINSKIY, A. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. **Nature communications**, v. 9(1), p. 5165. Doi:10.1038/s41467-018-07449-7. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6279821/>>. Acesso em: 31 out 2019.

LOBLER, R., et al. **Avaliação do Escore de Gleason como fator prognóstico em pacientes com câncer de próstata em hormonioterapia**, Revista Brasileira de Oncologia Clínica, v. 8, n. 27, p.22-23, 2012. Disponível em: <<http://sboc.org.br/revista-sboc/pdfs/27/artigo2.pdf>>. Acesso em: 19 out 2016.

MADEIRA, Leandro Roque. **Revisão sistemática entre abiraterona e enzalutamida no tratamento de pacientes com câncer de próstata metastático resistente a castração**. 2017. Dissertação (Mestrado em Gestão de organizações de saúde) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MANQUOQLU, E., et al. **Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast, ovarian, and prostate cancer patients**. *Cancer genetics*, v. 203, n. 2, p. 230-237, 2010. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2010.07.125.

MARTINS, I. C. Perfil Transcricional do gene *Arid1a* em células de Câncer de Próstata. 2018. Dissertação (Graduação em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

MATOS, Livia Carneiro. **Expressão da proteína Wnt4 e seu possível papel como um antígeno associado ao câncer de próstata**. 2008. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós- Graduação em Oncologia – Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

MIDDHA, Sumit et al. Majority of *B2M*-Mutant and -Deficient Colorectal Carcinomas Achieve Clinical Benefit From Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and Are Microsatellite Instability-High. **JCO precision oncology**, v. 3 (2019): 10.1200/PO.18.00321. Doi:10.1200/PO.18.00321.

MOC- Manual de Oncologia Clínica. **Publicado novo relatório sobre dados mundiais de incidência e mortalidade por câncer**. 16 set 2018. Disponível em: < <https://mocbrasil.com/blog/noticias/publicado-novo-relatorio-sobre-dados-mundiais-de-incidencia-e-mortalidade-por-cancer/> >. Acesso em: 22 out 2019.

MOLAUDZI, Mulalo and MOLEPO, Julitha. The use of real-time polymerase chain reaction and an adenosine deaminase assay for diagnosing pleural tuberculosis. **African journal of laboratory medicine**, v. 8 (1) 731. 28 Aug. 2019. Doi:10.4102/ajlm.v8i1.731.

MOROZ, Andrei. Efeitos da Finasterida sobre Culturas De Células Epiteliais Prostáticas Normais e Tumorais em Diferentes Sistemas *in vitro*. Botucatu: [s.n.], 2013.

MOTA, S. T. S. **Expressão diferencial do gene PBRM1 e sua qualificação clínica em tumores de próstata**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

NAOUM, P. C. **Genética do câncer e suas interfaces biológicas**, Academia de ciência e tecnologia de São Jose do Rio Preto- SP, 2014. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/genetica/Genetica_do_cancer.pdf f. Acesso em: 16 out 2016.

OMIDFAR, K. e DANESHPOUR, M. Advances in phage display technology for drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 10, n. 6, Jun, p. 651-69. 2015.

ONCOGUIA. **A próstata, 2016**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/a-prostata/770/149/> Acesso em: 8 nov 2016.

PANERO, J., SANTOS, P. D., SLAVUTSKY, I. **Telomere protein complexes and their role in lymphoid malignancies**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814571> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814571> Acesso em: 7 out 2016.

PARDINI, Barbara et al. Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. **Cancers**, v. 11, (8), p. 1170. 14 Aug. 2019. Doi:10.3390/cancers11081170.

PATRÍCIO, R.S.G. **Desenvolvimento de material educativo digital para divulgação científica da nutrigenômica**. USP – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

PELTOMAA, Riikka et al. Phage Display in the Quest for New Selective Recognition Elements for Biosensors. **ACS omega**, v. 4,7 11569-11580. 3 Jul. 2019. Doi:10.1021/acsomega.9b01206.

PILETZ, John E. et al. Human Cells Grown With or Without Substitutes for Fetal Bovine Serum. **Cell Medicine**, v. 10 2155179018755140. 6 Jun. 2018. Doi:10.1177/2155179018755140.

RAWLA, Prashanth. Epidemiology of Prostate Cancer. **World journal of oncology**, v. 10 (2). Apr 2019. Doi:10.14740/wjon1191.

REDZOVIC A., DINTINJANA R.D., NACINOVIC A.D. **Indicators of Cellular and Developmental Disorders in Multiple Primary Cancers, 2016**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27301239>. Acesso em: 10 de nov. de 2016.

