UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**“Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e
miR-450b-5p na tumorigênese”**

BRUNA RODRIGUES MUYS

RIBEIRÃO PRETO-SP

2017

BRUNA RODRIGUES MUYS

**“Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e
miR-450b-5p na tumorigênese”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de Doutora em
Ciências Biológicas-Área de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr FMRP-USP
Co-orientador: Dr. Daniel Onofre Vidal FHCB

RIBEIRÃO PRETO-SP

2017

Muys, Bruna Rodrigues

Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese. Ribeirão Preto, 2017.

167p.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética. Área de concentração: Genética.

Orientador: Wilson Araújo da Silva Júnior.

Co-orientador: Daniel Onofre Vidal

1- câncer; 2- microRNA; 3- ovário; 4-miR-450a e miR-450b-5p; 5- biomarcadores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Rodrigues Muys

Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Doutora**. Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	<hr/>	
Instituição:	Assinatura:	<hr/>
Prof. Dr.	<hr/>	
Instituição:	Assinatura:	<hr/>
Prof. Dr.	<hr/>	
Instituição:	Assinatura:	<hr/>
Prof. Dr.	<hr/>	
Instituição:	Assinatura:	<hr/>
Prof. Dr.	<hr/>	

EPÍLOGO

A vida sem ciência é uma espécie de morte.

Sócrates

DEDICATÓRIA

À minha família,

Principalmente à minha mãe, que é essencial em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Wilson, que me deu oportunidade de concretizar este projeto e me apoiou em minhas ideias;

Ao Daniel, que me ajudou principalmente com sugestões e correções;

Agradeço à minha família, que me deu forças para continuar nos momentos mais difíceis;

Agradeço aos muitos amigos e colegas do laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (Anemarie, Anelisa, Ádamo, Andrès, Adriana, Ana Júlia, Aline, Carla, Diana, Greice, Josane, Jéssica, Luíza, Rafaela, Meire, Kamila, Isabela, Simone, Thaís, Daniele, Graziela, Natália, Camila) pela amizade, orientação, atenção e compreensão, que tornaram a realização cotidiana deste projeto agradável e inesquecível;

À Anemarie e à Greice, que me ajudaram nas clonagens;

À Kamila, que preparou as bibliotecas e correu as amostras do RNA-seq;

À Adriana, que realizou os sequenciamentos Sanger;

À Carla e Meire, que me ajudaram nas questões burocráticas do Hemocentro;

À Jéssica, que analisou os dados de RNA-seq;

À Cleide, que me ajudou muito nos experimentos *in vivo*;

À Josiane, que me ajudou na preparação das lâminas histológicas;

À Thatiane, que me ensinou a trabalhar com a transdução lentiviral;

Ao Júlio e à Dalila, que me ajudaram no desenho inicial do projeto;

À Dalvinha, que fez todo o trâmite para enviar minhas células ao exterior;

À Susie, que sempre me ajudou nas questões burocráticas;

Aos docentes e demais funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto e Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

Ao pesquisador Markus Hafner, por me receber e permitir o avanço do projeto com uma técnica ainda ausente no Brasil;

Aos colegas e amigos do RNA Molecular Biology Group do NIAMS;

À CAPES e a FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho;

A todos os outros amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram de algum modo para minha formação e concretização deste trabalho.

RESUMO

MUYS, B. R. **Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese**. 2017. 167f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O câncer de ovário é a quinta maior causa de óbitos relacionados ao câncer em mulheres em todo o mundo, com pacientes tendo taxas de sobrevivência extremamente baixas. MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores em torno de 22 ribonucleotídeos que desempenham um papel crítico na regulação da expressão gênica em praticamente todos os processos biológicos. Os miRNAs induzem o silenciamento de seus alvos através da repressão de tradução ou clivagem de mRNA. Neste trabalho verificamos que o miR-450a e o miR-450b-5p, dois miRNAs pouco explorados em tumores ginecológicos, foram regulados de forma negativa no câncer de ovário e nas linhagens de câncer de colo do útero. O objetivo deste trabalho foi verificar a hipótese de que tanto o miR-450a como o miR-450b-5p atuam como supressores tumorais em cânceres de tecido reprodutivo. Para testar esta hipótese, utilizamos ensaios *in vitro* e um modelo xenográfico *in vivo*. Usando um vetor de expressão lentiviral, miR-450a e miR-450b-5p foram superexpressos de forma estável nas linhagens A2780, OVCAR-3 e SKOV-3 (linhagens tumorais de ovário) e C33 e SiHa (linhagens tumorais de câncer cervical). A taxa de anoikis foi analisada nas células submetidas a placas de baixa aderência durante 24 horas: a superexpressão de miR-450a resultou em menor viabilidade nas linhagens SiHa, OVCAR-3, A2780 e SKOV-3. Em relação à proliferação celular, as células A2780 que superexpressam o miR-450a proliferaram a uma taxa maior em comparação com as células controle. No entanto, no ensaio clonogênico essas células apresentaram menor número de colônias que eram visivelmente maiores. Por outro lado, o miR-450b diminuiu a taxa de proliferação na linhagem SKOV-3, o que foi corroborado no ensaio clonogênico. Também foram medidas as taxas de migração e invasão celular usando ensaio *transwell*. A superexpressão de miR-450a ou miR-450b-5p resultou em maior potencial de migração da linha celular C33, mas menor taxa de migração e invasão nas linhagens A2780 e SKOV3. Na linhagem OVCAR-3, a superexpressão do miR-450a aumentou o número de células capazes de invadir, já o miR-450b-5p induziu uma maior taxa de migração. A superexpressão do miR-450b-5p na linhagem SiHa resultou em menor potencial de invasão em comparação com o grupo controle correspondente. Após estes ensaios *in vitro*, decidimos continuar nossa análise apenas com células A2780 e SKOV-3, que apresentaram um padrão mais parecido nos ensaios. No ensaio *in vivo*, as células A2780 transduzidas foram injetadas intraperitonealmente em camundongos imunodeficientes de 9-11 semanas e, após 4 semanas, o peso de tumores recuperados foi comparado. Neste modelo xenográfico de câncer de ovário, verificamos que ambos os miRNAs diminuíram o crescimento tumoral, o que corrobora nossos ensaios *in vitro*. Também verificamos que a maioria dos alvos diretos encontrados por meio do método do PAR-CLIP e aqui validados do miR-450a estão relacionados ao metabolismo energético nas mitocôndrias (*TIMMDC1*, *ACO2*, *ATP5B*), além dos genes *PAPSS1*, *CITED2*, *MAML1* e *VIM*, o marcador canônico do processo de EMT. O alvo direto para miR-450b, *ME1*, também está relacionado ao metabolismo energético. Até o momento, nossa análise verificou que os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p são comprovadamente relevantes para o processo tumorigênico de tumores epiteliais de ovário e agem como supressores tumorais principalmente pela regulação de genes que atuam no metabolismo energético.

Palavras-chave: miR-450a, miR-450b-5p, função, câncer, ovário

ABSTRACT

MUYS, B. R. **Functional study of microRNAs miR-450a and miR-450b-5p in tumorigenesis** 2017. 167f. Thesis (Doctoral) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Ovary cancer is the fifth largest cause of cancer-related deaths for women worldwide, with patients presenting extremely low 5-year survival rates. MicroRNAs (miRNAs), non-coding RNAs around 22 ribonucleotides long, play a critical role in gene expression regulation in virtually all biological processes. miRNAs induce gene silencing of their targets through translation repression or mRNA cleavage. We showed that miR-450a and miR-450b-5p, two functionally underexplored miRNAs in gynecologic tumors, were downregulated in ovarian cancer and cervical cancer cell lines. The aim of this work was to verify the hypothesis that both miR-450a and miR-450b-5p display tumor suppressor functions in reproductive tissue cancers. For this purpose, we utilized *in vitro* assays and an *in vivo* xenographic model. Using a lentiviral expression vector, miR-450a and miR-450b-5p were stably overexpressed in A2780, OVCAR-3 and SKOV-3 (ovarian cancer cell lines) and C33 and SiHa (cervical cancer cell lines). The anoikis rate was analyzed in those cells submitted to low adherence plates for 24 hours: miR-450a overexpression resulted in lower viability in SiHa, OVCAR-3, A2780 and SKOV-3 cells. Regarding to cell proliferation, A2780 cells overexpressing miR-450a proliferated at higher rate compared to the control counterpart. However, these cells presented fewer but noticeable larger colonies at the clonogenic assay. On the other hand, miR-450b decreased the proliferation rate in SKOV-3, what was corroborated in the clonogenic assay, wherein the number of colonies were reduced at the same cell line. We also measured cell migration and invasion rates using transwell assays. Overexpression of miR-450a or miR-450b-5p resulted in higher migration potential of C33 cell line but lower migration and invasion rates in A2780 and SKOV3 cell lines. In OVCAR-3 cell line, miR-450a overexpression caused an increase in number of invaded cells and miR-450b-5p overexpressed cells migrated in higher number than control group. The overexpression of miR-450b-5p in SiHa cell line resulted in lower invasion potential compared to correspondent control group. After these *in vitro* experiments, we decided to continue our analysis only with A2780 and SKOV-3 cells, which had the most similar pattern. In the *in vivo* assay, transduced A2780 cells were injected intraperitoneally in 9-11 weeks immunodeficient mice and the weight of dissected tumors were compared after 4 weeks. In this *in vivo* xenographic model of ovarian cancer, we verified that both miRNAs impaired tumor growth, which corroborates our *in vitro* assays. We also verified that most of the direct targets found through PAR-CLIP technique validated in this work for miR-450a are related to energetic metabolism in mitochondria (*TIMMDC1*, *ACO2*, *ATP5B*) besides *PAPSS1*, *CITED2*, *MAML1* and *VIM*, the canonical marker of EMT. The direct target for miR-450b, *ME1*, is also related to energetic metabolism. To date, our analysis points to the scenario of miR-450a and miR-450b-5p playing functions like tumor suppressors proven to be relevant to the tumorigenic process of ovarian epithelial tumors. Additionally, they do that mostly by regulating genes responsible by the energetic metabolism.

Keywords: miR-450a, miR-450b-5p, function, cancer, ovary

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-SU: 4-tiouridina

ATP: Trifosfato de Adenosina (*Adenosine TriPhosphate*)

BSA: Albumina do Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

cDNA: DNA complementar

Ci: Curie (unidade de medida da radioatividade)

COE: Câncer de Ovário Epitelial

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*)

dNTP: Desoxirribonucleotídeos TriFosfatos (*DeoxyNucleotide TriPhosphates*)

DTT: Ditioneitol (*1,4-Dithiothreitol*)

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*EthyleneDiamine Tetraacetic Acid*)

EMT: Transição Epitélio-Mesênquima (*Epithelial to Mesenchymal Transition*)

F: Farad (capacitância)

GFP: Proteína Verde-Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

Hepes: (Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico) [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IP: tampão de ImunoPrecipitação

LB: Luria Bertani

lncRNAs: RNAs longos não codificadores

M: molar

MEM: Meio Mínimo Essencial (*Minimum Essential Media*)

MET: Transição Mesênquima-Epitélio (*Mesenchymal to Epithelial Transition*)

mg: miligrama

miRNAs: microRNAs

ml: mililitro

mm: milímetro

MOPS: ácido 3-[N-morfolino] – propanosulfônico [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]

mRNAs: RNAs mensageiros

NEAA: AminoÁcidos Não Essenciais (*Non-Essential Amino Acids*)

nm: nanômetro

nM: nanomolar

PAGE: Eletroforese com gel de Poliacrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

PAR-CLIP: (*Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*)

PBS: Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCA: Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis*)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)-

PI: Iodeto de Propídeo (*Propidium Iodide*)

piRNAs: RNAs que interagem com proteínas Piwi

PNK: Tampão de Fosforilação do Polinucleotídeo (*Polynucleotide Kinase buffer*)

RIN: Número da Integridade do RNA (*RNA Integrity Number*)
RPM: Rotações por Minuto
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
rRNAs: RNAs ribossômicos
RT-qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa após Transcrição Reversa (*Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*)
SAP: Fosfatase Alcalina do Camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)
SDS: Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
SEO: Superfície Epitelial do Ovário
SFB: Soro Bovino Fetal
siRNAs: pequenos RNAs de interferência
snoRNAs: pequenos RNAs nucleolares
snRNAs: pequenos RNA nucleares
SOC: Meio Super Ótimo com Repressão Catabólica (*Super Optimal Broth with Catabolite repression*)
TBST: (*Tris-buffered saline, Tween 20*)
TCGA: Atlas do Genoma do Câncer (*The Cancer Genome Atlas*)
Tris: trisaminometano
tRNAs: RNAs transportadores
U: Unidade de atividade enzimática
UTR: Região Não Traduzida (*Untranslated Region*)
UV: ultra-violeta
V: Volts
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
 γ -³²P-ATP: Trifosfato de Adenosina marcado no grupo do fosfato gama com ³²P
 Ω : ohms (resistência)
 μ g: micrograma
 μ l: microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Câncer de ovário	18
1.1.1. Estatísticas.....	18
1.1.2. Tratamento.....	18
1.1.4. Fatores de risco	19
1.1.5. Perfil histológico e molecular	19
1.1.6. Câncer do ovário hereditário.....	20
1.1.7. Origem	21
1.1.8. Metástase	22
1.1.10. Transição-epitélio-mesênquima.....	24
1.2. RNAs não codificadores.....	26
1.2.1. microRNAs.....	27
1.2.2. Câncer de ovário e miRNAs	30
1.3. Biomarcadores do câncer de ovário	31
1.4. miRNAs miR-450a e miR-450b-5p.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivos gerais	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Manutenção e expansão das linhagens.....	37
3.2. Extração de RNA	37
3.3. Síntese de cDNA.....	38
3.4. Análise dos níveis de expressão por meio de RT-qPCR.....	38
3.5. Triagem inicial de linhagens tumorais do sistema reprodutor.....	41
3.6. Construção dos vetores de expressão.....	42
3.6.1 Clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO® TA	44
3.6.2. Subclonagem no vetor pLVX-IRES-ZsGreen	45
3.7. Produção de lentivírus	48
3.8. Transdução lentiviral.....	49
3.9. Análise da eficiência de transdução.....	50
3.10. Análise da expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p após a transdução	52
3.11. Análise do efeito da superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p na regulação de processos biológicos ligados à tumorigênese.....	53
3.11.1. Ensaios funcionais <i>in vitro</i>	53
3.11.1.1 Ensaio de apoptose (anoikis)	53
3.11.1.2. Ensaio clonogênico	54
3.11.1.3. Ensaio de proliferação	55
3.11.1.4. Ensaio de migração	56
3.11.1.5. Ensaio de invasão	57
3.11.2. Ensaios funcionais <i>in vivo</i>	58
3.12. Análise de correlação de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Carcinoma de Células Escamosas de Colo de Útero e Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário com dados clínico-patológicos obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA)	59
3.13. Análise global de expressão gênica por RNA-Seq	60
3.14. Análises de vias enriquecidas.....	63
3.15. Avaliação da interação dos miRNAs estudados com mRNAs em escala genômica utilizando o PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation)	63
3.15.1. Incorporação do análogo do ribonucleosídeo fotoreativo e crosslinking	65

3.15.2. Extração celular	66
3.15.3. Imunoprecipitação e tratamentos com RNase e fosfatase	66
3.15.4. Radiomarcagem do RNA recuperado	68
3.15.5. SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e digestão com proteinase K	68
3.15.6. Ligação do adaptador 3'	72
3.15.7. Ligação do adaptador 5'	74
3.15.8. Transcrição Reversa	75
3.15.9. Amplificação por PCR	75
3.15.10. Purificação e quantificação	76
3.15.11. Sequenciamento	77
3.16. Avaliação da expressão proteica dos possíveis alvos dos miRNAs em estudo: ACO2, MAML1, ME1, PAPSS1 e VIM nas linhagens A2780 e SKOV-3...	77
3.17. Análise da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) nas linhagens A2780 e SKOV-3	79
3.18. Análise de correlação da expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA) com seus alvos validados	79
3.19. Análises estatísticas	80
3.19.1. Análises de expressão	80
3.19.2. Experimentos funcionais	81
3.19.3. Análises de correlação dos dados obtidos do TCGA	81
3.19.4. Análises referentes ao RNA-Seq	81
3.19.5. Análises referentes ao PAR-CLIP	83
4. RESULTADOS	85
4.1. Ensaio de apoptose (anoikis)	85
4.2. Ensaio clonogênico	88
4.3. Ensaio de proliferação	90
4.4. Ensaio de migração	92
4.5. Ensaio de invasão	94
4.6. Análise de correlação de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Carcinoma de Células Escamosas de Colo de Útero e Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário com dados clínico-patológicos obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA)	96
4.7. Análise global de expressão gênica por RNA-Seq	98
4.8. Análises de vias enriquecidas	104
4.9. Ensaio funcional in vivo (modelo xenográfico de câncer de ovário)	106
4.10. Análise da interação dos miRNAs estudados com mRNAs em escala genômica utilizando o PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation)	108
4.11. Análise de expressão dos possíveis alvos	110
4.12. Avaliação da expressão proteica dos possíveis alvos dos miRNAs em estudo: ACO2, MAML1, ME1, PAPSS1 e VIM nas linhagens A2780 e SKOV-3	112
4.13. Análise da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) nas linhagens A2780 e SKOV-3	113
4.14. Análise de correlação da expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA) com seus alvos validados	115
5. DISCUSSÃO	116
5.1. Ensaios funcionais in vitro e in vivo após a superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b	116
5.2. Análise de correlação de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Carcinoma de Células Escamosas de Colo de Útero e	

<i>Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário com dados clínico-patológicos obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA)</i>	121
<i>5.3. Análises referentes ao RNA-Seq</i>	122
<i>5.5. Análise de expressão do mRNA e proteína dos possíveis alvos</i>	122
<i>5.4. Análise da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) nas linhagens A2780 e SKOV-3</i>	128
6. CONCLUSÕES	130
7. BIBLIOGRAFIA	133
8. ANEXOS	139
<i>8.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa</i>	139
<i>8.2. Parecer do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal</i>	142
<i>8.3. Parecer da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança</i>	143
9. APÊNDICE	144
<i>9.1. Manuscrito a ser submetido para publicação</i>	144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da progressão do câncer de ovário.	23
Figura 2. Biogênese dos miRNAs	29
Figura 3. Comparação entre os níveis de expressão em tecidos normais e linhagens tumorais dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p.....	32
Figura 4. A. RT-qPCR utilizando amostras de um painel de tecidos normais para os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p. B. RT-qPCR utilizando amostras de linhagens células tumorais para os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p.....	33
Figura 5. Correlação de Pearson (r) entre os miRNAs miR-450a e miR-424, e entre o miR-450b-5p e miR-424 em relação às expressões obtidas das amostras do painel de tecido normal.....	34
Figura 6. Expressão relativa dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p nas linhagens tumorais de cérvix, próstata e ovário em relação ao tecido normal correspondente.	42
Figura 7. Mapa do vetor pLVX-IRES-ZsGreen.....	43
Figura 8. Alinhamento ao genoma humano das sequências dos fragmentos (barras negras) contendo os pri-miRNAs miR-450a (A) e miR-450b (B) que foram clonados no vetor pLVX-IRES-ZsGreen.....	48
Figura 9. Resultado da eficiência de transdução por citometria de fluxo para as diferentes linhagens criadas.....	51
Figura 10. Expressão relativa dos miRNAs de interesse para cada linhagem criada.	52
Figura 11. Esquema representando as principais etapas do método PAR-CLIP.....	65
Figura 12. Representação esquemática da organização de motifs da proteína TNRC6B e suas regiões de interação com a AGO2.....	67
Figura 13. Imagem representativa do resultado do Western blot contra a proteína AGO2 para checar a eficiência de imunoprecipitação.	69
Figura 14. Imagem representativa dos RNAs ligados à proteína AGO2 após imunoprecipitação, corrida em gel SDS e transferência para membrana, conforme os itens 3.16.3 a 3.16.5... ..	70
Figura 15. Avaliação da morte celular das linhagens tumorais de colo de útero SiHa e C33 após cultivo em placa de baixa aderência.....	87
Figura 16. Avaliação da morte celular das linhagens tumorais ovário A2780, SKOV-3 e OVCAR-3 após cultivo em placa de baixa aderência.	88
Figura 17. Avaliação da clonogenicidade das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3.	89
Figura 18. Imagens representativas das colônias por grupo ao final do experimento das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3..	90
Figura 19. Avaliação da proliferação das linhagens tumorais de colo de útero SiHa e C33.....	91
Figura 20. Avaliação da proliferação das linhagens tumorais de ovário A2780, SKOV-3 e OVCAR-3.	91
Figura 21. Avaliação da migração das linhagens SiHa, C33 (linhagens tumorais de colo de útero), e A2780, SKOV-3 e OVCAR-3 (linhagens tumorais de ovário), com membrana transwell..	92
Figura 22. Imagens representativas do ensaio de migração com membrana transwell das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3..	93
Figura 23. Avaliação da invasão das linhagens SiHa, C33 (linhagens tumorais de colo de útero), e A2780, SKOV-3 e OVCAR-3 (linhagens tumorais de ovário), com membrana transwell.	94
Figura 24. Imagens representativas do ensaio de invasão com membrana transwell das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3.	95

Figura 25. Qualidade das bases geradas no RNA-Seq. Gráfico (escala Phred x posição das bases nas reads) representativo de uma lane do RNA-Seq realizado..	99
Figura 26. PCA plot gerado após o agrupamento das amostras conforme sua expressão global.	100
Figura 27. MA plots que representam o log do fold change da expressão normalizada entre uma amostra controle e tratamento (R e G) no eixo y [$\log_2(R/G)$] e o log da média de expressão normalizada entre as mesmas amostras no eixo x [$\frac{1}{2} \log_2(RG)$]..	102
Figura 28. Volcano plot (valor p x fold change), agrupando as três linhagens diferentes segundo a superexpressão do miR-450a contra as três linhagens controles (^{+pLVX}).....	103
Figura 29. Volcano plot (valor p x fold change), agrupando as três linhagens diferentes segundo a superexpressão do miR-450b contra as três linhagens controles (^{+pLVX}).....	104
Figura 30. Peso total dos tumores recuperados da cavidade peritoneal dos animais após 29 dias de injeção das células A2780..	107
Figura 31. Imagem representativa dos tumores extraídos e dos animais dos grupos correspondentes ao final de 4 semanas após a injeção das células A2780.....	107
Figura 32. Distribuição dos RNAs recuperados das linhagens A2780 quanto a sua classificação ou quanto a parte específica de mRNAs ligados à proteína AGO2...	109
Figura 33. Distribuição dos RNAs exclusivos das linhagens tratadas que continham a sequência completa da região seed de seus respectivos miRNAs.	109
Figura 34. Análise da expressão por RT-PCR de genes candidatos a serem alvos dos miRNAs em estudo nas linhagens A2780 (gráficos da esquerda) e SKOV-3 (gráficos da direita).....	111
Figura 35. Western blot para as amostras das linhagens A2780 e SKOV-3 após superexpressão do miR-450a.	112
Figura 36. Western blot para as amostras da linhagem A2780 após superexpressão do miR-450b.....	113
Figura 37. Análise da expressão de alguns genes relacionados ao processo de EMT nas linhagens A2780 (gráficos da esquerda) e SKOV-3 (gráficos da direita).....	114
Figura 38. Correlações negativas encontradas entre a expressão do miR-450a e de seus alvos ACO2 (esquerda) e ATP5B (direita) em amostras de Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA).	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers customizados e utilizados nas reações contendo SYBR.....	40
Tabela 2. Tempo de incubação e número de células adicionadas no inserto para cada linhagem no ensaio de migração.....	57
Tabela 3. Tempo de incubação e número de células adicionadas no inserto para cada linhagem no ensaio de invasão.	58
Tabela 4. Médias da porcentagem de viabilidade (células PI e Anexina V negativas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência.....	86
Tabela 5. Médias da porcentagem de apoptose inicial (células somente Anexina V positivas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência..	86
Tabela 6. Médias da porcentagem de morte celular (células somente PI positivas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência.....	86
Tabela 7. Médias da porcentagem de apoptose tardia (células PI e Anexina V positivas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência..	86
Tabela 8. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450a em tecidos de em carcinoma de células escamosas de colo de útero com dados clínico-patológicos.	97
Tabela 9. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450b-5p em tecidos de em carcinoma de células escamosas de colo de útero com dados clínico-patológicos.	97
Tabela 10. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450a em tecidos de cistoadenocarcinoma seroso de ovário com dados clínico-patológicos.....	98
Tabela 11. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450b-5p em tecidos de cistoadenocarcinoma seroso de ovário com dados clínico-patológicos.....	98
Tabela 12. Número e mapeamento de reads por linhagem geradas no RNA-Seq. .	99
Tabela 15. Possíveis alvos encontrados para o miR-450a.....	110
Tabela 16. Possíveis alvos encontrados para o miR-450b.....	111

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de ovário

1.1.1. Estatísticas

O câncer de ovário é o segundo tipo tumoral mais comum e o mais mortal dos cânceres ginecológicos no mundo (HANSEN; COLEMAN; SOOD, 2016). Sua alta taxa de mortalidade é devido à falta de sintomas específicos, (no momento do diagnóstico 75% das pacientes já se encontram com a doença em estágio avançado); falta de biomarcadores confiáveis, e tipos histológicos resistentes à drogas, o que faz com que a taxa de sobrevivência em cinco anos das pacientes seja de somente 27% (INCA; CANNISTRA, 2004, LALWANI; FASIH, 2011; LENGYEL et al., 2014, CHO; HOWELL; COLVIN, 2015). Dessa forma, o câncer de ovário é o tipo de tumor ginecológico com a menor taxa de cura e o mais difícil de se diagnosticar. No Brasil, foram estimados 6150 novos casos em 2016 e a confirmação de 3283 mortes em 2013 causados por esta doença (INCA).