RHODEN, E. L., AVERBECK, M. A. **Câncer de próstata localizado**, Revista da AMRIGS, Porto Alegre, v. 54, n. 1, p. 92-99, 2010. Disponível em: <http://amrigs.org.br/revista/54-01/20-488_cancer_de_prostata.pdf>. Acesso em: 23 de out. de 2016.

ROLIM, Nidia et al. Complications of androgen deprivation therapy in prostate cancer /a review. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 3, p. 82-87. Dec 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341402214500559#!>>. Acesso em: 9 nov 2019.

SADI, Marcus V., et al. Câncer da próstata resistente à castração (CPRC). 25ª Reunião do CoBEU. São Paulo - SP, 11 de nov. de 2011.

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 (27). 7 Jul 2015. Doi:10.1073/pnas.1507882112.

SANCHEZ-VARGAS, I., TRAVANTY, E. A., KEENE, K. M., FRANZ, A. W. E., BEATY B. J., BLAIR, C. D., OLSON, K. E. (2004) RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. **Virus Research**, v. 102, p. 65-74.

SCHUSTER, S., MIESEN, P., & VAN RIJ, R. P. Antiviral RNAi in Insects and Mammals: Parallels and Differences. **Viruses**, v. 11(5), p. 448. Doi:10.3390/v11050448. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6563508/>>. Acesso em: 31 de out. de 2019.

SEIM, Inge et al. Whole-Genome Sequence of the Metastatic PC3 and LNCaP Human Prostate Cancer Cell Lines. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 7 (6), p. 1731-1741. 7 Jun. 2017. Doi:10.1534/g3.117.039909.

SMITH G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, G. P. e PETRENKO, V. A. Phage Display. *Chem Rev*, v. 97, n. 2, p. 391- 410. 1 Apr 1997.

SMOLLE M.A et al. Current Insights into Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) in Prostate Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 18(2), p. 473. 22 Feb 2017. Doi:10.3390/ijms18020473.

SOARES, Zamira Guerra. **Identificação e caracterização da Argonauta tcepiwi e de pequenos RNAs em Trypanosoma cruzi**. Tese (Doutorado em Bioinformática) - Curso de Pós Graduação em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais.

SROUGI, M. e GOMES, R., et al. **A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura**, *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 1, p.240-243, 2006. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/427/2/Preven%C3%A7%C3%A3o%20do%20c%C3%A2ncer%20de%20prostata.pdf>>. Acesso em: 9 de nov. de 2016.

SZELISKI K. et al. Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. **Cent European J Urol.**, v. 71(4), p. 420 – 426, 2018. Doi:10.5173/ceju.2018.1762.

TANENBAUM, Marvin E et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. **Cell**, v. 159, n. 3, p. 635-46. 23 oct 2014. Doi:10.1016/j.cell.2014.09.039.

TONON, A. C. T., **Câncer de próstata: uma revisão da literatura**, Revista Saúde e Pesquisa, v. 2, n. 3, p. 404, set./dez. 2009 - ISSN 1983-1870.

VALDMANIS P. N. et al. Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 3704-3713, 2012.

WANG J. et al. Screening and identification of RhD antigen mimic epitopes from a phage display random peptide library for the serodiagnosis of haemolytic disease of the foetus and newborn. **Blood Transfus**, v. 17, p. 53–59, 2019. Doi:10.2450/2018.0176-17.

WANG T. et al. Diagnostic significance of urinary long non-coding PCA3 RNA in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 58577–58586, 2017.

XU, Tao et al. Pathological bases and clinical impact of long noncoding RNAs in prostate cancer: a new budding star. **Molecular câncer**, v. 17 (1), p. 103. 23 Jul. 2018. D doi:10.1186/s12943-018-0852-7.

YAO, Zhifeng et al. Research Progress on Long Non-Coding RNA and Radiotherapy. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 25, p. 5757-5770. 3 Aug. 2019. Doi:10.12659/MSM.915647.

YEH F. L. et al. Peptide-conjugated nanoparticles for targeted imaging and therapy of prostate cancer. **Biomaterials**, v. 99, p. 1-15, 2016.

ZHANG, Peijing et al. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. **Journal of integrative bioinformatics**, v. 16,3 20190027. 13 Jul. 2019. Doi:10.1515/jib-2019-0027.

ZHOU W. et al. Association of Short Tandem Repeat Polymorphism in the Promoter of *Prostate Cancer Antigen 3* Gene with the Risk of Prostate Cancer., v. 6, n. 5, p.20378, 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0020378.

ZOU, Lina et al. Construction of a germline-specific RNAi tool in *C. elegans*. **Scientific reports**, v. 9,1 2354. 20 Feb. 2019. Doi:10.1038/s41598-019-38950-8.