1.1.2. Tratamento

O tratamento padrão do câncer de ovário envolve cirurgia para remover a maior quantidade de massa tumoral possível e, posteriormente, a quimioterapia. Neste último, são utilizadas drogas baseadas em platina e

taxano (YEUNG et al., 2016), porém em 60% das pacientes em estágio avançado da doença há recorrência ou resistência à droga (BHATT et al., 2016).

1.1.4. Fatores de risco

O fator de risco mais significativo para o câncer de ovário é a presença da doença na família. Além disso, fatores que aumentam o número de ciclos da ovulação, como a menstruação precoce, a menopausa tardia e o fato de nunca ter engravidado também são variáveis que aumentam a chance do aparecimento deste tipo de câncer. Os fatores que diminuem o risco da doença são aqueles que diminuem o número de ovulações, como o uso de anticoncepcionais orais, múltiplas gravidezes e período de lactação prolongado (LALWANI; FASIH, 2011).

1.1.5. Perfil histológico e molecular

Os ovários são formados por três tipos principais de células: epiteliais, germinativas e estromais (YEUNG et al., 2016). O câncer de ovário epitelial (COE) é o tipo mais comum de câncer de ovário, sendo representado por 85% dos casos (HANSEN; COLEMAN; SOOD, 2016). Outros tipos de tumores de ovário originam-se de tipos celulares remanescentes, como cordão sexual/estroma, células germinativas ou misturas de mais de um tipo de célula (NEZHAT et al., 2015).

De acordo com seu padrão histológico, o COE pode ser classificado em seroso (68-71%), endometrióide (9-11%), de células claras (12-13%), mucinoso (3%), transicional (1%) e de histologias mistas (NEZHAT et al., 2015).

Atualmente, de acordo com a combinação de dados histopatológicos e alterações genéticas, o COE é dividido em dois tipos (tipo I e tipo II). O primeiro tipo inclui tumores serosos-papilares, endometrióides, de células claras, e limítrofes de baixo grau e de baixo potencial maligno. Estes são caracterizados pelo diagnóstico em idade jovem, sobrevida maior (82 meses) e relativa resistência ao tratamento quimioterápico padrão (Carboplatina e Taxol). Já o tipo II é composto de tumores de histologia serosa; de alto grau; são mais frequentes e inicialmente mais sensíveis aos quimioterápicos contendo platina e de sobrevida menor (30 meses) (NEZHAT et al., 2015).

O COE tipo II é caracterizado pela presença de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *PPP2R1A* e *BCL2*; sendo que as mutações nos três primeiros genes são mutuamente exclusivas. Por outro lado, o COE do tipo I é associado com mutações no gene *TP53* e é geneticamente mais estável (DUTTA; DUTTA, 2013; KURMAN; SHIH, 2010; LALWANI; FASIH, 2011; NEZHAT et al., 2015).

1.1.6. Câncer do ovário hereditário

A grande maioria dos casos de câncer de ovário são esporádicos e o restante, cerca de 10%, são de origem hereditária. O câncer de ovário de

origem hereditária em geral ocorre em pacientes mais jovens e está relacionado a síndromes.

As síndromes envolvidas com a origem hereditária desta doença são a síndrome do câncer de mama e ovário hereditário, a qual está associada com mutações germinativas dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (genes de reparo do DNA), e a síndrome de Lynch II (câncer colorretal hereditário sem polipose), associada a mutações germinativa dos genes de reparo do DNA do tipo *mismatch* (*MSH2* e *MLH1*) (LALWANI; FASIH, 2011; RAMALINGAM, 2016).

As mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* levam ao acúmulo de anormalidades cromossômicas e perda de controle do ciclo celular. Já defeitos nos genes *MSH2* e *MLH1* levam à instabilidade de microsátélites e a inativação de genes que regulam o ciclo celular e o reparo do DNA (LALWANI; FASIH, 2011).

1.1.7. Origem

Quanto ao tecido de origem do câncer de ovário, tradicionalmente é aceita a “teoria da ovulação incessante”, em que a cada ovulação, há um trauma e o subsequente reparo do mesotélio do ovário, o que levaria ao aprisionamento deste tecido no ovário, à formação de cistos e posteriormente ao COE. Porém, esta teoria perde força quando são analisados os diferentes tipos histológicos do câncer de ovário (seroso, endometrióide, de célula clara, mucinoso e transicional), cujas morfologias lembram o epitélio das trompas uterinas, endométrio, trato gastrointestinal ou endocérnix e bexiga, respectivamente. Todos estes órgãos são derivados dos ductos de Müller, já

o ovário, do mesotélio. Dessa forma, uma teoria alternativa é a de que os tumores com um fenótipo mülleriano seriam derivados do chamado sistema secundário mülleriano. Tais tumores derivariam de cistos que cresceriam e formariam tumores anexos ao ovário, os quais aparentemente teriam sido derivados do último (KURMAN; SHIH, 2010; LALWANI; FASIH, 2011).

Além destas duas teorias, há uma terceira especificamente para COE seroso e de alto grau, que corresponde a maior parte dos cânceres de ovário, que afirma que estes são originados nas trompas de Falópio e, posteriormente, se espalham para o ovário (KURMAN; SHIH, 2010).

1.1.8. Metástase

O câncer de ovário se distingue da maioria dos outros tumores sólidos em relação a via de metástase predominante (LENGYEL et al., 2014). Em vez de se disseminarem pela corrente sanguínea, as células tumorais de ovário frequentemente migram por meio da cavidade peritoneal, onde múltiplos órgãos podem ser colonizados (Figura 1). Neste caso, as metástases para o omento são observadas em 80% das pacientes com câncer seroso de ovário. Além destas duas vias, há a disseminação pelos linfonodos, a qual é fortemente correlacionada à via peritoneal (TAN; AGARWAL; KAYE, 2006).

Modelo da progressão do câncer de ovário

Figura 1. Modelo da progressão do câncer de ovário. Modificado de AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007.

Dependendo da via de metástase, a disseminação das células pode ser passiva, quando se dá pela cavidade peritoneal, ou ativa, quando envolve a corrente sanguínea (YEUNG et al., 2016). A via metastática é passiva quando o destacamento das células do tumor primário e movimentos fisiológicos do fluido peritoneal para o peritônio e omento são a rota de disseminação das células tumorais. Neste caso, o excesso de fluido peritoneal, conhecido como ascite (um dos sintomas da doença), tem papel importante na disseminação passiva das células e contribui de forma significativa para a mortalidade das pacientes (YEUNG et al., 2015). A ascite ocorre em decorrência da obstrução linfática pelas células metastáticas e o

aumento do fluido peritoneal pelas células mesoteliais que revestem a cavidade peritoneal, que aumentam a permeabilidade vascular da região (DAVIDSON; TROPÉ; REICH, 2012).

Já quando ocorre a metástase hematogênica, esta é considerada uma via ativa, sendo que as pacientes possuem metástases retroperitoneais ou distantes (como para o fígado ou pulmão) (PRADEEP et al., 2014; YEUNG et al., 2016).

Em geral, as células metastáticas que rompem a cápsula do ovário e vão para a cavidade peritoneal podem se agregar e formar estruturas denominadas esferóides ou podem permanecer como células únicas e posteriormente se implantam em tecidos adjacentes (AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007) (Figura 1).

1.1.10. Transição-epitélio-mesênquima

A transição-epitélio-mesênquima (EMT) é um programa celular que faz com que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com uma membrana basal, sofra transformação para um fenótipo mesenquimal. Tais fenótipos incluem uma morfologia mais fusiforme (em forma de fibroblasto), aumento da capacidade migratória e invasiva, e aumento da resistência à apoptose (KALLURI; WEINBERG, 2009); e são derivados da reprogramação molecular da célula, usualmente pela perda de proteínas específicas de junção das células epiteliais (e.g., E-caderina) e aumento da expressão de marcadores de células mesenquimais (e.g., Vimentina e N-caderina). Células que sofreram o processo de EMT podem converter-se para o fenótipo

epitelial (processo reverso chamado de MET) quando aderem a um sítio secundário de metástase (KOUTSAKI; SPANDIDOS; ZARAVINOS, 2014) (Figura 1).

O EMT é um programa de desenvolvimento embrionário, de regeneração de tecidos após injúrias e também da progressão do câncer (AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007). No último caso, ele permite a migração das células tumorais do sítio primário para sítios metastáticos (WAN; PANTEL; KANG, 2013).

O câncer de ovário parece desafiar as características gerais do processo de EMT (DAVIDSON; TROPÉ; REICH, 2012). Isto ocorre pelo fato de que a superfície epitelial do ovário (SEO) possui um fenótipo diferenciado, mas “não comprometido”, pois retém a capacidade de diferenciar em diferentes tipos celulares dependendo do estímulo ambiental (AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007). Dessa forma, na SEO são expressos normalmente genes relacionados a características epiteliais (E-caderina) e mesenquimais (Vimentina) (FEKI et al., 2009). Após o processo de ovulação é necessário a reparação da SEO e normalmente tal tecido sofre EMT com esta finalidade (AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007; TAN; AGARWAL; KAYE, 2006). Acredita-se que o processo de EMT possa facilitar a liberação de células da SEO que eventualmente fiquem presas devido a invaginação das mesmas no estroma do ovário, as quais podem levar ao surgimento de cistos, os quais, por sua vez, devido a exposição de citocinas inflamatórias, podem acumular alterações genéticas que levariam ao estágio primário da progressão do câncer de ovário (AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007; FEKI et al., 2009; OTTEVANGER, 2017).

Portanto, diferentemente de outros tipos tumorais no câncer de ovário, as células tumorais não são totalmente comprometidas com o fenótipo epitelial ou mesenquimal, haja visto que as células que migram para a cavidade peritoneal podem reverter seu fenótipo posteriormente (processo de MET citado acima)(DAVIDSON; TROPÉ; REICH, 2012).

1.2. RNAs não codificadores

Contrariando todas as estimativas da época, o Projeto Genoma Humano contabilizou aproximadamente 25.000 genes codificadores de proteínas, quando o número esperado era maior do que 60.000 (PONTING; BELGARD, 2010). O número encontrado de genes codificadores em humanos não é muito diferente daquele de organismos menos complexos, como o de *Caenorhabditis elegans*, sugerindo que os genes não codificadores possuiriam maior importância para o aumento da complexidade dos organismos eucariotos (COSTA, 2010). A porção codificadora dos genes ocupa somente 2% do genoma (GIBB; BROWN; LAM, 2011) e, por meio de novas tecnologias de sequenciamento como análises do transcriptoma inteiro como o RNA-Seq, foi demonstrado atualmente que os genomas dos eucariotos são transcritos em mais de 90% de sua extensão (COSTA, 2010).

Entre os transcritos não codificadores foram incluídos; além dos RNAs classicamente já conhecidos, como mRNAs (RNAs mensageiros), tRNAs (RNAs transportadores) e rRNAs (RNAs ribossômicos); os pequenos RNAs reguladores, como miRNAs (microRNAs), siRNAs (pequenos RNAs de interferência), piRNAs (RNAs que interagem com proteínas Piwi), snRNAs

(pequenos RNA nucleares), snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares) e os lncRNAs (RNAs longos não codificadores) (WAPINSKI; CHANG, 2011).

Dentro do grupo dos RNAs são abordados aqui os miRNAs categoria a qual pertence os transcritos estudados neste trabalho.

1.2.1. microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores de cerca de 22 nucleotídeos que possuem papel regulatório importante na expressão gênica em variados processos biológicos, como no desenvolvimento; proliferação celular; diferenciação; metabolismo e apoptose (BARTEL, 2004). Estes também estão relacionados a doenças como o câncer (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011). A função dos miRNAs consiste em silenciar genes através de clivagem ou repressão transcricional (BARTEL, 2004).

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II como pri-miRNAs, estruturas em forma de haste-laço. Eles são identificados e processados pelo complexo microprocessador que contém a enzima RNase III Drosha e o cofator DGCR8. Tal complexo digere o pri-miRNA em uma estrutura menor denominada pré-miRNA. Este, por sua vez, é transportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo constituído pela Exportina-5 e uma GTPase. No citoplasma o pré-miRNA é também processado por outra RNase III, denominada Dicer, que é associada à proteína TRBP, gerando um miRNA de fita dupla. Uma das fitas é degradada e a outra é associada ao complexo miRISC, que é composto pelas proteínas AGO2, GW182, outras proteínas acessórias e o miRNA maduro. Este complexo reconhece a região 3' não

traduzida (3' UTR) de um mRNA específico e de complementaridade perfeita ou imperfeita com a região 5' do miRNA. No caso de haver complementaridade imperfeita, a mais usual, a tradução do mRNA é bloqueada; já no caso em que a complementaridade é perfeita, o mRNA é degradado (HUSSAIN, 2012). O silenciamento ocorre por meio da combinação da repressão da tradução, deadenilação, decapeamento e degradação da região 5' a 3' do mRNA (JONAS; IZAURRALDE, 2015) (Figura 2).

Porém, atualmente é sabido e que não somente a região 3'UTR é reconhecida pelos miRNAs, mas outras regiões do mRNA, como a região 5'UTR e codificadora (BRÜMMER; HAUSSE, 2014; LYTLE; YARIO; STEITZ, 2007; XU et al., 2014).

Figura 2. Biogênese dos miRNAs. Modificado de WINTER et al., 2009.

Atualmente está bem estabelecido que a desregulação de miRNAs pode dirigir ou contribuir para a tumorigênese. miRNAs superexpressos em tumores podem agir como oncogenes se seus alvos são genes supressores tumorais; já miRNAs subexpressos quando do estabelecimento do câncer podem agir como supressores tumorais se seus alvos são oncogenes (CROCE, 2009; FARAZI et al., 2013).

A desregulação dos miRNAs na tumorigênese pode-se dar por meio de vários mecanismos, como defeitos em sua biogênese; rearranjos cromossômicos; mutações de ponto em genes codificadores ou devido à desregulação transcricional. Dentro deste último mecanismo estão incluídas

alterações nas modificações epigenéticas nas regiões promotoras de genes de miRNAs, sendo a metilação do DNA uma das mais importantes destas alterações (LAGES et al., 2012).

Os perfis de expressão de miRNAs podem diferenciar tecidos tumorais de sua contraparte normal, podem discriminar diferentes tipos de tumores e indicar o tecido de origem do tumor quando não é possível obter esta informação por outros meios, como pela histologia e informações clínicas. Dessa maneira, os miRNAs são potenciais biomarcadores clínicos para o diagnóstico e prognóstico de pacientes (CROCE, 2009; FARAZI et al., 2013).

Os miRNAs são altamente conservados mesmo entre organismos evolutivamente distantes e controlam mais de 30% dos seus genes (HUSSAIN, 2012).

Com exceção do cromossomo Y, os miRNAs estão presentes em todos os outros cromossomos, sendo o cromossomo 19 com a maior porcentagem (7,6%), seguido do cromossomo X com 6,3% dos miRNAs humanos (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014).

1.2.2. Câncer de ovário e miRNAs

Vários estudos verificaram que há mudanças significativas de perfil de expressão de miRNAs entre tecidos normais de ovário e tecidos derivados de câncer de ovário (WANG; XU, 2015). Entre aqueles que se destacam estão a família do miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141e miR-429) e do let-7 (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-98 e miR-202), frequentemente superexpressas e subexpressas no câncer de ovário,

respectivamente (PRAHM et al., 2016). Além das famílias do miR-200, associada com o processo de EMT e do let-7, associada com o processo de diferenciação celular do estágio embrionário (LI et al., 2010), há alterações de outros miRNAs, como o do miR-140. O miR-140 inibe a proliferação e induz a apoptose possivelmente por meio da inibição do *PDGFRA* (LAN et al., 2015) e, além disso, está localizado na região 6q22, parte frequentemente deletada em tumores de ovário (PRAHM et al., 2016).

Portanto, pode-se afirmar que os miRNAs são elementos-chave no entendimento dos mecanismos de regulação do câncer de ovário, além de serem potenciais marcadores de diagnóstico, prognóstico e de predição de tratamentos (PRAHM et al., 2016).

1.3. Biomarcadores do câncer de ovário

Atualmente o diagnóstico do câncer de ovário é dado com auxílio de níveis elevados da proteína CA125 (gene *MUC16*) no soro de pacientes (SCHOLLER; URBAN, 2007). Porém, sua utilidade é limitada devido a sua baixa especificidade e sensibilidade (ABDALLAH et al., 2013; BHATT et al., 2016). Dessa forma, há uma grande necessidade de se desenvolver novos biomarcadores para o diagnóstico em estágios mais iniciais da doença e tratamento.

Adicionalmente, comparado a biomarcadores proteicos, as mudanças no perfil de miRNAs se dão mais rapidamente do que a das proteínas, sendo os primeiros mais estáveis em fluidos biológicos (WANG; XU, 2015).

1.4. miRNAs miR-450a e miR-450b-5p

Os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p se localizam na região Xq26, região importante para o desenvolvimento normal da placenta e do feto (FANT et al., 2010). Muito pouco se sabe sobre o papel desses miRNAs (JIN et al., 2016; SHALOM-FEUERSTEIN et al., 2012; SUN et al., 2014; SVOBODA et al., 2012; WENG et al., 2011). Em um estudo recente realizado em nosso laboratório (MUYS et al., 2016), o miR-450a e miR-450b-5p se destacaram pela expressão elevada em um painel de 20 tecidos normais em comparação com um painel de 18 linhagens tumorais ($p < 0.001$) (Figura 3). Chamou também nossa atenção a expressão maior desses miRNAs em tecidos relacionados à reprodução, como: placenta, testículo, colo do útero e ovário (MUYS, 2013) (Figura 4).

Figura 3. Comparação entre os níveis de expressão em tecidos normais e linhagens tumorais dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p. Os snoRNAs *RNU24e* e *RNU48* foram utilizados para normalização das amostras. *** $p < 0,001$ (Teste de Mann-Whitney). Extraído de Muys, 2013.

Figura 4. A. RT-qPCR utilizando amostras de um painel de tecidos normais para os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p. B. RT-qPCR utilizando amostras de linhagens células tumorais para os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p. Os snoRNAs *RNU24e* e *RNU48* foram utilizados para normalização das amostras. Extraído de Muys, 2013.

Segundo nossas análises preliminares, ambos miRNAs apresentaram correlação de expressão positiva entre os tecidos normais com o miR-424 (Muys, 2013) (Figura 5), que é um conhecido supressor tumoral localizado também na região Xq26 (FORREST et al., 2010; LIU et al., 2008; LONG et al., 2013; PALLASCH et al., 2009; WU et al., 2017; XU et al., 2012).

Figura 5. Correlação de Pearson (r) entre os miRNAs miR-450a e miR-424, e entre o miR-450b-5p e miR-424 em relação às expressões obtidas das amostras do painel de tecido normal. Extraído de Muys, 2013.

Svoboda et al. (2012) demonstraram que os três miRNAs estavam superexpressos em amostras de pacientes com câncer colorretal que responderam a quimioterapia neoadjuvante. Em outro artigo, foi demonstrado que o miR-450a estava com expressão baixa em tecidos de carcinoma hepatocelular, quando comparado ao seu equivalente normal e a tecidos marginais de vários tumores (WENG et al., 2011). Sun et al. (2013) demonstraram que o miR-450b-5p age como um supressor tumoral em rabdomiossarcoma, sendo negativamente regulado pelo TGF β -1; e Jin et al. (2016) verificaram que este miRNA age diminuindo a pluripotência de células de câncer colorretal.

Embora o papel dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese ainda não seja totalmente conhecido, levantamos a hipótese de que estes miRNAs podem se comportar como supressores tumorais em tecidos relacionados a reprodução, como o ovário, podendo dessa forma ser potenciais biomarcadores tumorais de diagnóstico, prognóstico e de resposta a terapias, como já relatado a outros miRNAs (NANA-SINKAM; CROCE, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Realizar a caracterização do papel dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese, em linhagens de células tumorais relacionadas com a reprodução.

2.2. Objetivos específicos

- A. Avaliar a expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p em linhagens tumorais derivadas de tecidos relacionados à reprodução (placenta, ovário, útero, próstata, etc).
- B. Padronizar a expressão ectópica dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p em duas linhagens tumorais de dois tipos diferentes de tecidos cujos valores de expressão dos miRNAs sejam menores que nos tecidos normais correspondentes;
- C. Analisar *in vitro* o efeito da superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p na regulação de processos biológicos ligados a tumorigênese como apoptose, proliferação e migração celular;
- D. Analisar *in vivo* o efeito da superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b em modelo xenográfico de metástase;

- E. Avaliar a presença de correlação entre a expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p e dados clínico-patológicos de amostras de pacientes do tecido escolhido;
- F. Avaliar a expressão gênica em escala genômica nas linhagens previamente analisadas para selecionar genes com expressão modulada pelos miRNAs miR-450a e miR-450b-p;
- G. Avaliar a interação dos miRNAs estudados com mRNAs em escala genômica nas linhagens previamente analisadas para selecionar possíveis genes alvos dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p;
- H. Validação funcional *in vitro* dos genes alvos preditos pelos bancos de dados públicos, pelo estudo de expressão realizados nos itens anteriores.
- I. Avaliar a presença de correlação negativa entre a expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p e dos alvos validados em amostras de pacientes do tecido escolhido;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção e expansão das linhagens

As linhagens, após descongelamento das alíquotas, foram mantidas em estufa a 37°C sob 5% de CO₂. As células, quando em monocamada subconflente, foram tripsinizadas. As linhagens tumorais A2780 (ovário), PC3 e LnCap (ambas derivadas de próstata) foram cultivadas em meio RPMI (*Gibco*) e as linhagens SKOV-3 (ovário), HeLa, C33 e SiHa (as três últimas derivadas de colo de útero) em meio DMEM. Ambos os meios continham soro fetal bovino 10% (*Gibco*) e 1% de penicilina/estreptomicina (*Sigma*).

3.2. Extração de RNA

As linhagens selecionadas foram triadas por meio dos valores de expressão dos miRNAs em estudo e o tipo de tecido das quais são derivadas. Para calcular a razão de expressão dos miRNAs em estudo entre linhagens tumorais e tecidos normais correspondentes foi utilizado RNA proveniente do painel de 20 tecidos normais *FirstChoice Human Total RNA Panel Survey* (*Ambion*).

O RNA total foi extraído das linhagens através do método *TRIZOL Reagent* (*Life technologies*), segundo recomendações do fabricante. Para verificação de sua qualidade, o RNA foi aplicado em gel de agarose 1,5% e também quantificado a 260 nm.

Para as amostras utilizadas para a análise de expressão global, o RNA foi extraído com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). A integridade do RNA foi checada com o *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) e as amostras com *RNA Integrity Number* (RIN) maior ou igual a 7 foram utilizadas para o sequenciamento em larga escala.

3.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA dos miRNAs derivados das linhagens foi realizada com o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) conforme especificações do fabricante.

3.4. Análise dos níveis de expressão por meio de RT-qPCR

Para a análise dos níveis de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p foram utilizadas sondas provenientes da *Applied Biosystems* (Número de catálogo: 002303 para o miR-450a-5p e 002207 para o miR-450b-5p) juntamente com *Taqman® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em replicata com amostras de cDNA diluídas 1:4 no *7500 Fast Real Time PCR System*, produzido pelo mesmo fabricante.

Para a análise da expressão de possíveis genes alvos foram confeccionados *primers* utilizados com *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fischer Scientific) na concentração final de 200 nM. As reações foram realizadas em replicata com amostras de cDNA diluídas no *7500 Fast Real Time PCR System*, produzido pelo mesmo fabricante.

O seguinte ciclo foi utilizado: 95°C (10 minutos), seguidos de 40 ciclos de 95°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto).

Para os *primers* customizados foram realizadas curvas-padrão antes das análises de expressão. Tais curvas foram realizadas com quatro pontos de diluição (1:5; 1:25; 1:125 e 1:625) em triplicata, sendo que as curvas de *melting* foram checadas quanto a formação de dímeros de primer e bandas contaminantes.

Para os dados do perfil de expressão obtidos pela técnica de RT-qPCR para seleção das linhagens tumorais pela expressão do miR-450a e miR-450b-p, estes foram normalizados com os dados relativos às médias geométricas dos snoRNAs RNU48 e RNU24 pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para a análise de expressão de mRNAs, os valores de Ct dos genes analisados foram normalizados com os dados relativos às médias geométricas dos mRNAs do *HPRT1* e *TUBB*. As análises posteriores foram realizadas conforme supracitado.

A tabela 1 mostra a sequência de cada par de *primer* customizado.

Tabela 1. Sequência dos *primers* customizados e utilizados nas reações contendo SYBR.

genes	sequências dos primers utilizados com SYBR
<i>ACO2 Forward</i>	5' AGCCCAACGAGTACATCCAT 3'
<i>ACO2 Reverse</i>	5' TCTTCTCCGAGAGTGTGAGC 3'
<i>ACVR2B Forward</i>	5' GTACATGCTGCCCTTTGAGG 3'
<i>ACVR2B Reverse</i>	5' CCTCGATGGTCACACAAAGC 3'
<i>ATP5B Forward</i>	5' TGTTTGCTGGTGTGGTGAG 3'
<i>ATP5B Reverse</i>	5' GAGCACCAGGTGGTTCATTG 3'
<i>CAND1 Forward</i>	5' GACCGTCTCTCCTGCACTAA 3'
<i>CAND1 Reverse</i>	5' TGGAACCTGACTCTGAAGC 3'
<i>CCND2 Forward</i>	5' CGGGAGAAGCTGTCTCTGAT 3'
<i>CCND2 Reverse</i>	5' CTTAAAGTCGGTGGCACACA 3'
<i>CRY1 Forward</i>	5' ATGATCCCTGGAATGCACCA 3'
<i>CRY1 Reverse</i>	5' TGATGCCAGAAGACCTAGTCC 3'
<i>HERPUD2 Forward</i>	5' ACCCTAGCAAACCATGACG 3'
<i>HERPUD2 Reverse</i>	5' TGGGAGGAGTCCGAGAAGTA 3'
<i>HPRT1 Forward</i>	5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3'
<i>HPRT1 Reverse</i>	5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT 3'
<i>MAML1 Forward</i>	5' CGGAACAGGAGAAGCAACAG 3'
<i>MAML1 Reverse</i>	5' TTGGATGGACCCAAGGTGTT 3'
<i>ME1 Forward</i>	5' GTTTCGGAAGCCAAGAGGTC 3'
<i>ME1 Reverse</i>	5' TACAGCCAAGGTCTCCCAAG 3'
<i>MT-ND2 Forward</i>	5' CCCAACCCGTCATCTACTCT 3'
<i>MT-ND2 Reverse</i>	5' AAATCAGTGCGAGCTTAGCG 3'
<i>MYH10 Forward</i>	5' CCGAGCAGGAGAGAGATGAG 3'
<i>MYH10 Reverse</i>	5' ACCTGTAGAGTGGTCTTGCG 3'
<i>PAPSS1 Forward</i>	5' AACTGAGGTCCAGTGGCATT 3'
<i>PAPSS1 Reverse</i>	5' GCACTTTGGCACCATTGACTT 3'
<i>TIMMDC1 Forward</i>	5' CTACAGCAGGCATCATTGGC 3'
<i>TIMMDC1 Reverse</i>	5' TGCAGATTGCACAGCATCAA 3'
<i>TUBB Forward</i>	5' TCAACACTTTCTTCAGTGAAACG 3'
<i>TUBB Reverse</i>	5' AGTGCCAGTGCGAACTTCATC 3'
<i>VIM Forward</i>	5' CCCTGAACCTGAGGGAAACT 3'
<i>VIM Reverse</i>	5' ATTGCTGCACTGAGTGTGTG 3'

3.5. Triagem inicial de linhagens tumorais do sistema reprodutor

Foram escolhidas linhagens tumorais de colo de útero (cérvix) (SiHa, Hela e C33), ovário (OVCAR-3, A2780 e SKOV-3) e próstata (LnCap e PC3) para serem testadas quanto à expressão dos miRNAs de interesse. As expressões dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p nestas linhagens foram então comparadas aos de tecidos normais correspondentes obtidos de um *pool* de tecidos normais proveniente do painel comercial *FirstChoice Human Total RNA Panel Survey* (Ambion). Como se observa pela figura 6, quase todas as linhagens testadas possuem níveis de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p menores do que o tecido normal analisado. Porém a linhagem PC3 possui nível de expressão não muito diferente ou maior em relação à próstata normal. Dessa forma, o tecido de próstata foi excluído de nossas análises posteriores.

Figura 6. Expressão relativa dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p nas linhagens tumorais de cervix, próstata e ovário em relação ao tecido normal correspondente.

3.6. Construção dos vetores de expressão

As linhagens SiHa e C33 (carcinoma de cervix); OVCAR-3, SKOV-3 e A2780 (adenocarcinomas e carcinoma de ovário, respectivamente) foram utilizadas para a modulação da expressão dos miRNAs, sendo transduzidas com o vetor de expressão lentiviral bicistrônico *pLVX-IRES-ZsGreen* (Clontech), que além do inserto de determinado pri-miRNA, permite a transcrição da proteína verde fluorescente (GFP) passível de detecção por citometria de fluxo (Figura 7).

Figura 7. Mapa do vetor *pLVX-IRES-ZsGreen*.

Os pares de *primers* utilizados para a clonagem dos pri-miRNAs no vetor foram: Primer miR-450a *Forward*: 5'attgataGGATCCgaggctatcaggaagtat 3', Primer miR-450a *Reverse*: 5'gctgagaGAATTCataattctgcatcttacat 3', Primer miR-450b *Forward*: 5'attgataGGATCCaagatggagggaataagc 3' e Primer miR-450b *Reverse*: 5'gctgagaGAATTCgagaaaaacaaacattacc 3'. Tais iniciadores possuem sítios de restrição (bases em maiúsculo) para as enzimas BamHI (região 5') e EcoRI (região 3'). Para a reação, foi utilizada uma amostra de DNA de sangue periférico e a enzima *Taq Polimerase Platinum (Invitrogen)* com o kit de PCR do mesmo fabricante, usando o seguinte ciclo: um ciclo de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto e 72°C por um minuto, e mais um ciclo de 72°C por 7 minutos. A reação foi checada

por meio de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo.

3.6.1 Clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO® TA

Posteriormente, foi feita a clonagem dos produtos da PCR anterior no vetor *pCR®2.1-TOPO® TA vector (Invitrogen)*. Para esta reação, foram misturados 1 µl do produto de PCR, 1 µl do vetor, 1 µl da solução de sal diluída 1:4 e 3 µl de água. A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida 2 µl de cada reação foi adicionada a 50 µl de bactérias eletrocompetentes *One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen)*. Estas foram eletroporadas em cubetas (*Fisher Scientific*) a 2500 V, 200 Ω e 25 F no *Gene Pulser II® (Bio-Rad)* e logo em seguida adicionadas a 500 µl de meio de cultura SOC (*Invitrogen*) ou meio LB (Luria Bertani: 1% de triptona, 1% de NaCl e 0,5% de extrato de levedura) e deixados por 45 minutos em estufa a 37°C com agitação de 200 rpm. Posteriormente, foi adicionado mais 500 µl de meio às bactérias e 400 µl da mistura foram plaqueadas em placas com meio LB sólido contendo ampicilina 100 µg/ml e X-Gal 40 µg/ml. As placas foram deixadas *overnight* em estufa a 37°C.

As colônias brancas, que haviam sido transformadas com os fragmentos de interesse, foram repicadas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/ml em placas de 96 poços. Estas foram deixadas em estufa a 37°C *overnight* e 1 µl do próprio meio foi utilizado para reação de PCR com a *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* com o kit do mesmo fabricante utilizando primers M13 (*Invitrogen*) que se anelam à região do vetor que flanqueia o

sítio de inserção do fragmento. O seguinte ciclo foi empregado: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C; 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 60°C, 55 segundos a 72°C e 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. As colônias positivas foram congeladas para uso posterior à -20°C na presença de glicerol 70%.

Os produtos destas PCRs foram checados por meio de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo. As bandas produzidas que tinham o tamanho aproximadamente esperado do fragmento ligado ao vetor foram analisadas por sequenciamento. O sequenciamento foi realizado com 0,5 µl das amostras de PCR no sequenciador automático *ABI 3130 Genetic Analyser®* (*Applied Biosystems*) usando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, segundo recomendações do fabricante. As sequências obtidas dos fragmentos inseridos no vetor foram lidas com o programa *Codoncode Aligner* (*CodonCode Corp., Dedham, MA*) e alinhadas ao genoma humano por meio da ferramenta *BLAT* (KENT, 2002).

3.6.2. Subclonagem no vetor pLVX-IRES-ZsGreen

Foi realizada a digestão do vetor pLVX-IRES-ZsGreen com as enzimas (*Neblabs*) que reconhecem os sítios de restrição da EcoRI e BamHI, respectivamente. Foram utilizados 4 µg de DNA correspondente ao vetor, 20 U de cada enzima, 5 µl de tampão 10X número 3 (*Neblabs*), 0,5 µl de BSA (100 ng/ml) e água suficiente para 50 µl. A mistura de reação foi incubada por uma hora à 37°C e em seguida o DNA foi precipitado da seguinte forma:

O volume contendo a amostra de DNA foi ajustado para 200 µl com tampão 3 mM Tris-HCl pH 8.0/0.2 mM EDTA pH 8.0. Foi adicionado 200 µl de

solução de fenol/clorofórmio 1:1 e amostra foi vortexada. A seguir, a mesma foi centrifugada em velocidade máxima e temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, a fase aquosa superior no tubo foi transferida para um novo tubo, neste foi adicionado 133 µl de acetato de amônio 7,5 M, 3 µl de glicogênio 20 mg/ml e 1 ml de etanol 100%. A amostra de DNA foi então deixada em freezer à -80°C *overnight*. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi deixado secar em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido em 12 µl de tampão 3 mM Tris-HCl pH 8.0/0.2 mM EDTA pH 8.0, e congelado à -20°C.

Após esta etapa, o vetor digerido foi desfosforilado utilizando 2 µl da enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase* - USB), 2 µl de tampão 10X e água suficiente para 20 µl. A mistura de reação foi incubada por uma hora à 37°C.

Após a reação, o vetor digerido foi checado por meio de uma eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo, purificado por meio do recorte da banda e extração com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amershan), conforme recomendações do fabricante.

As colônias contendo os pri-miRNAs clonados no *pCR®2.1-TOPO® TA* foram expandidas em meio LB incubando-as no *shaker* à 200 rpm, 37°C *overnight*. Posteriormente foi feita uma mini-preparação para extração do DNA plasmidial com o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific), segundo o protocolo do fabricante.

Os plasmídeos purificados foram digeridos com as enzimas EcoRI e BamHI como já citado anteriormente para o vetor *pLVX-IRES-ZsGreen*. Em

seguida, os fragmentos obtidos foram checados e purificados por meio do recorte das bandas e extração com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amershan), conforme recomendações do fabricante.

Posteriormente, foi feita a reação de ligação utilizando 1 µl da enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), uma proporção de 3:1 da quantidade de DNA dos fragmentos para o vetor *pLVX-IRES-ZsGreen*, 1 µl do tampão 10X e água suficiente para 10 µl. A mistura de reação foi incubada a 16°C por 3 horas.

Logo após, 1 µl do produto da reação foi diluído com 3 µl de água. Foi utilizado 2 µl do vetor diluído para eletroporar bactérias eletrocompetentes conforme já citado acima. As mesmas também foram selecionadas em meio com ampicilina e posteriormente crescidas em meio líquido para realizar uma reação de PCR. A PCR também foi realizada conforme já citada no item anterior, porém utilizando um par de *primers* que se anelam em uma região que flanqueia o sítio de reconhecimento de enzimas de restrição no vetor *pLVX-IRES-ZsGreen* (*Primer* *VetorGreen* *Forward*: 5' TAGTGAACCGTCAGATCGC 3' e *Primer* *VetorGreen* *Reverse*: 5' CCTTATTCCAAGCGGCTTC 3').

As bandas produzidas que tinham o tamanho aproximadamente esperado do fragmento ligado ao vetor foram checadas e analisadas por sequenciamento, segundo já descrito no item 3.6.1. Como demonstrado na figura 8, ambos os vetores construídos contêm as sequências corretas dos pri-miRNAs aqui estudados.

Figura 8. Alinhamento ao genoma humano das sequências dos fragmentos (barras negras) contendo os pri-miRNAs miR-450a (A) e miR-450b (B) que foram clonados no vetor *pLVX-IRES-ZsGreen*. Modificado de Genome Browse – UCSC (versão: Feb. 2009, CRCh37/hg19).

Posteriormente, foi feita uma mini-preparação para a obtenção dos plamídeos produzidos. Esta foi realizada conforme supracitado.

3.7. Produção de lentivírus

Células da linhagem HEK 293FT foram plaqueadas em meio DMEM (Gibco) contendo 10% de SBF HyClone™ (*Thermo Fisher Scientific*) não inativado, 10 mM MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco) e 1% de Penicillin-Streptomycin (Gibco). No dia seguinte, todo o meio foi trocado e adicionado um novo meio fresco e também adicionada 500 µg/ml de Geneticin (Gibco). Após dois dias, as células foram tripsinizadas utilizando 1X TrypLE™ Express Enzyme (Gibco) e plaqueadas em placas de 100 mm (3,0 x 10⁶ células/placa) para atingirem a confluência de 80-90% no momento da transfecção.

No dia seguinte as células foram co-transfectadas com os seguintes vetores: 1) pM2D-VSV-G (envelope do vírus da estomatite vesicular, VSV-G),

2) pDR 8.91 (codifica o capsídeo viral) e 3) pLVX-miR-450a, ou pLVX-miR-450b ou o pLVX. Estes últimos contêm o promotor CMV, o miRNA de interesse ou não, seguido do elemento IRES e do gene GFP. A transfecção foi realizada utilizando-se o reagente *Lipofectamine TM 2000 (Invitrogen)*.

Para a realização da transfecção foram realizadas 2 misturas de reação. A primeira continha 500 µl de meio DMEM sem suplementos, 1,3 µg do vetor pDR 8.91, 0,7 µg do vetor pM2D-VSV-G e 2 µg de um dos vetores de expressão; a segunda continha 500 µl do mesmo meio DMEM e 20 µl de *Lipofectamine*. Após 5 minutos, foram combinadas as misturas. Depois de 20 minutos, a reação foi adicionada às placas gota a gota. Após 6 horas, todo o meio da HEK 293FT foi trocado por meio fresco.

No dia posterior à transfecção, células das linhagens a serem transduzidas foram plaqueadas em placas de 100 mm ($1,0 \times 10^5$ células/placa) e cultivadas em meio DMEM contendo 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina.

3.8. Transdução lentiviral

Após 24 horas, todo o meio da HEK 293FT foi retirado, filtrado em filtro PVDF de 0,45 µm e colocado na placa correspondente às células das linhagens tumorais a serem transduzidas, sendo que o meio destas foi previamente descartado. Em adição ao meio contendo lentivírus, foi adicionado brometo de hexadimetrina (*Sigma*) para concentração final de 6 µg/ml às células das linhagens tumorais com a finalidade de facilitar a infecção. Já o meio da linhagem HEK 293FT foi repostado. Depois de 6 horas, o

meio das células tumorais foi novamente trocado pelo seu meio de cultivo original.

O procedimento do parágrafo anterior foi repetido uma ou duas vezes no(s) dia(s) seguinte(s).

3.9. Análise da eficiência de transdução

Após 3 dias da transdução, as células tumorais foram analisadas por citometria de fluxo no *FACS calibur Flow Cytometer (BD Biosciences)* para a proteína GFP e iodeto de propídeo (PI). Este último foi utilizado para mensurar a viabilidade. Foram utilizadas 10^5 células de cada nova linhagem criada e as mesmas foram incubadas com 200 μ l de PBS 1X e 50 μ l de PI (50 μ g/ml). Caso menos de 70% das células obtidas fossem GFP⁺PI⁻, ou seja, as células transfectadas com os plasmídeos de interesse e viáveis, eram feitas purificações das amostras GFP⁺ por citometria de fluxo (*sorting*).

Como é observado na figura 9, no mínimo 74% das células obtidas após transdução e purificação correspondiam às células de interesse para os ensaios posteriores.

Figura 9. Resultado da eficiência de transdução por citometria de fluxo para as diferentes linhagens criadas. Coluna 1: linhagens controle; Coluna 2: linhagens com vetor vazio; Coluna 3: linhagens contendo o pri-miR-450a e Coluna 4: linhagens contendo o pri-miR-450b. GFP⁺PI: células viáveis que superexpressam os pri-miRNAs de interesse.

3.10. Análise da expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p após a transdução

A figura 10 mostra os níveis de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p maduros para as linhagens SiHa, C33, OVCAR-3 e A2780 transduzidas com seus precursores em relação às suas linhagens controle contendo o mesmo vetor vazio. A expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p aumentou no mínimo 16 vezes para todas as linhagens transduzidas com os vetores contendo os respectivos pri-miRNAs, demonstrando a eficiência da nossa estratégia para expressão dos miRNAs nestas linhagens.

Figura 10. Expressão relativa dos miRNAs de interesse para cada linhagem criada. Os sinais de + e - indicam se as linhagens foram ou não transduzidas com os vetores de expressão para o pri-miR-450a (+450a) ou para o pri-miR-450b (+450b).

3.11. Análise do efeito da superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p na regulação de processos biológicos ligados à tumorigênese

3.11.1. Ensaios funcionais *in vitro*

As linhagens previamente tratadas para superexpressar os miRNAs em estudo e a linhagem controle (células transduzidas com o vetor de expressão pLVX vazio) quando em monocamada subconflente foram tripsinizadas. As células coletadas foram então utilizadas para ensaios funcionais relacionados a processos biológicos tumorais como proliferação, apoptose, migração, invasão e clonogenicidade. As linhagens SiHa e C33 foram cultivadas em meio DMEM *low glucose* e as linhagens OVCAR-3 e A2780 foram cultivadas em meio RPMI (*Gibco*). Já as linhagens SKOV-3 foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (*Gibco*) contendo 10 mM de MEM NEAA (*Gibco*). Todos os meios continham 10% de soro bovino fetal (SBF) (*Gibco*) e 1% de penicilina/estreptomicina (*Sigma*).

3.11.1.1 Ensaio de apoptose (anoikis)

Depois da preparação das células conforme o item anterior, estas foram cultivadas em meio apropriado por 24 horas em placas de 6 poços de baixa aderência e foram então tripsinizadas para obtenção de uma suspensão de células únicas. A suspensão foi centrifugada em tubos de ensaio de fundo redondo próprios para a análise por citometria de fluxo. O

sobrenadante foi descartado e adicionado às células 200 µl de tampão de ligação 1X (Hepes 0,01 M pH 7.4, NaCl 0,14 M e CaCl₂ 2,5 mM) (*BD Biosciences*) e 5 µl do anticorpo *Annexin V-APC* (*BD Biosciences*), que permite verificar células em estágios iniciais de apoptose.

Após 15 minutos de incubação das células em ambiente escuro e temperatura ambiente para a ligação do anticorpo, foram adicionados 50 µl de solução de iodeto de propídeo (PI), que cora o DNA das células com membrana plasmática rompida. A seguir, as amostras foram analisadas para a ligação do anticorpo da anexina V e PI no *BD FACS calibur Flow Cytometer* (*BD Biosciences*).

3.11.1.2. Ensaio clonogênico

Com o objetivo de sincronizar as células para aproximadamente a mesma fase do ciclo celular, antes do início do experimento as mesmas foram deixadas por 24 horas em seu meio de cultivo contendo 5% de SBF e depois por mais 24 horas no mesmo meio privado de soro. Após a tripsinização das células segundo item 3.11.1., foi feita uma suspensão de células únicas e então realizada a contagem na câmara de Neubauer. A seguir, foi realizada uma diluição seriada para que ao final, um número estimado e previamente padronizado de 150 células (com exceção das linhagens SKOV-3, as quais foram padronizadas para 250 células) fossem plaqueadas em poços de uma placa de 6 poços. Ao longo do tempo de cultivo, o tamanho e a confluência das colônias foram checados de modo que nove dias foi considerado o tempo padronizado para parar o experimento

para a linhagem SiHa; dez para a linhagem C33; sete para a linhagem OVCAR-3; 9 para a linhagem A2780 e 15 dias para linhagem SKOV-3.

Ao final do experimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato-salino 1X (PBS) e fixada por uma hora em ambiente protegido da luz com solução de paraformaldeído 4%. Em seguida, esta foi corada com solução de cristal violeta 0,5% por 20 minutos e lavada duas vezes com água. As placas foram inclinadas e deixadas secar *overnight* à temperatura ambiente. O número de colônias foi contado manualmente e a taxa de formação de colônias foi calculada como: (número de colônias/número de células plaqueadas) x100.

3.11.1.3. Ensaio de proliferação

Para verificar se os miRNAs do presente estudo influenciam a taxa de proliferação celular, foi utilizado o *CellTrace™ Violet reagent* (Life technologies). Este composto se difunde nas células, é clivado por esterases e se transforma em um corante fluorescente que se liga covalentemente a aminas, sendo estável e retido nas células. Para este protocolo as células das linhagens controle e que superexpressam os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p separadamente foram sincronizadas previamente como descrito no item 3.11.1.

A suspensão de células únicas obtida após tripsinização foi lavada com PBS 1X e em seguida estas foram marcadas com solução 5 μ M do *CellTrace™ Violet reagent* por 20 minutos à 37°C em ambiente escuro. Posteriormente, foi adicionado meio contendo pelo menos 1% de soro, sendo

que o volume era equivalente a 5 vezes o volume da solução de marcação. As células novamente foram incubadas à 37°C por 5 minutos e logo depois centrifugadas, ressuspensas em meio de cultivo fresco e completo, e plaqueadas. Depois do período de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, as células foram fixadas em solução de formol 1% e incubadas a 4°C em ambiente escuro até sua análise no *BD FACSCANTO II* (*BD Biosciences*) utilizando a faixa de 405/450 nm.

As medianas da intensidade de fluorescência das células marcadas com o fluoróforo violeta para cada amostra foram subtraídas daquelas para as amostras do tempo 0 e divididas pela última [(Intensidade de fluorescência inicial-final/Intensidade de fluorescência inicial)] para a padronização. Os valores foram plotados contra o tempo de incubação. Tais análises foram realizadas com o programa *FlowJo* 8.7.

3.11.1.4. Ensaio de migração

Visando mensurar a capacidade de migração de linhagens que superexpressam os miRNAs miR-450a e miR-450b-5p separadamente e linhagens controle, foi utilizado o *ThinCert 24 Well Cell Culture Inserts for Multiwell Plates* (*Greiner Bio-One*). Para este protocolo as células previamente em cultura foram sincronizadas e privadas de soro bovino fetal por 24 horas antes do início do experimento, segundo o item 3.11.1.

Para cada linhagem celular foi padronizado o número de células a serem adicionadas na parte de cima de cada inserto e o tempo de incubação das mesmas. A tabela 2 indica tais dados para cada linhagem.

Tabela 2. Tempo de incubação e número de células adicionadas no inserto para cada linhagem no ensaio de migração.

Linhagem	Tempo de incubação (horas)	Número de células
A2780	24	5×10^5
C33	48	1×10^5
OVCAR-3	24	1×10^5
SiHa	24	5×10^4
SKOV-3	3	2×10^4

Após o período de incubação, o meio dentro dos insertos foi descartado e as células contidas nestes foram lavadas duas vezes com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído 4% por uma hora e coradas com solução de cristal violeta 0,5% por 30 minutos. Posteriormente, as células que não migraram foram removidas com hastes flexíveis contendo algodão nas pontas e as células retidas nos insertos foram lavadas duas vezes com água. Depois disso, os insertos foram deixados em temperatura ambiente para secar. Em seguida, as células foram fotografadas no microscópio *Primo Vert* (Zeiss) e quantificadas manualmente com o ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, [s.d.]).

Foram contados 5 campos por insertos escolhidos aleatoriamente entre as posições: topo, direta, esquerda, abaixo e meio da membrana em magnificação de 100 X ou 200 X e foi feita a soma do número de células contadas nos 5 campos para cada inserto. A taxa de migração foi calculada considerando a média do número de células que migraram no grupo controle como 100%.

3.11.1.5. Ensaio de invasão

A propriedade de invasão de linhagens com superexpressão dos miRNAs em estudo foi avaliada utilizando-se o *BD Matrigel™ Invasion Chamber 24 Well Plate 8.0 Micron* (BD Biosciences). Para este ensaio, as células previamente em cultura foram sincronizadas e privadas de soro bovino fetal por 24 horas antes do início do experimento, segundo o item 3.11.1. Em seguida, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio apropriado sem soro. Na parte de baixo de cada poço da placa de 24 poços foram adicionados 600 µl do mesmo meio contendo 10% de soro bovino fetal.

Posteriormente, para cada linhagem celular foi padronizado o número de células a serem adicionadas na parte de cima de cada inserto e o tempo de incubação das mesmas. A tabela 3 indica tais dados para cada linhagem.

Tabela 3. Tempo de incubação e número de células adicionadas no inserto para cada linhagem no ensaio de invasão.

Linhagem	Tempo de incubação (horas)	Número de células
A2780	24	$3,5 \times 10^5$
C33	48	$2,5 \times 10^5$
OVCAR-3	24	$3,5 \times 10^5$
SiHa	48	5×10^4
SKOV-3	21	$3,5 \times 10^4$

O término do experimento e análise dos dados foi feita conforme o item anterior.

3.11.2. Ensaios funcionais *in vivo*

Cerca de 5×10^6 células foram injetadas na cavidade peritoneal de 7 a 8 camundongos imunodeficientes por grupo, conforme o modelo de metástase do câncer de ovário. Os animais foram mantidos e manipulados no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto.

De acordo com os resultados de um ensaio feito previamente (dados não mostrados), o tipo de camundongo imunodeficiente escolhido foi o NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ), o qual apresentou maior facilidade para o crescimento da linhagem A2780. Já a linhagem SKOV-3 não formou tumor neste tipo de camundongo ou teve crescimento muito reduzido no animal do tipo NUDE. Assim, foi feito o experimento com o NSG utilizando somente as linhagens A2780.

Após quatro semanas da injeção, os animais foram sacrificados por sobredose anestésica (Tiopental 150 mg/kg com injeção 10 minutos antes de lidocaína 2% na dose de 5 mg/kg via intraperitoneal) e os tumores foram removidos e pesados.

3.12. Análise de correlação de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Carcinoma de Células Escamosas de Colo de Útero e Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário com dados clínico-patológicos obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)

Com o intuito inicial de verificar a possibilidade de correlações entre os níveis de expressão dos miRNAs em estudo com dados clínico-patológicos de pacientes cujas amostras foram sequenciadas em larga escala pelo TCGA, foram baixados os dados de miRNA-Seq de nível 3 para carcinoma de células escamosas de colo de útero; cistoadenocarcinoma seroso de ovário, além dos dados clínico-patológicos dos pacientes no site <https://tcga->

data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm. Os níveis de expressão possuem normalização em RSEM (Expectation-Maximization).

Cada valor das variáveis pertinentes (e.g. estadio, grau histológico, presença ou ausência de linfonodo) foi plotado contra os níveis de expressão do miR-450a ou miR-450b-5p. As análises de correlação foram feitas conforme o item 3.19.3.

3.13. Análise global de expressão gênica por RNA-Seq

O RNA-Seq, uma plataforma de sequenciamento em larga escala do transcriptoma, foi feito para as linhagens A2780^{+pLVX}, A2780^{+pLVX+miR-450a}, A2780^{+pLVX+miR-450b}, C33^{+pLVX}, C33^{+pLVX+miR-450a}, C33^{+pLVX+miR-450b}, SiHa^{+pLVX}, SiHa^{+pLVX+miR-450a} e SiHa^{+pLVX+miR-450b}. As demais amostras tiveram de ser excluídas da análise pois o número de fragmentos sequenciados por amostra ficaria abaixo do ideal. O sequenciamento foi realizado no equipamento *Illumina Genome Analyzer IIx* (GAIIx), sendo que a maioria dos reagentes foi proveniente do kit *TruSeq RNA Sample Prep v.2* (Illumina Inc.).

De modo geral, a técnica de RNA-Seq consiste em diversos passos que serão apresentados a seguir (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

A primeira etapa do protocolo do RNA-Seq consiste na purificação, a partir de 0,1-4 µg de RNA total, dos mRNAs. Estes foram purificados com base na presença da cauda poli-A na porção 3' por meio de sequências complementares de timinas (sequências poli-T) ligadas a esferas magnéticas. Os mRNAs eluídos foram fragmentados e utilizados para transcrição reversa, utilizando hexâmetros randômicos e a enzima *Superscript II*[®] (Invitrogen),

gerando assim a primeira fita de DNA complementar (cDNA). Posteriormente, a fita de mRNA foi removida e a segunda fita de cDNA foi gerada. Ainda durante a reação, o cDNA gerado foi purificado do restante dos reagentes utilizando esferas paramagnéticas *AMPure XP beads* (*Beckman Coulter*).

Depois desta etapa, as extremidades do cDNA foram retiradas usando *mix End Repair* (*Illumina*). Este contém uma enzima 3'-5' exonuclease que remove as bases excedentes nas extremidades 3' e preenche os espaços vazios nas extremidades 5', gerando assim fragmentos com pontas coesivas. Além disso, uma base adenina é adicionada às extremidades 3' dos fragmentos de cDNA, o que possibilita a ligação dos adaptadores, que possuem uma timina nas suas extremidades 3'. Vários adaptadores foram ligados às extremidades dos fragmentos de cDNA, usando uma enzima ligase e tampões apropriados contidos no *kit TruSeq RNA Sample Prep v.2* (*Illumina Inc.*).

Foi feita então uma PCR utilizando *primers* complementares aos adaptadores. Tal reação tem a finalidade de enriquecer os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores nas duas extremidades e também de aumentar a quantidade de cDNA da biblioteca. Foi utilizado o seguinte ciclo: 98°C por 30 segundos, 15 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; seguido por um ciclo de 72°C por 5 minutos.

A biblioteca foi checada quanto ao tamanho dos fragmentos com o *Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*), sendo que os mesmos tinham, como esperado, aproximadamente 260 pares de bases. Adicionalmente, foi

utilizado o *KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems)* para a quantificação absoluta dos fragmentos formados na biblioteca por RT-qPCR.

A seguir, as bibliotecas foram diluídas para 8 pM para a etapa de clusterização. A clusterização é a etapa na qual os fragmentos de cDNA, por meio de seus adaptadores, são hibridados com oligonucleotídeos ligados a um suporte sólido, a *flow cell*, e amplificados por PCR no dispositivo fluídico *cBot (Illumina Inc.)* com os reagentes do *TruSeq Cluster Generation Kit v5 (Illumina Inc.)*. Nesta etapa, os fragmentos amplificados são desnaturados, as fitas complementares são removidas, e em seguida, o adaptador na extremidade não ligada da fita gerada é ligado a outro oligonucleotídeo preso a *flow cell*. Este processo é repetido múltiplas vezes, dando origem aos *clusters*, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados ao suporte sólido. Posteriormente, foi feita a linearização, processo em que a fita *reverse* é removida; e o bloqueio das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos *clusters* linearizados. Adicionalmente, os *clusters* foram hibridados aos *primers* de sequenciamento e este foi realizado com o *TruSeq SBS kit v5 (Illumina Inc.)*.

O sequenciamento foi do tipo *single-read*, executado com 72 ciclos no equipamento *Illumina Genome Analyzer IIX (GAIIx)* e baseado na tecnologia Solexa ou SBS, que se fundamenta na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. A terminação é a clivagem do nucleotídeo marcado já detectado, o que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Este processo é repetido várias vezes e permite a leitura base a base.

3.14. Análises de vias enriquecidas

Foram feitas análises de vias enriquecidas dos genes subexpressos (de acordo com o *threshold* estabelecido no item anterior) após a superexpressão do miR-450a ou miR-450b utilizando o *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit* (WebGestalt) (ZHANG; KIROV; SNODDY, 2005).

Para todas as amostras utilizadas no RNA-Seq foram dadas as vias de enriquecimento pelo *Pathway Commons* (CERAMI et al., 2011). Somente para a amostra C33^{+pLVX+miR-450a} foi escolhida a fonte de vias pelo KEGG Pathway (KANEHISA et al., 2016), pois não foi possível encontrar vias enriquecidas pelo *Pathway Commons*.

3.15. Avaliação da interação dos miRNAs estudados com mRNAs em escala genômica utilizando o PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation)

O PAR-CLIP consiste na incorporação de análogos de ribonucleosídeos fotorreativos, como o 4-tiouridina (4-SU), durante o cultivo da célula; *crosslinking* dos RNAs com proteínas por meio da radiação da luz UV; imunoprecipitação de proteínas que se ligam a RNAs (RNA-binding-proteins) juntamente com os RNAs ligados e a posterior recuperação dos mesmos. Os RNAs recuperados são então convertidos em uma biblioteca de cDNA e sequenciados em sequenciamento de nova geração (HAFNER et al., 2010). O PAR-CLIP permite a identificação de sítios de *crosslinking* entre

RPBs-RNA que correspondem a transições de timidina para citidina nos cDNAs derivados dos complexos entre RNAs e proteínas imunopurificadas das células tratadas com 4-SU (Figura 11). Tais transições diferenciam o PAR-CLIP de outros métodos e eliminam sequências contaminantes as quais não foram derivadas do *crosslinking* (JALALI et al., 2013). Para a identificação de alvos de miRNAs, o PAR-CLIP pode ser utilizado para a recuperação dos complexos de proteínas e RNAs por meio da utilização de anticorpos contra a proteína AGO2. Por este método, mRNAs e miRNAs co-precipitam com a AGO2 e podem ser identificados (ERHARD et al., 2013). Diferentemente do RNA-Seq, que fornece uma medida indireta da regulação dos alvos após a super ou subexpressão do miRNA, o PAR-CLIP é uma abordagem experimental genômica para identificar sítios de interação de RBPs com RNAs alvos (HAFNER et al., 2012).

A metodologia do PAR-CLIP foi realizada em colaboração com o grupo do Dr. Markus Hafner, inventor da técnica, no RNA Molecular Biology Group/ Laboratory of Muscle Stem Cells and Gene Regulation, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases (NIAMS)/National Institute of Health (NIH) em Bethesda, Estados Unidos.

Figura 11. Esquema representando as principais etapas do método PAR-CLIP. Extraído e modificado de (HAFNER et al., 2010).

3.15.1. Incorporação do análogo do ribonucleosídeo fotoreativo e *crosslinking*

A metodologia a seguir foi extraída e modificada de BENHALEVY et al., 2016. Para tanto, foram cultivadas as linhagens A2780^{+pLVX}, A2780^{+pLVX+miR-450a}, A2780^{+pLVX+miR-450b}, SKOV-3^{+pLVX}, SKOV-3^{+pLVX+miR-450a}, SKOV-3^{+pLVX+miR-450b} conforme o item 3.1. em 10 a 20 placas de 100 x 15 mm cada uma. Quando as células alcançaram cerca de 80% de confluência, foi adicionado 4-SU para a concentração final de 100 μ M. Após 16 horas, as

células foram submetidas ao *crosslinking* no *Spectrolinker XL-1500* (*Spectronics Corporation*) com 0.15 J/cm^2 e luz UV a 312 nm. Posteriormente, as células foram removidas das placas, centrifugadas por 5 minutos a 500 g e 4°C, e o sobrenadante foi descartado. As células então foram congeladas estocadas no freezer a -80°C por até 12 meses.

3.15.2. Extração celular

As células congeladas foram ressuspendidas em 3 volumes do tampão de imunoprecipitação (IP) (Tris 20 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM e NP40 1%) e incubadas no gelo por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4°C e os restos das células na parte de baixo dos tubos foram descartados. Foram guardadas 50 µl das amostras a -20°C para serem utilizadas posteriormente como controle durante a verificação da eficiência da imunoprecipitação.

3.15.3. Imunoprecipitação e tratamentos com RNase e fosfatase

A seguir, foi adicionada RNase T1 na concentração final de 1U/µl às amostras, sendo estas incubadas a 22°C por 15 minutos e depois colocadas no gelo por 5 minutos. O tratamento com RNase é importante para degradar os RNAs não protegidos pela AGO2 e então diminuir as porções de RNA que de fato estão ligadas a ela e facilitar a análise.

As amostras foram incubadas ou com 100 µl das *beads* Anti-FLAG® M2 *Magnetic Beads* (*Sigma*), as quais são ligadas ao anticorpo monoclonal

de camundongo Anti-FLAG M2, e com peptídeo derivado da proteína TNRC6B na concentração final de 500 µg/ml; ou com 15 a 20 µg do anticorpo anti-AGO2 (*Abcam*, ab32381) conjugado (incubado por uma hora a 4°C com agitação) a 80 µl de *Dynabeads™ Protein G* (*Thermo Fischer Scientific*), o qual contém a Proteína G recombinante acoplada à sua superfície, por 2 horas a 4°C com agitação. Foram guardadas 50 µl das amostras a -20°C para serem utilizadas posteriormente para a verificação da eficiência da imunoprecipitação.

O anticorpo M2 reconhece a sequência FLAG (DYKDDDDK) e permite a captura de proteínas de fusão contendo a sequência do peptídeo FLAG, como o peptídeo derivado da proteína TNRC6B, que interage de forma eficiente com proteínas AGO2 (HAUPTMANN et al., 2015) (Figura 12).

Figura 12. Representação esquemática da organização de *motifs* da proteína TNRC6B e suas regiões de interação com a AGO2. A posição e sequência de aminoácidos do peptídeo utilizado são mostrados. Extraído e modificado de HAUPTMANN et al., 2015.

Usando um separador magnético para tubos, as *beads* foram lavadas 3 vezes com 1 ml de tampão IP; ressuspensas em 100 µl da mesma solução; tratadas novamente com a RNase T1 na concentração final de 10

U/μl por 15 minutos a 22°C; colocadas no gelo por 5 minutos e lavadas 3 vezes com o tampão IP.

Posteriormente, as *beads* foram ressuspendidas em 100 μl de tampão de desfosforilação (Tris-HCl 50 mM, pH 7.9, NaCl 100 mM e MgCl₂ 10 mM), adicionadas a 0.5 U/μl de fosfatase alcalina CIP e incubadas por 30 minutos a 37°C e 850 rpm. Em seguida, as *beads* foram lavadas 3 vezes com 1 ml de tampão de fosforilação (PNK) (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM e MgCl₂ 10 mM) e ressuspendidas com o mesmo tampão contendo DTT (DTT 10 mM).

3.15.4. Radiomarcção do RNA recuperado

Para marcar o RNA ligado à proteína AGO2, às *beads* foi adicionado γ-³²P-ATP para a concentração final de 0,5 μCi e 1 U/μl de T4 PNK kinase. Estes foram incubados por 30 minutos a 37°C e 850 rpm. Depois da reação, foi adicionado ATP não radioativo para a concentração final de 100 μM e a mistura de reação foi incubada por mais 5 minutos. Posteriormente, as *beads* foram lavadas 5 vezes com 1 ml de tampão PNK sem DTT.

3.15.5. SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e digestão com proteinase K

Em seguida, as *beads* foram ressuspendidas na proporção de 1:1 com o NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) e NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), ambos da Thermo Fischer Scientific, para o volume final de 70 μl.

Depois dessa etapa as amostras foram fervidas por 5 minutos à 95°C para remover os complexos proteína-RNA das *beads*. Estas foram separadas da solução usando um separador magnético para tubos e 60 µl das soluções resultantes foram corridas em um gel Bis-Tris SDS-PAGE gel (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Midi Protein Gels, 12+2-well, Thermo Fischer Scientific) à 180V usando ácido 3-[N-morfolino] – propanosulfônico] (MOPS) (GenScript) como tampão de corrida.

O restante das amostras, junto com as amostras guardadas anteriormente, foram misturadas aos mesmos tampões NuPAGE®, fervidas e corridas em um gel SDS-PAGE separado (*ExpressPlus™ PAGE Gels, 10×10, 4-20%, 10 wells, GenScript*) para checar a eficiência do imunoprecipitação da AGO2, bem como a depleção desta no lisado (Figura 13).

Figura 13. Imagem representativa do resultado do Western blot contra a proteína AGO2 para checar a eficiência de imunoprecipitação. *Input*: amostras coletadas antes da imunoprecipitação. Imunoprecipitação: amostras provenientes das *beads* conjugadas ao peptídeo da proteína TNRC6B ou ao anticorpo contra a proteína AGO2. Supernadante: remanescente das amostras após a imunoprecipitação. A proteína AGO2 corresponde ao tamanho entre 100 a 130 kDa.

Ambos os géis foram transferidos como o *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio Rad) para uma membrana de nitrocelulose por 40 minutos à 20V usando o tampão de transferência (25 mM Tris, 190 mM Glicina e Metanol 10%). A membrana correspondente ao gel corrido separadamente foi submetida à técnica do Western blot conforme o item 3.16., utilizando-se o anticorpo primário contra AGO2 na proporção de 1:2000 e uma hora de incubação à temperatura ambiente com agitação.

Após a transferência, as bandas correspondentes ao marcador de proteína foram marcadas com 0,2 µl de material radioativo, a membrana foi embrulhada com papel filme, exposta a uma tela com emulsão fotográfica por uma hora ou mais à -20°C e a imagem foi captada em um *scanner* de laser *Typhoon FLA 9500* (GE).

A imagem derivada do *scanner* foi impressa, alinhada aos marcadores feitos com material radioativo e usada para identificar a parte correta da membrana correspondente às bandas da proteína AGO2 (cerca de 100 kDa) (Figura 14).

Figura 14. Imagem representativa dos RNAs ligados à proteína AGO2 após imunoprecipitação, corrida em gel SDS e transferência para membrana, conforme os itens 3.16.3 a 3.16.5. Os RNAs ligados a proteína AGO2 correspondem a aproximadamente à banda de cerca de 130 kDa.

Posteriormente, a parte da membrana correspondente à proteína AGO2 (cerca de 130 kDa) foi recortada em pequenos pedaços e colocados em tubos de 1,5 ml.

O RNA das membranas foi liberado das proteínas por meio da adição de proteinase K em três passos consecutivos (sempre adicionando a enzima e tampão no mesmo tubo):

- Primeiro: 1,2 mg/ml de proteinase K foram adicionados à 200 µl de tampão para a digestão de proteínas 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 75 mM; EDTA 6,25 mM e SDS 1%), incubados à 50°C por 30 minutos e 1050 rpm;
- Segundo: 0,75 mg/ml de proteinase K foram adicionados à 150 µl de tampão para a digestão de proteínas 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 75 mM; EDTA 6,25 mM e SDS 1%), incubados à 50°C por 30 minutos e 1050 rpm;
- Terceiro: 0,75 mg/ml de proteinase K foram adicionados à 150 µl de tampão para a digestão de proteínas 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 75 mM; EDTA 6,25 mM e SDS 1%), incubados à 50°C por 30 minutos e 1050 rpm.

Após a digestão, os pedaços da membrana foram descartados e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml. A seguir, foi adicionado 50 µl de NaCl 3 M e 300 µl de solução ácida de fenol/clorofórmio pH 4,5 (*Ambion*) ao sobrenadante e mistura foi vortexada. A amostra foi centrifugada por 2 minutos a 1200 rpm e 4°C, a fase aquosa foi colocada em um novo tubo de 1,5 ml e 300 µl de clorofórmio foi adicionado a ela.

Posteriormente, a amostra foi novamente centrifugada e sua fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml.

O RNA foi precipitado adicionando-se 1,5 µl de glicogênio (10 mg/ml), 1 ml de etanol 100% e incubando-se a amostra a -20°C por pelo menos uma hora. A seguir, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4°C e 12000g e o etanol foi removido com a pipeta. Este último passo foi repetido (centrifugação e remoção do etanol) até todo o etanol ser removido, e então o *pellet* foi ressuspendido em 9 µl de água.

3.15.6. Ligação do adaptador 3'

Para a ligação do adaptador da região 3', adaptadores com diferentes sequências na sua extremidade 5' foram utilizados (exemplo: 5' NNTGACTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG 3', sendo que a região 5' NNTGACTGTG 3' diferencia o adaptador). RNAs marcadores, RNAs de 19 e 35 nt marcados com γ -³²P-ATP, foram utilizados para selecionar o tamanho dos RNAs e checar a eficiência de ligação. Sendo assim, estes marcadores e nossas amostras foram ligadas ao adaptador 3'. Para esta reação, foram utilizados 2 µl de tampão da RNA ligase sem ATP (Tris-HCl 500 mM pH 7,6 e 100 mM MgCl₂), 6 µl de PEG-8000 50% e 2 µl do adaptador 3' adenilado. 10 µl da mistura de reação foram adicionados à 9 µl da amostra e outros 10 µl da mistura de reação foram adicionados a 7 µl de água e 2 µl da mistura dos marcadores de 19/35 nt. Posteriormente, as amostras de RNA foram desnaturadas à 90°C por 1 minuto, colocadas no gelo por 2 minutos, 1 µl da

ligase Rnl2(1-249) K227Q (*Neblabs*) foi adicionada às amostras e estas foram então incubadas *overnight* no gelo dentro de uma geladeira à 4°C.

No dia seguinte, foram adicionados 20 µl de solução de formamida (EDTA 50 mM, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05% e formamida para 100%) às amostras e aos marcadores. Ambos foram desnaturados à 90°C por 1 minuto e corridos em um gel Urea-PAGE 15% (15 ml de *Urea Gel Concentrate*, 2,5 ml de *Urea Gel Buffer*, 7,5 ml de *Urea Dilutant*) (*National Diagnostics*) contendo 150 µl de persulfato de amônio 10% e 15 µl de tetrametiletenodiamina (*Sigma*) por aproximadamente 45 minutos à 30 W usando como tampão de corrida TBE 0,5 x. Posteriormente, o gel foi deixado em uma das placas de vidro e três de suas extremidades foram marcadas com 0,2 µl de material radioativo, além do vidro, que foi marcado na mesma posição com uma caneta. O vidro e o gel foram embrulhados com papel filme e expostos em uma tela com emulsão fotográfica por 1 hora à -20°C e a seguir a imagem foi desenvolvida no *scanner* de laser *Typhoon FLA 9500* (GE).

A imagem derivada do aparelho foi impressa em tamanho real, alinhada às marcas feitas anteriormente no vidro e estas foram usadas para identificar a região correta a ser cortada. Após as partes correspondentes ao RNA ligado ao adaptador 3' (região entre 35 e 19 nt) serem excisadas e cortadas em pedaços menores, estes foram colocados em tubos de 0,5 ml contendo furos em suas bases. Estes últimos foram colocados, por sua vez, dentro de tubos comuns de 1,5 ml e centrifugados por 1 minuto a 12000g. Aos pedaços de gel triturados foram adicionados 400 µl de NaCl 0,3 M. Em seguida eles foram incubados por 45 minutos a 60°C e 1400 rpm.

As soluções foram coletadas e colocadas em tubos contendo filtro. Estes foram centrifugados por 1 minuto a 5000g e ao eluído foi adicionado 1,5 µl de glicogênio (10 mg/ml) e 1 ml de etanol 100%. A solução foi incubada por pelo menos 1 hora a -20°C para precipitar o RNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12000g e 4°C e os *pellets* foram ressuspensos em 9 µl de água.

3.15.7. Ligação do adaptador 5'

Após esta etapa, as amostras foram ligadas ao adaptador 5' (5' GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC 3'). Para isso, foi preparado a seguinte mistura de reação: 2 µl de tampão da RNA ligase contendo ATP (Tris-HCl 500 mM, pH 7.6; MgCl₂ 100 mM; DTT 100 mM e ATP 10 mM), 6 µl de PEG-8000 50% e 1 µl do adaptador 5' a 100 µM. À 9 µl desta mistura de reação foram adicionados 9 µl dos marcadores de RNA de 35/19 nt ou à 9 µl das amostras. Estas foram desnaturadas à 90°C por 1 minuto, colocadas no gelo por 2 minutos e adicionadas à 2 µl de ligase Rnl1 (*Thermo Fisher Scientific*). A reação foi incubada por 1 hora à 37°C e 850 rpm.

Posteriormente, as amostras e marcadores foram fracionadas em um gel Urea-PAGE 12% (24 ml de *Urea Gel Concentrate*, 5 ml de *Urea Gel Buffer*, 21 ml de *Urea Dilutant*) (*National Diagnostics*). Todo o processo restante de purificação e precipitação do RNA das amostras depois desta etapa foi feito como descrito anteriormente após a ligação do adaptador 3'. Os *pellets* das amostras foram então ressuspensos em 4,6 µl de água.

3.15.8. Transcrição Reversa

No dia seguinte foi feita a transcrição reversa das amostras. Para isso foram utilizados os seguintes reagentes: 1,5 µl de DTT, 3 µl de 5 x *first strand buffer* (*Thermo Fischer Scientific*), 4,2 µl de 10 x dNTP (dATP 2 mM, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM e dTTP 2 mM) e 1 µl do primer 5' GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA 3' (100 µM da solução estoque). O RNA recuperado foi desnaturado à 90°C por 30 segundos, adicionado à 9,7 µl da mistura de reação descrita acima e incubado por 3 minutos à 50°C. Posteriormente, 0,75 µl da enzima transcriptase reversa *Superscript III* (*Thermo Fischer Scientific*) à mistura de reação e esta foi incubada por mais 2 horas à 50°C. Após esta etapa, o cDNA foi diluído adicionando-se 85 µl de água.

3.15.9. Amplificação por PCR

Em seguida foi realizada a PCR das amostras de cDNA. Nesta reação foram utilizados os seguintes reagentes: 64,4 µl de água, 10 µl de tampão 10 x (*Thermo Fischer Scientific*), 0,5 µl de *primer forward* (5' ATT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TA 3') (100 µM da solução estoque), 0,5 µL de *primer reverse* (100 µM da solução estoque) e 0,4 µl de Taq DNA polimerase (*Thermo Fischer Scientific*). 90 µl desta reação foi adicionada a 10 µl de cDNA e foi utilizado o seguinte ciclo: 94°C por 2 minutos, 94°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, sendo este ciclo (com exceção da etapa de 94°C por 2 minutos) repetido por 30 vezes.

Depois do ciclo número 8, uma alíquota de 10 µl foi retirada da reação a cada 3 ciclos para determinar melhor o número de ciclos a ser utilizado para amplificação da biblioteca, de modo a evitar artefatos de PCR.

Todas as alíquotas foram corridas em um gel de agarose 2,5% junto com um marcador de 20 pb. O gel foi analisado e o ciclo de número no qual da PCR foi escolhido como o ideal para a biblioteca.

As reações de PCR foram refeitas para 3 reações de 100 µl por amostra, utilizando-se o número do ciclo anterior em que uma banda de cerca de 140 pb começa a aparecer como ideal (a amplificação do adaptador 3' ligado ao adaptador 5', um artefato do método), e posteriormente elas foram juntadas em um único tubo.

3.15.10. Purificação e quantificação

Em seguida, as reações de PCR foram concentradas e purificadas usando o kit *DNA Clean & Concentrator™-5* (Zymo Research) e as amostras foram eluídas em 32 µl de água. Posteriormente os produtos de PCR foram corridos em um gel 3% *Pippin Prep* (Sage Science), seguindo as instruções do fabricante e amostras de DNA variando de 143 a 163 pb foram coletadas.

Tais amostras foram diluídas para 100 µl com água e foram utilizadas para novas PCRs, feitas conforme o item anterior, sendo checado o ciclo ideal, refeitas para 3 reações de 100 µl, concentradas, purificadas e novamente corridos em no gel 3% *Pippin Prep*.

Subsequentemente, as amostras coletadas foram quantificadas utilizando-se o *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit* (Thermo Fischer

Scientific), de acordo com as indicações do fabricante, e estas foram ajustadas para a concentração de 3 nM para serem sequenciadas.

3.15.11. Sequenciamento

Após a preparação da biblioteca, como descrito nos itens anteriores, esta foi sequenciada no *HiSeq® 3000 (Illumina)* e as etapas de clusterização e sequenciamento foram semelhantes às aquelas descritas no item 3.13. O sequenciamento foi do tipo *single-read*, executado com 50 ciclos.

3.16. Avaliação da expressão proteica dos possíveis alvos dos miRNAs em estudo: *ACO2*, *MAML1*, *ME1*, *PAPSS1* e *VIM* nas linhagens A2780 e SKOV-3

Para este protocolo, as células das linhagens A2780 e SKOV-3 em cultivo em placas de 10 cm foram peletadas e lavadas com PBS 1X. As células foram em seguida homogeneizadas com 200 µl de tampão IP (o mesmo utilizado para o PAR-CLIP) ou RIPA contendo inibidores de protease *cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), deixadas por 15 minutos no gelo e sonicadas por 10 segundos três vezes em amplitude de 20% no *Ultrasonic Processor for Small Volume Applications* (Sonics). Posteriormente, o lisado das células foi centrifugado por 15 minutos à 4°C e 15000 rpm.

A proteína presente no lisado foi quantificada utilizando-se o *Bio-Rad Protein Assay Kit* (Bio Rad) e o espectrofotômetro *SmartSpec Plus* (Bio Rad).

A seguir, um volume do lisado correspondente a 25 µg de proteína foi diluída 1:1 com os tampões *NuPAGE®*, fervido e corrido em um gel SDS-PAGE (*ExpressPlus™ PAGE Gels, 10×10, 4-20%, GenScript*) usando o ácido 3-[N-morfolino] – propanosulfônico (MOPS) (*GenScript*) como tampão de corrida. Depois dessa etapa, as amostras de proteínas do gel foram transferidas como o *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio Rad) para uma membrana de nitrocelulose por 40 minutos à 20 V usando o tampão de transferência (25 mM Tris, 190 mM Glicina e Metanol 10%).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada incubando-a por 30 minutos à temperatura ambiente e agitação com o tampão TBST (TBS 1X e Tween 20 0,05%) contendo 2% de leite desnatado. A seguir, o anticorpo contra a proteína alvo de interesse foi adicionado ao TBST 2% leite na proporção de 1:1000 a 1:4000 e a membrana foi incubada nesta solução por 1 hora com o anticorpo primário anti-AGO2 (*Abcam*), anti-LAMIN A/C (*Santa Cruz*), anti-PAPSS1 (*Proteintech*), anti-ACO2 (*Proteintech*), anti-VIM (*Proteintech*), anti-MAML1 (*Proteintech*) ou anti-ME1 (*Proteintech*). Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos cada com TBST e incubada com solução TBST 2% leite e o anticorpo secundário *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP* (*Thermo Fisher*) na proporção de 1:4000 por 30 minutos à temperatura ambiente com agitação. Depois desta etapa, a membrana foi lavada três vezes novamente e revelada com 1 ml do *Luminata Crescendo Western HRP Substrate* (*Millipore*) no equipamento *ChemiDoc XRS+Imager* (Bio Rad).

3.17. Análise da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) nas linhagens A2780 e SKOV-3

O processo de EMT é um processo importante na biologia de cânceres derivados de células epiteliais. A migração e invasão fazem parte do processo de EMT. Neste trabalho verificou-se que os eventos de migração e invasão foram inibidos pelos miRNAs estudados na linhagem A2780 e SKOV-3, desta forma achamos interessante verificar a expressão de genes associados ao EMT.

Durante o período no laboratório do Dr. Markus Hafner, foram refeitos os RNA-Seqs para a linhagem A2780 e também para a linhagem SKOV-3 em triplicata biológica. O processo de preparação da biblioteca foi semelhante ao descrito no item 3.13., porém não foram selecionados somente RNAs com cauda poli-A, mas todos os RNAs exceto os ribossomais.

A partir desses dados de expressão foram analisados alguns dos principais genes envolvidos no processo de EMT, como *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *SERPINE1*, *TWIST1*, *TWIST2*, *ZEB1*, *ZEB2* e *SNAI1*.

3.18. Análise de correlação da expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) com seus alvos validados

Para verificar se havia a presença de correlação negativa entre a expressão dos miRNAs do presente estudo e seus alvos aqui validados, foram baixados os dados de miRNA-Seq publicados para as amostras de cistoadenocarcinoma seroso de ovário e os dados de mRNA derivados de RNA-Seq pelo pacote *cgdsr* (ANDERS JACOBSEN, [s.d.]) no software R (“R: The R Project for Statistical Computing”, [s.d.]). Os níveis de expressão possuem normalização em RSEM (Expectation-Maximization).

Cada valor de expressão do miR-450a ou miR-450b-5p foi plotado contra o os níveis de expressão do mRNA alvo correspondente de uma mesma amostra. As análises de correlação foram feitas conforme o item 3.19.3.

3.19. Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas com o programa *GraphPad Prism* 5. Quando $p < 0.05$ para um determinado resultado, a hipótese nula, que considera as médias das variáveis iguais, foi rejeitada.

3.19.1. Análises de expressão

A análise estatística teste T-Student foi realizada quando se comparou a expressão entre dois grupos distintos. Já entre três ou mais grupos foi utilizado One Way Anova e pós teste de Bonferroni.

3.19.2. Experimentos funcionais

Os experimentos funcionais foram realizados em triplicata experimental e repetidos três vezes independentemente, sendo calculados a média e desvio padrão em relação ao grupo controle. As análises estatísticas One Way Anova e pós teste de Bonferroni foram realizadas quando os dados obedeciam uma distribuição normal. Já quando os dados não obedeciam uma curva de Gauss, a estes foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Tais análises foram realizadas para todos os ensaios funcionais, exceto o de proliferação. Para o ensaio de proliferação foi utilizada a análise Two Way Anova e pós teste de Bonferroni.

3.19.3. Análises de correlação dos dados obtidos do TCGA

Para análises com os dados obtidos do TCGA, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman, dependendo da distribuição dos dados ser paramétrica ou não paramétrica, respectivamente.

3.19.4. Análises referentes ao RNA-Seq

As análises computacionais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, situado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Toda a análise foi realizada no sistema operacional Fedora 11 (Leonidas) kernel 2.6.30.

Os arquivos de imagens gerados pelo *Illumina Genome Analyzer IIx* (*Illumina Inc.*) foram tratados e convertidos por meio do CASAVA v.1.8

(Illumina Inc.) em arquivos de extensão fastq, que contêm as sequências geradas e a descrição de qualidade das bases. Com o *FastQC* (“Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data”, [s.d.]), uma ferramenta de controle de qualidade para sequenciamentos de larga escala, a qualidade de cada *lane* da *flow cell* foi checada para cada amostra.

O mapeamento dos fragmentos gerados (*reads*) foi feito com TopHat2 (KIM et al., 2013), utilizando o GRCh37 como genoma de referência. Após o mapeamento, os arquivos com as informações geradas no formato binário “bam” foram convertidos para o formato “sam” utilizando o SAMtools (LI et al., 2009). Em seguida, a quantificação de genes e transcritos foi feita usando o HTSeqCount, uma ferramenta que realiza o pré-processamento para a análise de expressão diferencial por meio da contagem de *reads* sobrepostas com genes ou transcritos (ANDERS; PYL; HUBER, 2015). A normalização da quantificação gênica e a expressão diferencial entre os grupos foi realizada no ambiente estatístico R (“R: The R Project for Statistical Computing”, [s.d.]) utilizando o pacote do DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). No mesmo ambiente, foi realizada a análise de componente principal (PCA) entre os grupos para checar o agrupamento das amostras conforme sua expressão global. Adicionalmente foram plotados no ambiente R *volcano plots* (valor p x *fold change*), agrupando as três linhagens diferentes segundo a superexpressão dos miRNAs em estudo. Desta forma, foram feitos dois gráficos tendo no eixo x o *fold change* entre as linhagens ^{+pLVX} e ^{+pLVX+miR450a} ou entre ^{+pLVX} e ^{+pLVX+miR450b}, e no eixo y o valor p calculado para cada uma destas razões de expressão.

Como não foi possível utilizar replicatas experimentais entre as amostras usadas no sequenciamento, foi feito para cada amostra com superexpressão de um miRNA e sua respectiva linha controle (^{+pLVX}) um MA *plot*, que representa o log do *fold change* da expressão normalizada entre duas amostras (R e G) no eixo y [$\log_2 (R/G)$] e o log da média de expressão normalizada entre as mesmas amostras no eixo x [$\frac{1}{2} \log_2 (RG)$] (DUDOIT et al., 2002). Os MA *plots* foram utilizados para melhor visualizar os genes diferencialmente expressos entre grupos tratamento e controle e, desta forma, estabelecer os valores limites de *fold change* que melhor os distinguiriam. Tais plotagens foram feitas no programa *GraphPad Prism 4*.

3.19.5. Análises referentes ao PAR-CLIP

Após a checagem da qualidade das bases, conforme o item anterior, os arquivos de extensão fastq referente às sequências das amostras submetidas ao método de PAR-CLIP foram analisados no algoritmo PARalyzer (CORCORAN et al., 2011) juntamente com o pipeline de análise PARpipe (“Uwe Ohler’s Lab at MDC”, [s.d.]). O PARalyzer utiliza a substituição de nucleotídeo T para C em um classificador de estimativa de densidade kernel para gerar sítios de interação entre proteína-RNA de alta resolução (CORCORAN et al., 2011).

Nesta análise se pelo menos 5 *reads* únicas se sobrepõem por pelo menos um nucleotídeo, tiverem pelo menos 20 pb e possuírem no máximo 2 *mismatches* restritos a mutações T para C são gerados os grupos. Destes grupos são filtrados aqueles que não possuem nenhuma conversão T para C e que possuem especificidade de conversão menor que 0,6 (probabilidade de

conversão de T para C menor que a probabilidade de não conversão) (modificado de CORCORAN et al., 2011). Os grupos resultantes são então chamados de *clusters* e a partir destes foram analisados os alvos dos miRNAs em estudo.

Dentre os *clusters* gerados, foram selecionados aqueles que continham a sequência de pelo menos 6 nt complementar à sequência *seed* dos miRNAs miR-450a-5p (UUUGCG) ou miR-450b-5p (UUUGCA) em cada uma das respectivas linhagens com superexpressão de cada miRNA. Os *clusters* dos genes selecionados que apareceram em pelo menos 1 amostra utilizada no PAR-CLIP foram testados por RT-qPCR nas amostras de RNA correspondentes conforme o item 3.4. Se validados, os genes também foram testados por Western blot conforme o item 3.16. para as amostras de proteína correspondentes.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de apoptose (anoikis)

Neste experimento, com exceção do miR-450b na linhagem de ovário OVCAR-3, somente o miR-450a alterou a viabilidade das linhagens testadas. O resumo dos resultados está nas figuras 15 e 16 e nas tabelas 4 a 7.

O miR-450a diminuiu a viabilidade após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência das linhagens tumorais SiHa (colo de útero), A2780, OVCAR-3 e SKOV-3 (ovário). A perda de viabilidade foi maior no caso das linhagens SiHa, OVCAR-3 e A2780 por morte celular com rompimento da membrana plasmática verificada pelas células positivas somente para a marcação com PI.

Todavia, o miR-450a também aumentou de forma significativa a taxa apoptose inicial (nesse caso anoikis) na linhagem A2780, SiHa e SKOV-3. Também houve aumento de células em apoptose tardia ou necrose na linhagem A2780 e diminuição na linhagem SiHa após a superexpressão do miR-450a.

Para as linhagens C33, não houve diferença significativa quanto à viabilidade celular após 24 horas em cultivo em placas de baixa aderência.

Tabela 4. Médias da porcentagem de viabilidade (células PI e Anexina V negativas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência. Linhagens cujo resultado foi estatisticamente significativo. *p<0.05, ***p<0.001. ***/* p<0.001 para o miR-450a e p<0.05 para o miR-450b. ± erro padrão da média.

Linhagens tumorais	Viabilidade (%)		
	+pLVX	+pLVX+miR-450a	+pLVX+miR-450b
SiHA***	91,27 ± 1,12	83,29 ± 0,99	-
A2780***	79,52 ± 1,36	45,27 ± 3,81	-
SKOV-3*	89,45 ± 1,27	84,09 ± 1,68	-
OVCAR-3***/*	78,23 ± 1,33	57,05 ± 3,37	68,74 ± 2,52

Tabela 5. Médias da porcentagem de apoptose inicial (células somente Anexina V positivas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência. Linhagens cujo resultado foi estatisticamente significativo. *p<0.05 e **p<0.001. ± erro padrão da média.

Linhagens tumorais	Anoikis (%)	
	+pLVX	+pLVX+miR-450a
SiHA*	6,89 ± 1,09	4,25 ± 0,41
A2780**	7,22 ± 0,82	22,6 ± 3,45
SKOV-3*	6,52 ± 0,833	11,1 ± 1,07

Tabela 6. Médias da porcentagem de morte celular (células somente PI positivas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência. Linhagens cujo resultado foi estatisticamente significativo. ***p<0.001. ± erro padrão da média.

Linhagens tumorais	Morte (%)	
	+pLVX	+pLVX+miR-450a
SiHA***	1,37 ± 0,06	11,12 ± 1,23
A2780***	11,91 ± 0,94	26,48 ± 2,10
OVCAR-3***	15,54 ± 1,73	35,67 ± 3,37

Tabela 7. Médias da porcentagem de apoptose tardia (células PI e Anexina V positivas) após 24 horas de cultivo em placas de baixa aderência. Linhagens cujo resultado foi estatisticamente significativo. **p<0.01 e ***p<0.001. ± erro padrão da média.

Linhagens tumorais	Apoptose Tardia (%)	
	+pLVX	+pLVX+miR-450a
SiHA***	1,52 ± 0,21	1,81 ± 0,18
A2780**	1,28 ± 0,24	5,65 ± 1,19

Linhagens tumorais de colo de útero

Figura 15. Avaliação da morte celular das linhagens tumorais de colo de útero SiHa e C33 após cultivo em placa de baixa aderência. Acima e esquerda: apoptose inicial (% de células marcadas somente para Anexina V). Abaixo e esquerda: morte não causada por apoptose (% de células marcadas somente para PI). Acima e direita: apoptose tardia (% de células marcadas para Anexina e PI). Abaixo e direita: viabilidade. - linhagem com vetor vazio; + miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. Os valores se referem à média de três experimentos independentes. *p<0.05 e ***p<0.001.

Linhagens tumorais de ovário

Figura 16. Avaliação da morte celular das linhagens tumorais ovário A2780, SKOV-3 e OVCAR-3 após cultivo em placa de baixa aderência. Acima e esquerda: apoptose inicial (% de células marcadas somente para Anexina V). Abaixo e esquerda: morte não causada por apoptose (% de células marcadas somente para PI). Acima e direita: apoptose tardia (% de células marcadas para Anexina e PI). Abaixo e direita: viabilidade. - linhagem com vetor vazio; + miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. Os valores se referem à média de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.2. Ensaio clonogênico

A capacidade de formação de colônias de células sem contato com outras células foi avaliada conforme o item 3.11.1.2. Os miRNAs em estudo só causaram efeito neste experimento para as linhagens tumorais de ovário A2780 e SKOV-3.

Pela figura 17, nota-se que o miR-450a reduziu a taxa de formação de colônias para na linhagem A2780 (39,2% para A2780^{+pLVX} contra 24,5% da A2780^{+pLVX+miR-450a} $p < 0.01$). Porém, a área das colônias após a

superexpressão do miR-450a nesta mesma linhagem é visivelmente maior do que para a linhagem controle (Figura 18).

Por outro lado, o miR-450b diminui a taxa de formação de colônias na linhagem SKOV-3 (23,9% para SKOV-3^{+pLVX} contra 13,6% da SKOV-3^{+pLVX+miR-450b} $p<0.01$) (Figuras 17 e 18).

Figura 17. Avaliação da clonogenicidade das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3. - linhagem com vetor vazio; +miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e +miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. Os valores se referem à média de três experimentos independentes. ** $p<0.01$.

Figura 18. Imagens representativas das colônias por grupo ao final do experimento das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3. - linhagem com vetor vazio; + 450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + 450b: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.3. Ensaio de proliferação

Conforme as figuras 19 e 20, nota-se que somente as linhagens tumorais de ovário A2780 e SKOV-3 apresentaram diferença na taxa de proliferação após superexpressão dos miRNAs miR-450a ou miR-450b. O miR-450b diminuiu a taxa de proliferação da linhagem SKOV-3 após 72 ($p<0.001$), 96 ($p<0.01$) e 120 ($p<0.01$) horas da marcação com o corante

fluorescente. Já o miR-450a, curiosamente, aumentou a taxa de proliferação na linhagem A2780 após 24 e 48 horas ($p < 0.001$).

Linhagens tumorais de colo de útero

Figura 19. Avaliação da proliferação das linhagens tumorais de colo de útero SiHa e C33. ^{+pLVX}: linhagem com vetor vazio; ^{+pLVX+miR-450a}: linhagem contendo o pri-miR-450a e ^{+pLVX+miR-450b}: linhagem contendo o pri-miR-450b. A queda da intensidade de fluorescência foi avaliada segundo o item 3.11.1.3. Os valores se referem à média de três experimentos independentes.

Linhagens tumorais de ovário

Figura 20. Avaliação da proliferação das linhagens tumorais de ovário A2780, SKOV-3 e OVCAR-3. ^{+pLVX}: linhagem com vetor vazio; ^{+pLVX+miR-450a}: linhagem contendo o pri-miR-450a e ^{+pLVX+miR-450b}: linhagem contendo o pri-miR-450b. A queda da intensidade de fluorescência foi avaliada segundo o item 3.11.1.3. Os valores se referem à média de três experimentos independentes. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.4. Ensaio de migração

Conforme as figuras 21 e 22, foi verificado que para as linhagens tumorais de colo de útero, na linhagem C33 o efeito dos miRNAs em estudo levou ao aumento da taxa de migração (100% em média para C33^{+pLVX} contra 130,7% da C33^{+pLVX+miR-450a} e 149,5% da C33^{+pLVX+miR-450b}, $p<0.001$). Já o miR-450a na linhagem SiHa inibiu a taxa de migração (100% em média para SiHa^{+pLVX} contra 66,7% da SiHa^{+pLVX+miR-450a}, $p<0.001$).

Para as linhagens tumorais de ovário, os miRNAs miR-450a e miR-450b diminuíram a taxa de migração nas linhagens A2780 (100% em média para A2780^{+pLVX} contra 9,4% da A2780^{+pLVX+miR-450a} e 59,9% da A2780^{+pLVX+miR-450b}, $p<0.001$ e $p<0.01$, respectivamente) e SKOV-3 (100% em média para SiHa^{+pLVX} contra 60,3% da SiHa^{+pLVX+miR-450a} e 75,3 da SiHa^{+pLVX+miR-450b}).

Figura 21. Avaliação da migração das linhagens SiHa, C33 (linhagens tumorais de colo de útero), e A2780, SKOV-3 e OVCAR-3 (linhagens tumorais de ovário), com membrana *transwell*. +pLVX: linhagem com vetor vazio; - linhagem com vetor vazio; + 450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + 450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. Os valores se referem à média de três experimentos independentes. ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$.

Linhagens tumorais de colo de útero

Linhagens tumorais de ovário

Figura 22. Imagens representativas do ensaio de migração com membrana *transwell* das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3. - linhagem com vetor vazio; + 450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + 450b: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.5. Ensaio de invasão

Neste ensaio, para as linhagens tumorais de colo de útero, somente houve diferença na capacidade de invasão entre as linhagens SiHa^{+pLVX+miR-450b} e SiHa^{+pLVX}, sendo que a primeira foi menos invasiva que a segunda (81,8% em média para SiHa^{+pLVX} contra 39,9% da SiHa^{+pLVX+miR-450b}, $p<0.01$) (Figuras 23 e 24).

Ambos os miRNAs diminuíram a capacidade de invasão nas linhagens tumorais de ovário A2780 (100% em média para A2780^{+pLVX} contra 12,5% para A2780^{+pLVX+miR-450a} e 25,7% para A2780^{+pLVX+miR-450b}; $p<0.001$ e $p<0.01$, respectivamente) e SKOV-3 (100% em média para SKOV-3^{+pLVX} contra 47,9% para SKOV-3^{+pLVX+miR-450a} e 70,9% para SKOV-3^{+pLVX+miR-450b}; $p<0.001$ e $p<0.05$, respectivamente). Já a o miR-450a aumentou a taxa de invasão na linhagem OVCAR-3 (100% em média para OVCAR-3^{+pLVX} contra 202,8% para OVCAR-3^{+pLVX+miR-450a}; $p<0.001$) (Figuras 23 e 24).

Figura 23. Avaliação da invasão das linhagens SiHa, C33 (linhagens tumorais de colo de útero), e A2780, SKOV-3 e OVCAR-3 (linhagens tumorais de ovário), com membrana *transwell*. - linhagem com vetor vazio; + 450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + 450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. Os valores se referem à média de três experimentos independentes. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$.

Linhagens tumorais de colo de útero

Linhagens tumorais de ovário

Figura 24. Imagens representativas do ensaio de invasão com membrana *transwell* das linhagens SiHa, C33, A2780, SKOV-3 e OVCAR-3. - linhagem com vetor vazio; + 450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + 450b: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.6. Análise de correlação de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Carcinoma de Células Escamosas de Colo de Útero e Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário com dados clínico-patológicos obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)

Dentre as variáveis analisadas, somente o *status* de menopausa foi correlacionado com os níveis de expressão dos microRNAs em estudo em carcinoma de células escamosas de colo de útero. Neste caso, a expressão do miR-450a ($p < 0.05$) e miR-450b ($p < 0.01$) foi maior nas pacientes que estavam na pré-menopausa em relação àquelas em estágio de pós-menopausa. Além disso, idade acima dos 50 anos foi correlacionada com uma menor expressão do miR-450a ($r = -0,25$ e $p < 0.05$) e miR-450b-5p ($r = -0,29$ e $p < 0.001$) (Tabelas 8 e 9). De outra forma, para cistoadenocarcinoma seroso de ovário, nenhuma variável clínica foi associada à expressão dos miRNAs do presente trabalho, sendo que o *status* de menopausa não estava disponível (Tabelas 10 e 11).

Tabela 8. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450a em tecidos de em carcinoma de células escamosas de colo de útero com dados clínico-patológicos. Informações derivadas do TCGA em <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>. *p<0.05.

miR-450a	n	média RSEM (Expectation-Maximization) (± s)	p values
Idade (anos)			
< 50	100	7.14 ± 0.46	0.0212*
≥ 50	66	6.04 ± 0.62	
Estádio FIGO			
I-II	135	7.00 ± 0.44	0.1091
III-IV	32	5.25 ± 0.49	
Indicador de invasão linfocascular			
presente	60	7.70 ± 0.75	0.1523
ausente	48	5.79 ± 0.47	
Grau histológico			
GX-G1	16	8.49 ± 1.65	0.216
G2	78	5.97 ± 0.40	
G3-G4	72	7.12 ± 0.64	
Status de menopausa			
pré	72	7.10 ± 4.17	0.0428*
pós	51	6.20 ± 5.48	
HPV			
positivo	14	6.81 ± 1.44	0.8722
negativo	14	7.44 ± 2.01	

Tabela 9. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450b-5p em tecidos de em carcinoma de células escamosas de colo de útero com dados clínico-patológicos. Informações derivadas do TCGA em <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>. **p<0.01.

miR-450b	n	média RSEM (Expectation-Maximization) (± s)	p values
Idade (anos)			
< 50	100	16.89 ± 0.97	0.0028**
≥ 50	66	13.92 ± 1.34	
Estádio FIGO			
I-II	135	16.40 ± 0.94	0.1046
III-IV	32	12.83 ± 1.16	
Indicador de invasão linfocascular			
presente	60	17.53 ± 1.56	0.318
ausente	48	13.89 ± 0.88	
Grau histológico			
GX-G1	16	20.80 ± 3.81	0.0562
G2	78	13.47 ± 0.73	
G3-G4	72	17.00 ± 1.37	
Status de menopausa			
pré	72	16.93 ± 8.42	0.0072**
pós	51	14.34 ± 12.13	
HPV			
positivo	14	15.35 ± 3.03	0.9817
negativo	14	18.23 ± 4.67	

Tabela 10. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450a em tecidos de cistoadenocarcinoma seroso de ovário com dados clínico-patológicos. Informações derivadas do TCGA em <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>.

miR-450a	n	média RSEM (Expectation-Maximization) ($\pm$ s)	p values
Idade (anos)			
< 50	98	0.29 $\pm$ 0.05	0.1769
$\geq$ 50	367	0.23 $\pm$ 0.03	
Estádio FIGO			
II	22	0.21 $\pm$ 0.09	0.2621
III	366	0.24 $\pm$ 0.03	
IV	77	0.29 $\pm$ 0.06	
Grau histológico			
G2	55	0.13 $\pm$ 0.04	0.115
G3	399	0.26 $\pm$ 0.03	

Tabela 11. Análise de correlação de expressão do miRNA miR-450b-5p em tecidos de cistoadenocarcinoma seroso de ovário com dados clínico-patológicos. Informações derivadas do TCGA em <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>.

miR-450b	n	média RSEM (Expectation-Maximization) ($\pm$ s)	p values
Idade (anos)			
< 50	98	0.16 $\pm$ 0.04	0.5887
$\geq$ 50	367	0.18 $\pm$ 0.03	
Estádio FIGO			
II	22	0.20 $\pm$ 0.06	0.1984
III	366	0.19 $\pm$ 0.03	
IV	77	0.12 $\pm$ 0.04	
Grau histológico			
G2	55	0.18 $\pm$ 0.05	0.142
G3	399	0.18 $\pm$ 0.03	

4.7. Análise global de expressão gênica por RNA-Seq

Por meio do *FastQC* foi observado que para todas as *lanes* da *flow cell* em todas as amostras, a qualidade das bases sequenciadas estava em média acima de 30 na escala Phred (EWING; GREEN, 1998). Desta forma, as *reads* puderam ser utilizadas de forma completa, sem necessidade de

eliminação de regiões sujeitas a erros. A figura 25 mostra uma imagem representativa da qualidade das bases de uma *lane* visualizada no *FastQC*.

Figura 25. Qualidade das bases geradas no RNA-Seq. Gráfico (escala Phred x posição das bases nas *reads*) representativo de uma *lane* do RNA-Seq realizado. A imagem foi gerada pelo *FastQC*.

Foram geradas no mínimo cerca de 20 milhões de *reads* por amostra (Tabela 12), sendo que pelo menos 94,1% das mesmas foram mapeadas no genoma humano.

Tabela 12. Número e mapeamento de *reads* por linhagem geradas no RNA-Seq.

Linhagens	Número de <i>reads</i>	Porcentagem de <i>reads</i> mapeadas
A2780 ^{+pLVX+miR-450a}	64.000.000	95,7
A2780 ^{+pLVX}	35.150.786	96,5
A2780 ^{+pLVX+miR-450b}	30.516.190	96,7
C33 ^{+pLVX+miR-450a}	35.352.985	96,5
C33 ^{+pLVX}	20.631.391	96,5
C33 ^{+pLVX+miR-450b}	25.686.914	96,5
SiHa ^{+pLVX+miR-450a}	33.437.138	95,8
SiHa ^{+pLVX}	28.182.654	94,6
SiHa ^{+pLVX+miR-450b}	33.896.923	94,1

A análise de componente principal (PCA) demonstrou que as amostras se agruparam de acordo com a linhagem as quais pertencem, independentemente da superexpressão dos miRNAs em análise (Figura 22). Para esta análise foram retirados os miRNAs miR-450a ou miR-450b-5p, cujas altas expressões levavam as linhagens a se agruparem de forma independente da expressão global de cada amostra, enviesando a análise.

Pela figura 26, nota-se que as linhagens A2780 com superexpressão dos miRNAs em estudo foram aquelas que mais se diferenciaram da linhagem controle A2780^{+pLVX}.

Figura 26. PCA *plot* gerado após o agrupamento das amostras conforme sua expressão global. O gráfico foi gerado no ambiente estatístico R. *Group*: amostras de linhagens agrupadas. ^{+pLVX}: linhagem com vetor vazio; ^{+pLVX+miR-450a}: linhagem contendo o pri-miR-450a e ^{+pLVX+miR-450b}: linhagem contendo o pri-miR-450b.

Com os MA *plots* foram definidos os valores limites de *fold change* entre os genes diferencialmente expressos entre grupos controle e tratamento (Figura 27). Desta forma, para a amostra A2780^{+pLVX} em relação a A2780^{+pLVX+miR-450a}, o valor limite do logaritmo na base 2 de *fold change* (LogFC) escolhido foi maior ou igual a 2,5. Para as demais amostras controles em relação às amostras tratamento, o valor de LogFC foi maior ou igual a 1,0.

Sendo assim, houve:

- entre A2780^{+pLVX+miR-450a} e A2780^{+pLVX}, 150 genes;
- entre A2780^{+pLVX+miR-450b} e A2780^{+pLVX}, 237 genes;
- entre C33^{+pLVX+miR-450a} e C33^{+pLVX}, 47 genes;
- entre C33^{+pLVX+miR-450b} e C33^{+pLVX}, 61 genes;
- entre SiHa^{+pLVX+miR-450a} e SiHa^{+pLVX}, 144 genes,
- entre SiHa^{+pLVX+miR-450b} e SiHa^{+pLVX}, 166 genes subexpressos nas linhagens tratadas.

Figura 27. MA plots que representam o log do *fold change* da expressão normalizada entre uma amostra controle e tratamento (R e G) no eixo y [$\log_2 (R/G)$] e o log da média de expressão normalizada entre as mesmas amostras no eixo x [$1/2 \log_2 (RG)$]. As linhas horizontais em vermelho definem os limites de LogFC entre cada amostra tratamento e sua respectiva amostra controle ($^{+pLVX}$).

Foram feitos adicionalmente *volcano plots* agrupando as três linhagens diferentes segundo a superexpressão dos miRNAs em estudo. Dessa forma, 6 genes (*SPOCK2*, *SCN7A*, *HAPLN1*, *ACTG2*, *CCR1* e *XKR7*) foram superexpressos nas linhagens controle em relação a aquelas que superexpressam o miR-450a (Figura 28), enquanto, 3 genes (*OFCC1*, *XKR7*

e *CTD-2124B20.3*) foram superexpressos nas linhagens controle em relação a aquelas que superexpressam o miR-450b (Figura 29).

Porém, nenhum destes genes é predito como alvo em pelo menos 2 algoritmos de análise de predição de alvos de miRNAs, como o TargetScan (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005), DIANA - microT v3.0 (MARAGKAKIS et al., 2009), miRmap (VEJNAR; ZDOBNOV, 2012), PITA (KERTESZ et al., 2007) e RNA22 (MIRANDA et al., 2006).

Figura 28. *Volcano plot* (valor p x *fold change*), agrupando as três linhagens diferentes segundo a superexpressão do miR-450a contra as três linhagens controles ($^{+pLVX}$). *Down regulated*: genes subexpressos; *up regulated*: genes superexpressos, *no differentially expressed*: genes não diferencialmente expressos.

Figura 29. *Volcano plot* (valor p x *fold change*), agrupando as três linhagens diferentes segundo a superexpressão do miR-450b contra as três linhagens controles ($^{+pLVX}$). *Down regulated*: genes subexpressos; *up regulated*: genes superexpressos, *no differentially expressed*: genes não diferencialmente expressos.

4.8. Análises de vias enriquecidas

Foram feitas análises de vias enriquecidas de acordo com o item 3.14. Conforme as tabelas 13 e 14, foi verificado que a maioria das vias mais significativas dos genes subexpressos após superexpressão dos miRNAs em estudo (vias que estão na primeira linha da tabela) estão relacionadas a interação entre célula e matriz extracelular (*Integrin family cell surface interactions*; *Alpha9 beta1 integrin signaling events* e *Glypican 1 network*) ou diretamente relacionadas com o remodelamento do citoesqueleto de actina (*Arf6 signaling events*). Para a amostra $C33^{+pLVX+miR-450a}$, houve somente uma via associada aos genes subexpressos após superexpressão do miR-450a, que foi a via *Axon guidance*.

Tabela 13. Vias enriquecidas dos genes subexpressos após superexpressão do miR-450a. A significância estatística das vias está na ordem decrescente das linhas.

miR-450a	A2780	C33	SiHa
1	Integrin family cell surface interactions	Axon guidance	Arf6 signaling events
2	Beta1 integrin cell surface interactions	-	Arf6 downstream pathway
3	S1P1 pathway	-	EGFR-dependent Endothelin signaling events
4	Glypican 1 network	-	ErbB1 downstream signaling
5	Arf6 trafficking events	-	Class I PI3K signaling events
6	Nectin adhesion pathway	-	S1P1 pathway
7	GMCSF-mediated signaling events	-	ID
8	EGFR-dependent Endothelin signaling events	-	Signaling events mediated by Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met)
9	Plasma membrane estrogen receptor signaling	-	Internalization of ErbB1
10	Arf6 signaling events	-	Glypican pathway

Tabela 14. Vias enriquecidas dos genes subexpressos após superexpressão do miR-450b. A significância estatística das vias está na ordem decrescente das linhas.

miR-450b	A2780	C33	SiHa
1	Integrin family cell surface interactions	Glypican 1 network	Alpha9 beta1 integrin signaling events
2	Beta1 integrin cell surface interactions	Signaling events mediated by Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met)	GMCSF-mediated signaling events
3	Glypican pathway	PAR1-mediated thrombin signaling events	Sphingosine 1-phosphate (S1P) pathway
4	Axon guidance	ErbB receptor signaling network	Endothelins
5	Other semaphorin interactions	LKB1 signaling events	S1P1 pathway
6	Arf6 downstream pathway	VEGF and VEGFR signaling network	Beta1 integrin cell surface interactions
7	Thrombin/protease-activated receptor (PAR) pathway	IL3-mediated signaling events	Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPAR-mediated signaling
8	Plasma membrane estrogen receptor signaling	Sphingosine 1-phosphate (S1P) pathway	Plasma membrane estrogen receptor signaling
9	Glypican 1 network	Integrin family cell surface interactions	Proteoglycan syndecan-mediated signaling events
10	EGFR-dependent Endothelin signaling events	TRAIL signaling pathway	Syndecan-1-mediated signaling events

Observação: A partir do momento em que se verificou que os resultados referentes à função do miRNAs miR-450a e miR-450b são bastante semelhantes nas linhagens tumorais de ovário A2780 e SKOV-3 e, portanto, são corroboradas; e que, pela análise de PCA, somente na linhagem de câncer de ovário houve uma melhor separação entre os grupos tratados e controle, daqui para a frente somente foram feitas análises nestas linhagens.

4.9. Ensaio funcional *in vivo* (modelo xenográfico de câncer de ovário)

Após 4 semanas de injeção das células da linhagem A2780 na cavidade peritoneal dos animais, estes foram sacrificados conforme o item 3.11.2. e os tumores da cavidade peritoneal foram recuperados e pesados. Embora outras partes dos animais fossem dissecadas, como pulmão e cérebro, nenhum tumor foi encontrado fora da cavidade peritoneal. Segundo as figuras 30 e 31, o peso dos tumores após a superexpressão do miR-450a e miR-450b diminuiu 11 ($p < 0.0001$) e 2 ($p < 0.05$) vezes, respectivamente, comparados à linhagem A2780 controle. Além disso, na figura 31 se observa um maior inchaço na região abdominal do animal do grupo controle que foi derivada também do acúmulo de líquido peritoneal (ascite) se comprado aos outros animais.

Figura 30. Peso total dos tumores recuperados da cavidade peritoneal dos animais após 29 dias de injeção das células A2780. - linhagem com vetor vazio; + miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. * $p < 0.05$ e **** $p < 0.0001$.

Figura 31. Imagem representativa dos tumores extraídos e dos animais dos grupos correspondentes ao final de 4 semanas após a injeção das células A2780. - linhagem com vetor vazio; + miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.10. Análise da interação dos miRNAs estudados com mRNAs em escala genômica utilizando o PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation)

A técnica do AGO2-PAR-CLIP foi realizada para as linhagens A2780 e SKOV-3 em replicata, porém somente com a primeira linhagem o número de *clusters* gerados por amostra foi considerado suficiente para dar continuidade às análises posteriores. A figura 32 mostra o número de *clusters* e a distribuição dos RNAs recuperados quanto à sua classificação ou quanto a parte específica de mRNAs ligados à proteína AGO2 das amostras com maior número de *clusters*. Por esta figura foi verificado que a maioria dos clusters (de 48% a 68%) são de sequências correspondentes à porção 3'UTR ou a região codificadora de mRNAs, como esperado para a proteína AGO2.

Adicionalmente, verificamos que para o miR-450a se conseguiu identificar 76 genes que continham a sequência completa da região *seed* deste miRNA e que não estavam presentes nas amostras da linhagem controle. Já para o miR-450b, este número foi de 242. Para ambos estes grupos de genes, a maioria das sequências deles recuperadas estavam na região codificadora (Figura 33).

Figura 32. Distribuição dos RNAs recuperados das linhagens A2780 quanto a sua classificação ou quanto a parte específica de mRNAs ligados à proteína AGO2. A: linhagem com vetor vazio; B: linhagem contendo o pri-miR-450a e C: linhagem contendo o pri-miR-450b.

Figura 33. Distribuição dos RNAs exclusivos das linhagens tratadas que continham a sequência completa da região *seed* de seus respectivos miRNAs. A: linhagem contendo o pri-miR-450a e B: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.11. Análise de expressão dos possíveis alvos

As tabelas 15 e 16 mostram algumas sequências de possíveis alvos dos *clusters* gerados para a linhagem A2780 após a superexpressão do miR-450a (Tabela 15) ou do miR-450b (Tabela 16). Nestas, os *clusters* possuem sequências complementares a sequência *seed* do respectivo miRNA superexpresso (regiões em negrito) e foram testados em relação a sua expressão nas linhagens controle e tratadas com os miRNAs do presente estudo:

- ou por serem exclusivos das linhagens tratadas;
- ou por serem encontrados em mais de uma das replicatas do PAR-CLIP;
- ou por estarem subexpressos nos dados de RNA-Seq,
- ou por serem preditos como alvo em algoritmos de predição.

Tabela 15. Possíveis alvos encontrados para o miR-450a.

Região de alinhamento	Gene	Sequência do <i>cluster</i>
codificadora	<i>ACO2</i>	AACATTAACATTGTT CGCAAAC
codificadora	<i>ATP5B</i>	ACTATGCGG CGCAAAC ATCTCCTTCGCCAAAA
5'UTR	<i>CITED2</i>	GTCTTCGGAGCAGAAAT CGCAAAA
codificadora	<i>MAML1</i>	CTCCATAT CGCAAAG GCAACCTCAT
codificadora	<i>MT-ND2</i>	CCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTTATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAAC CAAACCCAGCTA CGCAAAATCT
codificadora	<i>PAPSS1</i>	AATTTATTTAGGAACACGAATG CGCAA ACTT
3'UTR	<i>TIMMDC1</i>	TAAATAAAACATTT CGCAAAA
codificadora	<i>VIM</i>	GATGTTGACAATGCGTCTCTGGCACGTCTTGACCTGAAC CGCAAAG

Tabela 16. Possíveis alvos encontrados para o miR-450b.

Região de alinhamento	Gene	Sequência do cluster
3'UTR	ACVR2B	AAACCTAATGCTGCAAACTCTACCTAG
3'UTR	CAND1	ACATCTCCTAATGCTGTGCAAAACAT
3'UTR	CCND2	TGCAAAAGCAATGAAGCAAGGAATTGAAATAAGGAGGGACATG
codificadora	CRY1	TTCCCTGCAAAATATATCTAT
codificadora	HERPUD2	ATGGGCAAAATGCAAACTTGGAACTTGAA
3'UTR	ME1	ACTAAATGTGTTTACCTATGCAAAA
codificadora	MYH10	TCGGCCGAGACTATGTGCAAAAAG
3'UTR	PARN	AAATCGTGCAAAATCTACAACATG
codificadora	TOMM70A	CTCTCTTTAGACGTGCAAAAAG

A figura 34 mostra que para a linhagem A2780 após a superexpressão do miR-450a, todos os possíveis alvos testados foram subexpressos de forma estatisticamente significativa. Já na linhagem SKOV-3, somente o gene *VIM* foi subexpresso.

Para o miR-450b na linhagem A2780, somente os genes *ACVR2B* e *ME1* tiveram sua expressão diminuída de forma significativa após o tratamento com este miRNA. Para a linhagem SKOV-3, nenhum dos genes testados foi subexpresso na linhagem tratada com o miR-450b.

Figura 34. Análise da expressão por RT-PCR de genes candidatos a serem alvos dos miRNAs em estudo nas linhagens A2780 (gráficos da esquerda) e SKOV-3 (gráficos da direita). - linhagem com vetor vazio; + miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e + miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b. Como as mostras não são pareadas, o valor de ΔC_t de cada amostra foi subtraído da média do valor ΔC_t das 3 amostras controle analisadas para formar o valor de $\Delta\Delta C_t$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

4.12. Avaliação da expressão proteica dos possíveis alvos dos miRNAs em estudo: *ACO2*, *MAML1*, *ME1*, *PAPSS1* e *VIM* nas linhagens A2780 e SKOV-3

De acordo com a disponibilidade de anticorpos, foram determinados os genes a serem validados também por expressão proteica. Dessa forma, foram testados os genes *ACO2*, *PAPSS1*, *VIM*, *MAML1* e *ME1*. Destes, foram validados para o miR-450a nas linhagens A2780 e SKOV-3 os genes *PAPSS1* e *VIM*. Os genes *ACO2* e *MAML1* tiveram sua expressão proteica diminuída somente na linhagem A2780 (Figura 35). Já para o miR-450b, foi validado somente o gene *ME1* na linhagem A2780 (Figura 36).

Figura 35. Western blot para as amostras das linhagens A2780 e SKOV-3 após superexpressão do miR-450a. Figura acima e à esquerda: anticorpo anti-PAPSS1. Figura abaixo e à esquerda: anticorpo anti-VIM. Figura acima e à direita: anticorpo anti-ACO2. Figura abaixo e à direita: anticorpo anti-MAML1. LAMIN A/C: Anticorpo contra a proteína controle LAMIN A/C. - linhagem com vetor vazio, + miR-450a: linhagem contendo o pri-miR-450a.

Figura 36. Western blot para as amostras da linhagem A2780 após superexpressão do miR-450b. ME1: anticorpo anti-ME1. Anticorpo contra a proteína controle LAMIN A/C. - linhagem com vetor vazio, + miR-450b: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.13. Análise da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) nas linhagens A2780 e SKOV-3

A figura 37 mostra dados de RNA-Seq para alguns dos principais genes relacionados ao processo de EMT nas linhagens A2780 e SKOV-3. O miR-450a causou a inibição de genes relacionados à morfologia mesenquimal (*CDH2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TWIST1* e *ZEB1*) em ambas as linhagens e levou ao aumento da expressão do marcador de células epiteliais *CDH1* e ao mesmo tempo, do marcador de células mesenquimais *CDH2*.

O efeito da superexpressão do miR-450b causou inibição de alguns genes associados ao padrão mesenquimal, como o *CDH2*, *SNAI1* e *TWIST2*, mas o efeito sobre *CDH1* não foi correspondente nas linhagens A2780 e SKOV-3.

De forma geral, nas linhagens SKOV-3 a mudança na expressão de genes relacionados ao processo de EMT foi menos pronunciada do que na linhagem A2780, de acordo com a variação quantitativa da expressão dos genes.

Figura 37. Análise da expressão de alguns genes relacionados ao processo de EMT nas linhagens A2780 (gráficos da esquerda) e SKOV-3 (gráficos da direita). +pLVX: linhagem contendo o vetor vazio; +pLVX+miR- 450a: linhagem contendo o pri-miR-450a e +pLVX+miR- 450b: linhagem contendo o pri-miR-450b.

4.14. Análise de correlação da expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) com seus alvos validados

Os únicos genes validados cujos valores de correlação foram significativos, foram os alvos do miR-450a *ACO2* ($p < 0.01$, $r = -0.1567$) e *ATP5B* ($p < 0.05$, $r = -0.1215$) (Figura 38).

Figura. 38. Correlações negativas encontradas entre a expressão do miR-450a e de seus alvos *ACO2* (esquerda) e *ATP5B* (direita) em amostras de Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA).

5. DISCUSSÃO

Até o presente, poucos trabalhos citaram e raros abordaram especificamente sobre os miRNAs miR-450a ou miR-450b-5p. Todavia, aqueles que os mencionaram no contexto de cânceres ginecológicos, quase sempre em estudos de expressão de larga escala, estavam de acordo com nossa hipótese inicial de que se tratam de elementos supressores tumorais. O miR-450a foi subexpresso em tecidos de adenocarcinoma seroso endometrial (HIROKI et al., 2010), em tecidos tumorais de cérvix (WITTEN et al., 2010) e em tecidos de câncer de ovário seroso (JIA HONG, LI YAO, JIA-RUI ZHANG, PIN REN, SHU-MEI WANG, MIAO LAN, YAN-HONG LI, 2014) em relação às suas contrapartes normais. Para o miR-450b-5p, Häusler et al., (2010) verificou que este é subexpresso no sangue total de pacientes de câncer de ovário em comparação com o sangue de voluntários saudáveis.

5.1. Ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo* após a superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b

Os resultados da avaliação da morte celular após cultivo em placas de baixa aderência até o momento indicam que o miR-450a em geral atua diminuindo a viabilidade celular em condições de baixa aderência, com exceção para a linhagem C33. Como as células tumorais sobrevivem na ausência de adesão à matriz extracelular durante a travessia de um órgão para outro pela circulação sistêmica (KENIFIC; THORBURN; DEBNATH, 2010) e as placas que impedem a adesão celular mimetizam parcialmente tal

processo metastático (KUNJITHAPATHAM et al., 2014), pode-se sugerir que o miR-450a atua como um supressor tumoral que diminui a capacidade de metastatização para as linhagens SiHa, OVCAR-3, SKOV-3 e A2780 nessas condições.

A anexina V pode ser utilizada para detecção de morte celular por apoptose (ELMORE, 2007). Os outros tipos de morte celular clássicos são a necrose e a autofagia (EDINGER; THOMPSON, 2004). Parte das células que perderam a viabilidade por ausência de adesão ao fundo das placas possuía somente membrana rompida, dessa forma, na metodologia utilizada não foi possível identificar qual foi o mecanismo que levou à morte celular nestas linhagens.

Inesperadamente, a superexpressão do miR-450a na linhagem A2780 levou a um aumento da proliferação das células, porém o número de células capazes de gerarem colônias foi menor. Esta aparente contradição é explicada pela diferença de tamanho entre as colônias geradas, sendo as da A2780^{+pLVX+miR-450a} muito maiores se comparadas a aquelas da linhagem controle. Como uma observação adicional, foi verificado que as células da A2780^{+pLVX+miR-450a} se dividiam de forma em que não se destacavam da colônia primária de células, não ficando livres no sobrenadante, diferentemente das linhagens A2780^{+pLVX+miR-450b} e A2780^{+pLVX}. Em 2004, VASILIEV et al demonstraram que a superexpressão de RhoA, proteína associada com a dinâmica do citoesqueleto, aumentava o destacamento das células tumorais da massa primária de células. Tal destacamento é correlacionado com a divisão celular, quando há um plano alterado da citocinese. O destacamento das células de uma colônia, seguido por

dispersão passiva através do meio ou circulação pode servir para recolonizar um sítio distante e, desta forma, é também um tipo de disseminação de células tumorais, diferente da migração e invasão (VASILIEV et al., 2004). Foi verificado ainda pelos dados de expressão global que houve diminuição da expressão de RhoA na A2780^{+pLVX+miR-450a} em relação a A2780^{+pLVX} (dados não mostrados). Portanto, apesar da taxa de proliferação ter sido aumentada, a dispersão das células geradas em uma colônia foi diminuída, o que ainda caracterizaria o miR-450a como um supressor tumoral na linhagem A2780.

Na outra linhagem tumoral de ovário, SKOV-3, o miR-450b diminuiu a taxa de proliferação e a taxa de clonogenicidade das células. Porém, neste caso, o tamanho das colônias aparentemente não sofreu mudanças.

Em geral o miR-450a inibiu capacidade de migrar das linhagens estudadas, com exceção das linhagens C33 (em que o miR-450a causou efeito contrário) e OVCAR-3. Já o miR-450b inibiu a taxa de migração somente nas linhagens tumorais de ovário A2780 e SKOV-3, tendo o efeito oposto na linhagem tumoral de colo de útero C33.

Nas linhagens derivadas de tumor cervical, o miR-450b diminui a taxa de invasão somente na SiHa. Este miRNA também inibiu a capacidade de invadir das linhagens de ovário A2780 e SKOV-3. Nestas mesmas linhagens o miR-450a teve o mesmo efeito neste ensaio. Em contraste, o miR-450a aumentou a taxa de invasão da linhagem de ovário OVCAR-3.

De forma semelhante para A2780 e SKOV-3, o nível de inibição de ambos os processos (migração e invasão) foi maior após a superexpressão do miR-450a do que o do miR-450b. JIA et al (2015) verificaram que o miR-

450a inibiu a invasão da linhagem SKOV-3. Porém, os autores não analisaram os possíveis alvos do miR-450a.

A principal diferença conhecida entre as linhagens de tumor cervical analisadas SiHa e C33 é a presença do papiloma vírus humano 16 (HPV-16) na primeira. Já para as linhagens de tumor de ovário, a OVCAR-3 e SKOV-3 são derivadas de adenocarcinoma e a A2780, de carcinoma de ovário. Como estas diferenças afetam especificamente a função dos miRNAs estudados é desconhecida, mas provavelmente elas afetam o contexto celular no qual determinado estes miRNAs estão inseridos.

O fato de um mesmo miRNA ter efeito de supressor tumoral e de oncogene pode depender de seu contexto celular (PRISLEI et al., 2013). Um dos modos que o contexto celular exerce seu efeito na regulação de miRNAs é por meio da expressão diferencial de proteínas de ligação do mRNA, que aumentam ou diminuem a eficácia dos sítios de ligação dos miRNAs (NAM et al., 2014).

PRISLEI et al., 2013 verificaram que a família do miR-200 tinha efeitos contraditórios dentro do contexto do câncer de ovário segundo a literatura. Eles demonstraram que estes efeitos opostos também ocorriam em duas linhagens de tumor de ovário diferentes e que o miR-200c inibia ou estimulava a tradução do mRNA de TUBB3. Tais efeitos foram explicados pela presença ou ausência de ligação da proteína de ligação do mRNA HuR. Quando esta proteína ficava confinada no núcleo (modelo de uma das linhagens), o miR-200c atuava diminuindo a expressão do TUBB3 e exercia papel de supressor tumoral. Consequentemente, estava correlacionado com um melhor prognóstico. Já quando a HuR se encontrava no citoplasma

(modelo encontrado na outra linhagem), este se ligava com o complexo miR-200c-RISC no mRNA de TUBB3 e aumentava sua estabilidade, fazendo que o miR-200c tivesse papel de oncogene e, desta forma, levasse a um pior prognóstico.

Uma outra maneira que o contexto celular pode influenciar no efeito dos miRNAs é por meio das isoformas contendo sítios 3'UTR alternativos gerados pela poliadenilação e clivagem alternativa. Tais sítios 3'UTR alternativos contem também sítios alternativos de ligação de miRNAs (NAM et al., 2014).

O ensaio *in vivo* realizado com camungongos imunodeficientes corroboraram os resultados *in vitro* com as linhagens tumorais de ovário A2780 e SKOV-3. No que diz respeito ao ensaio de *anoikis* para o miR-450a, que reduziu a viabilidade das células quando estas não poderiam aderir à placa, a injeção de células livres na cavidade peritoneal deve ter sido reduzida após determinado tempo. No que diz respeito à capacidade de migração, ambos os miRNAs devem ter diminuído a habilidade das células tumorais de migrarem ativamente para outros órgãos da cavidade peritoneal e de se estabelecerem nesses locais, neste caso devido a menor competência de invasão.

5.2. Análise de correlação de expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p nos tecidos de Carcinoma de Células Escamosas de Colo de Útero e Cistoadenocarcinoma Seroso de Ovário com dados clínico-patológicos obtidos do The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Corroborando nossos resultados de não termos encontrado associações de dados clínico-patológicos com a expressão dos miRNAs estudados em cistoadenocarcinoma seroso de ovário, (JIA HONG, LI YAO, JIA-RUI ZHANG, PIN REN, SHU-MEI WANG, MIAO LAN, YAN-HONG LI, 2014) também não encontraram associação entre a expressão do miR-450a características clínico-patológicas no mesmo tipo de tumor.

Sugerimos que a correlação encontrada entre menor expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p em carcinoma de células escamosas de colo de útero e idade dos pacientes maior ou igual a 50 anos possa estar associada às alterações da metilação do DNA que ocorre em tecidos tumorais e durante o envelhecimento. Tais alterações referem-se à hipometilação global e hipermetilação de ilhas CpG, que também são acumuladas durante o envelhecimento (FRAGA; AGRELO; ESTELLER, 2007). Os miRNAs miR-450a e miR-450b estão próximos a ilhas CpG, sendo que o miR-450a foi demonstrado ser regulado por metilação (FORMOSA et al., 2013). Esta proximidade poderia fazer que estes miRNAs sejam regulados por metilação e, conseqüentemente, silenciados ou menos expressos durante o envelhecimento ou estabelecimento do câncer.

5.3. Análises referentes ao RNA-Seq

Na análise de componente principal (PCA) foi observado que os miRNAs miR-450a e miR-450b causaram maior variação no transcriptoma da linhagem A2780. Este resultado corrobora com os dados funcionais obtidos, pois a linhagem A2780 foi aquela a qual os miRNAs em estudo causaram maior efeito funcional em termos quantitativos.

As integrinas são proteínas receptoras da matriz extracelular (HYNES; ZHAO, 2000) e fornecem a tração necessária para a motilidade celular (migração e invasão). São, portanto, envolvidas com a iniciação, progressão e metástase tumoral (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). Dessa forma, os genes relacionados a essa via serem os mais afetados pelos miRNAs em estudo na linhagem A2780, corroboram os resultados dos ensaios de migração e invasão com esta mesma linhagem.

5.5. Análise de expressão do mRNA e proteína dos possíveis alvos

Os dados do PAR-CLIP aqui obtidos corroboram que os miRNAs reconhecem seu mRNA alvo não só na região 3'UTR (BRÜMMER; HAUSSER, 2014; LYTLE; YARIO; STEITZ, 2007; XU et al., 2014). Desse modo, muitos dos alvos aqui validados são reconhecidos na região codificadora (éxons) ou na região 5'UTR.

Foi verificado que a maioria dos alvos preditos para o miR-450a e miR-450b na linhagem A2780 a partir dos dados do RNA-Seq e PAR-CLIP foram validados. Porém, o mesmo não ocorreu para a linhagem SKOV-3, embora

ambas as linhagens se comportem de forma parecida quando tratadas com os miRNAs em estudo nos ensaios de migração, invasão e anoikis.

Uma das explicações proposta para este acontecimento é o fato de miRNAs poderem agir diretamente ou indiretamente, sendo que nesse último caso eles regulam fatores de transcrição que controlam outros genes (ZHANG et al., 2015), o que poderia complicar as análises de expressão. Tais análises foram a única forma de testar a linhagem SKOV-3, dado que as amostras de PAR-CLIP para a mesma não geraram um número de *clusters* suficiente para análise direta dos alvos. Além disso, genes envolvidos em processos biológicos importantes frequentemente são redundantes, ou seja, a deleção de um deles muitas vezes não causa efeito, pois há outros genes ativos que realizam funções semelhantes em uma mesma via (WAGNER, 2005). Isto nos leva a especular que talvez as linhagens A2780 e SKOV-3 possuam diferentes genes redundantes ativos, pelo menos aqueles controlados de alguma forma pelos miRNAs miR-450a ou miR-450b.

Tendo em vista que, excetuando-se o *ACVRB2*, todos os genes validados pelo menos quanto à expressão de RNA estavam exclusivamente nos *clusters* de PAR-CLIP das linhagens tratadas com os miRNAs miR-450a ou miR-450b e não na linhagem controle, pode-se dizer que se conseguiu detectar alvos diretos destes miRNAs. Além disso, o fato de que a maioria deles esteja envolvida em um mesmo processo, a do metabolismo energético (*ACO2*, *ATP5B*, *MT-ND2*, *TIMMDC1* e *ME1*), corrobora esta afirmação.

No artigo seminal de Hanahan e Weinberg (HANAHAN; WEINBERG, 2011) foi incluído como uma das características das células tumorais a reprogramação do metabolismo energético. As células tumorais ativamente

se dividem e necessitam de mais glicose para gerar energia. Dessa forma, mesmo em condições normais de oxigênio as células tumorais tendem a desviar o piruvato produzido na glicólise para a produção de ácido láctico em vez de quebrá-lo completamente para a geração de dióxido de carbono. Este fenômeno, também conhecido como glicólise aeróbica, é chamado de efeito Warburg, depois que Otto Warburg primeiro o observou (WALLACE, 2012).

Porém, mesmo tendo sido observado este efeito geral, muitos tipos de cânceres mantêm uma elevada taxa de fosforilação oxidativa (WALLACE, 2012). De fato, as células tumorais podem não só necessitar de mais glicose como podem ser “viciadas em glutamina”, que é o aminoácido livre mais abundante encontrado no sangue (WALLACE, 2012; YANG et al., 2014). Assim, o aumento da taxa de glutaminólise, o catabolismo da glutamina, também é uma característica do metabolismo de células tumorais (DAYE; WELLEN, 2012). Na glutaminólise, subprodutos da glutamina também não são completamente oxidados para a produção de ATP, mas sim podem voltar para o ciclo do ácido cítrico a para produção de lipídeos e aminoácidos, importantes para a replicação celular (DAYE; WELLEN, 2012; LI et al., 2016).

O gene *ME1*, o alvo validado para o miR-450b na linhagem A2780, produz a enzima málica, que transforma o malato em piruvato e NADPH; e o gene *ACO2*, alvo validado para o miR-450a na mesma linhagem, que produz a proteína mitocondrial aconitase 2, que por sua vez transforma o citrato em isocitrato e participa do ciclo do ácido cítrico, são genes envolvidos no processo de glutaminólise (LI et al., 2016). Yang e colaboradores (YANG et al., 2014) verificaram que células de câncer de ovário altamente invasivas possuem maior taxa de glutaminólise do que células menos invasivas, mais

dependentes da glicose e, portanto, do processo de glicólise. O mesmo grupo constatou, a partir dos dados de câncer de ovário do TCGA, que a alta expressão de genes associados ao ciclo do ácido cítrico, como o *ACO2*, está correlacionada à menor sobrevida de pacientes.

O gene *ACO2* é ativado pelo proto-oncogene *Myc* e especificamente em câncer de próstata tem sua expressão inibida pelo gene *p53* (TSUI et al., 2011) e ativada em condições de hipóxia por meio do *HIF1A* (TSUI et al., 2013). No presente trabalho verificamos a correlação negativa da expressão do miR-450a com a expressão do gene *ACO2*, o que corrobora a atuação deste miRNA como um supressor tumoral no câncer de ovário e *ACO2* como seu alvo direto.

O gene *ME1* também tem sua expressão inibida pelo *p53* (JIANG et al., 2013) e sua inibição leva a uma menor tumorigenicidade em câncer colorretal com mutações no genes *KRAS* (SHEN et al., 2017).

Outros alvos validados para o miR-450a na linhagem A2780, os genes *TIMMDC1* e *MT-ND2* produzem proteínas mitocondriais que atuam no complexo I da cadeia transportadora de elétrons, sendo a primeira uma proteína que participa da montagem deste complexo (GUARANI et al., 2014) e a última uma enzima do complexo I (ZANOLINI et al., 2017). O gene *TIMMDC1*, ainda pouco estudado, quando inibido diminui a capacidade de proliferação e migração e, ainda, a viabilidade, potencial de membrana e atividade da ATPase da mitocôndria de uma linhagem tumoral de carcinoma de pulmão (WU; WANG; XU, 2014). Para o gene *MT-ND2* foi verificado que um tipo de polimorfismo nele encontrado diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GUSDON; VOTYAKOVA; MATHEWS, 2008).

ROS são produzidos em maior quantidade em células tumorais e podem ativar vias que alteram a proliferação, metabolismo e angiogênese (SULLIVAN; CHANDEL, 2014). Assim, a inibição desta enzima parece estar de acordo a diminuição da tumorigenicidade.

Outro alvo encontrado para o miR-450a, o gene *ATP5B* produz uma enzima mitocondrial, a subunidade β da porção catalítica da enzima ATP sintase. A inibição deste gene foi associada à redução da proliferação, invasão e metástase em uma linhagem de câncer de próstata (LI et al., 2017), além de ser associado com menor taxa de sobrevida livre em amostras de câncer seroso de ovário de estágio avançado (HJERPE et al., 2013). Como para o gene *ACO2*, esses dados estão de acordo com o que se observou neste nos dados de câncer de ovário do TCGA: que houve uma correlação negativa entre a expressão do miR-450a, um miRNA supressor tumoral, e do mRNA do gene *ATP5B*.

Enquanto a explicação do aumento da taxa de glutaminólise parece explicar o aparente efeito de oncogenes para os genes *ACO2* e *ME1*, para os genes *TIMMDC1*, *MT-ND2* e *ATP5B* a aparente explicação para a inibição destes genes poder causar um efeito supressor tumoral seria a de que a eles estariam produzindo, além de mais energia na forma de ATP para as células tumorais sobreviverem, estariam produzindo mais ROS que, como já citado, podem ter um efeito de tumorigênico.

O gene *PAPSS1*, que foi validado como alvo do miR-450a nas linhagens A2780 e SKOV-3 quanto à expressão de mRNA e proteína, participa do metabolismo do sulfato é superexpresso em vários tipos de cânceres, incluindo o de ovário (ZHANG et al., 2014). Além disso, foi

verificado que a inibição deste gene leva à maior sensibilidade à cisplatina nas linhagens A2780 e SKOV-3, efeito que pode estar associado à sua participação na sulfonação de endo e xenobióticos (LEUNG; BACKSTROM; BALLY, 2016).

O gene *CITED2*, validado como alvo do miR-450a na linhagem A2780, participa de vários processos durante o desenvolvimento e diferenciação e leva ao aumento da taxa de proliferação, migração e resistência a quimioterápicos em carcinoma de mama (MINEMURA et al., 2016). Além disso, de acordo com dados do TCGA encontrados na base de dados “*The human protein atlas*” (“Expression of CITED2 in ovarian cancer - The Human Protein Atlas”, [s.d.]), a elevada expressão deste gene está associada à menor taxa de sobrevida de pacientes de câncer de ovário ($p = 0,0111$), o que vai ao encontro dos resultados aqui obtidos.

O gene *MAML1*, também validado como alvo do miR-450a na linhagem A2780, é um corregulador da transcrição de ativadores em diferentes vias, como as do Notch, p53 e beta-catenina (HANSSON et al., 2012). Hashemi e colaboradores (HASHEMI BIDOKHTI et al., 2017) verificaram que este gene foi superexpresso na maioria das amostras de carcinoma de células escamosas do esôfago quando comparado a amostras normais da margem do tumor, além de indicar um pior prognóstico. As mesmas conclusões foram tiradas em relação a este gene no carcinoma hepatocelular (WANG et al., 2016). Dessa forma, os dados obtidos no presente projeto também parecem corroborar os dados da literatura em relação aos efeitos de sua inibição como sendo associadas a uma menor tumorigenicidade.

5.4. Análise da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) nas linhagens A2780 e SKOV-3

O programa de desenvolvimento conhecido como transição epitélio-mesênquima (EMT) é um dos processos centrais que promovem a metástase de carcinomas derivados de células epiteliais (YE; WEINBERG, 2015).

Pela análise do RNA-Seq e de RT-qPCR de alguns dos marcadores do EMT foi observado que o miR-450a levou à diminuição da expressão de genes, em sua maioria, associados à morfologia mesenquimal das células, como o *VIM*, *TGFB1*, *TGFB2*, *SNAI1* e *ZEB2* (ELLOUL et al., 2010; KIM et al., 2011). Para ambos os miRNAs, menos genes associados ao fenótipo mesenquimal foram inibidos na linhagem A2780, possivelmente este efeito está relacionado à origem das linhagens utilizadas.

A linhagem A2780 tem morfologia epitelial e é derivada de células tumorais que estavam ainda no ovário, já a linhagem SKOV-3 tem morfologia mais próxima a de células mesenquimais, sendo fusiforme e derivada de um sítio metastático. Assim, se ambos os miRNAs tem o efeito de diminuir a capacidade metastática, a linhagem SKOV-3, mais mesenquimal, possui mais genes envolvidos no processo de EMT “para serem inibidos”. Além disso, o efeito sobre tais genes foi menor se comparados a A2780 se forem observados os valores de *fold change*.

Para o miR-450a, em ambas as linhagens o gene *CDH1* teve sua expressão elevada, e *VIM*, diminuída, condizente com um fenótipo mais epitelial. O gene *VIM* foi além de ser inibido, foi também validado como alvo

direto do miR-450a nas linhagens A2780 e SKOV-3 no presente trabalho. Tal gene codifica uma proteína do citoesqueleto do grupo dos filamentos intermediários do tipo III, sendo considerado o marcador canônico do processo de EMT, superexpresso em cânceres de diferentes órgãos e também importante para a formação de complexos com diferentes moléculas de sinalização da célula (SATELLI; LI, 2011). Em carcinoma de ovário, a expressão de *VIM* está aumentada em metástases sólidas se comparada a carcinomas primários e efusões, o que parece estar de acordo com nossos resultados obtidos (ELLOUL et al., 2010).

Em ambas as linhagens também houve o aumento do marcador de células mesenquimais *CDH2* após superexpressão do miR-450a. Tal aparente paradoxo poderia ser derivado do mecanismo não usual de progressão tumoral do carcinoma de ovário comparado a outros cânceres. As células epiteliais da superfície do ovário normalmente expressam marcadores mesenquimais, e sofrem o processo de EMT após a ovulação, como um processo de reparo após a quebra do epitélio durante a ovulação (AHMED; THOMPSON; QUINN, 2007) e não mesmo durante a fase metastática, as células não são totalmente comprometidas com o fenótipo epitelial ou mesenquimal (DAVIDSON; TROPÉ; REICH, 2012; ELLLOUL et al., 2010).

O efeito da superexpressão do miR-450b causou inibição de alguns genes associados ao padrão mesenquimal, como o *CDH2*, *SNAI1* e *TWIST2* em ambas as linhagens A2780 e SKOV-3, porém não elevou a expressão de nenhum dos genes analisados em comum.

6. CONCLUSÕES

- O miR-450a e miR-450b-5p apresentaram menor expressão nas linhagens avaliadas de tumores de ovário e colo do útero em relação a tecidos correspondentes normais;
- O miR-450a leva à perda de viabilidade em condições de baixa aderência nas linhagens tumorais de ovário A2780, OVCAR-3 e SKOV-3; além da linhagem tumoral de colo de útero SiHa;
- O miR-450a diminuiu a clonogenicidade da linhagem A2780;
- O miR-450b diminuiu a clonogenicidade da linhagem SKOV-3;
- O miR-450a aumentou a taxa de proliferação da linhagem A2780;
- O miR-450b diminuiu a taxa de proliferação da linhagem SKOV-3;
- O miR-450a e o miR-450b diminuíram a taxa de migração das linhagens SiHa, A2780 e SKOV-3;
- O miR-450a e o miR-450b aumentaram a taxa de migração na linhagem tumoral de colo de útero C33;
- O miR-450a diminuiu a taxa de invasão das linhagens A2780 e SKOV-3;
- O miR-450b diminuiu a taxa de invasão das linhagens SiHa, A2780 e SKOV-3;
- O miR-450a aumentou a taxa de invasão da linhagem tumoral de ovário OVCAR-3;
- A menor expressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p em carcinoma de células escamosas de colo de útero foi correlacionada à

maior idade dos pacientes a partir dos 50 anos e ao *status* de pré-menopausa;

- Ambos os miRNAs do presente estudo diminuíram o crescimento de tumores da linhagem A2780 em um modelo xenográfico de câncer de ovário;
- A maioria das vias enriquecidas dos genes subexpressos após superexpressão dos miRNAs em estudo estão relacionadas a interação entre célula e matriz extracelular ou diretamente relacionadas com o remodelamento do citoesqueleto de actina;
- Foram validados como alvos diretos do miR-450a genes em sua maioria associados ao metabolismo energético mitocondrial (*TIMMDC1*, *ACO2*, *ATP5B*), além da *VIM*, *PAPSS1*, *CITED2* e *MAML1*;
- Foi validado como alvo direto do miR-450b o gene *ME1*, também associados ao metabolismo energético;
- Houve correlações negativas entre a expressão do miR-450a e *ACO2* ou *ATP5B* em amostras de cistoadenocarcinoma seroso de ovário;
- O miR-450a inibiu de forma direta o gene *VIM* e de forma indireta e outros genes associados à morfologia mesenquimal *TGFB1*, *TGFB2*, *SNAI1* e *ZEB2* de forma indireta nas linhagens A2780 e SKOV-3;
- As funções miR-450a e miR-450b-5p são relevantes e levam a fenótipos mais homogêneos (supressão tumoral) no processo tumorigênico das linhagens tumorais epiteliais de ovário A2780 e SKOV-3;

- Os poucos dados da literatura referentes à expressão desses miRNAs em tumores ginecológicos e os dados aqui apresentados corroboram nossa hipótese inicial de que os mesmos poderiam atuar como supressores tumorais em determinado tipo de tecido relacionado à reprodução;
- O conhecimento do mecanismo de ação de ambos os miRNAs aqui estudados pode ser útil para o desenvolvimento de alvos para o tratamento, diagnóstico e prognóstico do câncer de ovário.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABDALLAH, B. et al. Ovarian cancer evolution through stochastic genome alterations: defining the genomic role in ovarian cancer. **Syst Biol Reprod Med**, v. 6368, n. 1, p. 1–12, 2013.
- ABRÂMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. [s.d.].
- AHMED, N.; THOMPSON, E. W.; QUINN, M. A. Epithelial–mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: An exception to the norm. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 3, p. 581–588, dez. 2007.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 31, n. 2, p. 166–9, 15 jan. 2015.
- ANDERS JACOBSEN. **cgdsr: R-Based API for Accessing the MSKCC Cancer Genomics Data Server (CGDS) version 1.2.6 from CRAN**, [s.d.]. Disponível em: <<https://rdrr.io/cran/cgdsr/>>. Acesso em: 2 out. 2017
- Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data**. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 7 mar. 2017.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BENHALEVY, D. et al. PAR-CLIP and streamlined small RNA cDNA library preparation protocol for the identification of RNA binding protein target sites. **Methods**, 18 nov. 2016.
- BHATT, P. et al. Role of antibodies in diagnosis and treatment of ovarian cancer: Basic approach and clinical status. **Journal of Controlled Release**, v. 226, p. 148–167, 2016.
- BRÜMMER, A.; HAUSSE, J. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. **BioEssays**, v. 36, n. 6, p. 617–626, 1 jun. 2014.
- CANNISTRA, S. A. Cancer of the Ovary. **N Engl J Med**, v. 35124351, p. 2519–29, 2004.
- CERAMI, E. G. et al. Pathway Commons, a web resource for biological pathway data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database, p. D685–D690, 1 jan. 2011.
- CHO, A.; HOWELL, V. M.; COLVIN, E. K. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer - A Piece of a Puzzle. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 245, 2015.
- CORCORAN, D. L. et al. PARalyzer: definition of RNA binding sites from PAR-CLIP short-read sequence data. **Genome Biology**, v. 12, n. 8, p. R79, 18 ago. 2011.
- COSTA, F. F. Non-coding RNAs: Meet thy masters. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 32, n. 7, p. 599–608, jul. 2010.
- CROCE, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 10, p. 704–714, out. 2009.
- DAVIDSON, B.; TROPÉ, C. G.; REICH, R. Epithelial–Mesenchymal Transition in Ovarian Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 33, 2012.
- DAYE, D.; WELLEN, K. E. Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 4, p. 362–369, jun. 2012.
- DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9–22, jan. 2010.
- DUDOIT, S. et al. STATISTICAL METHODS FOR IDENTIFYING DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN REPLICATED cDNA MICROARRAY EXPERIMENTS. **Statistica Sinica**, v. 12, p. 111–139, 2002.
- DUTTA, D. K.; DUTTA, I. Origin of ovarian cancer: molecular profiling. **Journal of obstetrics and gynaecology of India**, v. 63, n. 3, p. 152–7, jun. 2013.
- EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 663–669, dez. 2004.
- ELLOUL, S. et al. Mesenchymal-to-epithelial transition determinants as characteristics of ovarian carcinoma effusions. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 27, n. 3, p. 161–172, 7 mar. 2010.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

ERHARD, F. et al. PARma: identification of microRNA target sites in AGO-PAR-CLIP data. **Genome biology**, v. 14, n. 7, p. R79, 29 jul. 2013.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 186–94, mar. 1998.

Expression of CITED2 in ovarian cancer - The Human Protein Atlas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164442-CITED2/pathology/tissue/ovarian+cancer>>. Acesso em: 2 out. 2017.

FANT, M. et al. PLAC1 (Placenta-specific 1): a novel , X-linked gene with roles in reproductive and cancer biology. n. May, p. 497–502, 2010.

FARAZI, T. A. et al. MicroRNAs in Human Cancer. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]. v. 774p. 1–20.

FEKI, A. et al. Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: Discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 72, n. 1, p. 1–9, 2009.

FORMOSA, A. et al. DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 1, p. 127–34, 3 jan. 2013.

FORREST, A. R. R. et al. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. **Leukemia**, v. 24, n. 2, p. 460–466, 3 fev. 2010.

FRAGA, M. F.; AGRELO, R.; ESTELLER, M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 60–74, 1 abr. 2007.

GIBB, E. A.; BROWN, C. J.; LAM, W. L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 38, 13 abr. 2011.

GUARANI, V. et al. TIMMDC1/C3orf1 functions as a membrane-embedded mitochondrial complex I assembly factor through association with the MCIA complex. **Molecular and cellular biology**, v. 34, n. 5, p. 847–61, 1 mar. 2014.

GUSDON, A. M.; VOTYAKOVA, T. V.; MATHEWS, C. E. mt-Nd2a suppresses reactive oxygen species production by mitochondrial complexes I and III. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 16, p. 10690–7, 18 abr. 2008.

HAFNER, M. et al. Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 129–141, 2 abr. 2010.

HAFNER, M. et al. Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 58, n. 2, p. 94–105, out. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HANSEN, J. M.; COLEMAN, R. L.; SOOD, A. K. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. **European Journal of Cancer**, v. 56, p. 131–143, mar. 2016.

HANSSON, M. L. et al. MAML1 Acts Cooperatively with EGR1 to Activate EGR1-Regulated Promoters: Implications for Nephrogenesis and the Development of Renal Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46001, 27 set. 2012.

HASHEMI BIDOKHTI, M. et al. Contribution of MAML1 in esophageal squamous cell carcinoma tumorigenesis. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 27, p. 79–82, abr. 2017.

HAUPTMANN, J. et al. Biochemical isolation of Argonaute protein complexes by Ago-APP. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. 11841–11845, 22 set. 2015.

HÄUSLER, S. F. M. et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. **British journal of cancer**, v. 103, n. 5, p. 693–700, 24 ago. 2010.

HIROKI, E. et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. **Cancer Science**, v. 101, n. 1, p. 241–249, jan. 2010.

HJERPE, E. et al. Metabolic markers GAPDH, PKM2, ATP5B and BEC-index in advanced serous ovarian cancer. **BMC clinical pathology**, v. 13, n. 1, p. 30, 19 nov. 2013.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, fev. 2011.

HUSSAIN, M. U. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 405–413, 24 ago. 2012.

HYNES, R. O.; ZHAO, Q. The evolution of cell adhesion. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 2, p. F89-96, 24 jul. 2000.

JALALI, S. et al. Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e53823, 6 fev. 2013.

JIA, H. et al. The effect of miR - 450a - 5p on the biological behavior of serous ovarian cancer SKOV3 cells. **Journal of Modern Oncology**, n. 7, p. 892–896, 2015.

JIA HONG, LI YAO, JIA-RUI ZHANG, PIN REN, SHU-MEI WANG, MIAO LAN, YAN-HONG LI, W. Z. The Expression and Clinical Significance of miR-450a-5p in Serous Ovarian Cancer- - 《Progress in Modern Biomedicine》 2014年17期. **Progress in Modern Biomedicine**, v. 14, n. 17, p. 3240–3243, 2014.

JIANG, P. et al. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. **Nature**, v. 493, n. 7434, p. 689–93, 31 jan. 2013.

JIN, Y. et al. miR-450b-5p Suppresses Stemness and the Development of Chemoresistance by Targeting SOX2 in Colorectal Cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 35, n. 5, p. 249–256, maio 2016.

JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Publishing Group**, v. 16, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–8, jun. 2009.

KANEHISA, M. et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D457–D462, 4 jan. 2016.

KENIFIC, C. M.; THORBURN, A.; DEBNATH, J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 241–245, abr. 2010.

KENT, W. J. BLAT--the BLAST-like alignment tool. **Genome research**, v. 12, n. 4, p. 656–64, abr. 2002.

KERTESZ, M. et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition. **Nature Genetics**, v. 39, n. 10, p. 1278–1284, 23 out. 2007.

KIM, D. et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome biology**, v. 14, n. 4, p. R36, 25 abr. 2013.

KIM, T. et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 5, p. 875–83, 9 maio 2011.

KOUTSAKI, M.; SPANDIDOS, D. A.; ZARAVINOS, A. Epithelial–mesenchymal transition-associated miRNAs in ovarian carcinoma, with highlight on the miR-200 family: Prognostic value and prospective role in ovarian cancer therapeutics. **Cancer Letters**, v. 351, n. 2, p. 173–181, 2014.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D68-73, jan. 2014.

KUNJITHAPATHAM, R. et al. Reversal of anchorage-independent multicellular spheroid into a monolayer mimics a metastatic model. **Scientific reports**, v. 4, p. 6816, 29 out. 2014.

KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **The American journal of surgical pathology**, v. 34, n. 3, p. 433–43, mar. 2010.

LAGES, E. et al. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 17, p. 2508–40, 1 jun. 2012.

LALWANI, N.; FASIH, N. Histologic , Molecular , and Cytogenetic Features of Ovarian Cancers : Implications for Diagnosis and Treatment 1. 2011.

LAN, H. et al. miR-140-5p inhibits ovarian cancer growth partially by repression of PDGFRA. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, p. 117–122, out. 2015.

LENGYEL, E. et al. Epithelial ovarian cancer experimental models. **Oncogene**, v. 33, n. 28, p. 3619–3633, 10 jul. 2014.

LEUNG, A. W. Y.; BACKSTROM, I.; BALLY, M. B. Sulfonation, an underexploited area: from skeletal development to infectious diseases and cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55811–55827, 23 ago. 2016.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, 14 jan. 2005.

LI, C. et al. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. **World journal of surgical oncology**, v. 14, n. 1, p. 15, 20 jan. 2016.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16,

p. 2078–2079, 15 ago. 2009.

LI, S.-D. et al. The role of microRNAs in ovarian cancer initiation and progression. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 9, p. 2240–2249, 2010.

LI, W. et al. Ectopic expression of the ATP synthase β subunit on the membrane of PC-3M cells supports its potential role in prostate cancer metastasis. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 4, p. 1312–1320, abr. 2017.

LIU, Q. et al. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 16, p. 5391–404, 1 set. 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LONG, X. H. et al. Tumor suppressive microRNA-424 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via targeting fatty acid synthase. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 5, n. 4, p. 1048–1052, 18 abr. 2013.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LYTLE, J. R.; YARIO, T. A.; STEITZ, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 23, p. 9667–72, 5 jun. 2007.

MARAGKAKIS, M. et al. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 295, 18 set. 2009.

MINEMURA, H. et al. CITED2 in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with proliferation, migration and chemoresistance. **Cancer science**, v. 107, n. 12, p. 1898–1908, dez. 2016.

MIRANDA, K. C. et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1203–17, 22 set. 2006.

MUYS, B. R. et al. Placenta-enriched lincRNAs MIR503HG and LINC00629 decrease migration and invasion potential of JEG-3 cell line. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.

NAM, J.-W. et al. Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. **Molecular cell**, v. 53, n. 6, p. 1031–43, 20 mar. 2014.

NANA-SINKAM, S. P.; CROCE, C. M. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 1, p. 98–104, 5 jan. 2013.

NEZHAT, F. R. et al. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 3, p. 262–267, set. 2015.

OTTEVANGER, P. B. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. **Seminars in Cancer Biology**, v. 44, p. 67–71, jun. 2017.

PALLASCH, C. P. et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3255–64, 8 out. 2009.

PONTING, C. P.; BELGARD, T. G. Transcribed dark matter: meaning or myth? **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R2, p. R162–R168, 15 out. 2010.

PRADEEP, S. et al. Hematogenous Metastasis of Ovarian Cancer: Rethinking Mode of Spread. **Cancer Cell**, v. 26, n. 1, p. 77–91, 14 jul. 2014.

PRAHM, K. P. et al. Current status on microRNAs as biomarkers for ovarian cancer. **Apmis**, v. 124, n. 5, p. 337–355, 2016.

PRISLEI, S. et al. MiR-200c and HuR in ovarian cancer. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, p. 72, 8 fev. 2013.

R: The R Project for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 2 out. 2017a.

R: The R Project for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 7 mar. 2017b.

RAMALINGAM, P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 30, n. 2, p. 166–76, fev. 2016.

SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 18, p. 3033–46, set. 2011.

SCHOLLER, N.; URBAN, N. CA125 in ovarian cancer. **Biomarkers in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 513–523, dez. 2007.

SHALOM-FEUERSTEIN, R. et al. Pluripotent Stem Cell Model Reveals Essential Roles for

miR-450b-5p and miR-184 in Embryonic Corneal Lineage Specification. **STEM CELLS**, v. 30, n. 5, p. 898–909, maio 2012.

SHEN, H. et al. MicroRNA-30a attenuates mutant KRAS-driven colorectal tumorigenesis via direct suppression of ME1. **Cell death and differentiation**, v. 24, n. 7, p. 1253–1262, 5 jul. 2017.

SULLIVAN, L. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. **Cancer & metabolism**, v. 2, p. 17, 2014.

SUN, M. M. et al. TGF- β 1 suppression of microRNA-450b-5p expression: a novel mechanism for blocking myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma. **Oncogene**, v. 33, n. 16, p. 2075–2086, 17 abr. 2014.

SVOBODA, M. et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. **Radiation oncology (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 195, 20 nov. 2012.

TAN, D. S.; AGARWAL, R.; KAYE, S. B. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 11, p. 925–934, nov. 2006.

TSUI, K.-H. et al. p53 downregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in human prostate carcinoma cells. **The Prostate**, v. 71, n. 1, p. 62–70, 1 jan. 2011.

TSUI, K.-H. et al. Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in prostate carcinoma cells. **Journal of molecular endocrinology**, v. 51, n. 1, p. 131–41, 29 jun. 2013.

Uwe Ohler's Lab at MDC. Disponível em: <https://ohlerlab.mdc-berlin.de/software/PARpipe_119/>. Acesso em: 6 out. 2017.

VASILIEV, J. M. et al. Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets: a link to the mechanism of cancer dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 34, p. 12526–30, 24 ago. 2004.

VEJNAR, C. E.; ZDOBNOV, E. M. miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. 11673–11683, 1 dez. 2012.

WAGNER, A. Distributed robustness versus redundancy as causes of mutational robustness. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 27, n. 2, p. 176–88, fev. 2005.

WALLACE, D. C. Mitochondria and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 10, p. 685–98, out. 2012.

WAN, L.; PANTEL, K.; KANG, Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1450–1464, 7 nov. 2013.

WANG, J. et al. Mastermind-like Transcriptional Coactivator 1 Overexpression Predicts Poor Prognosis in Human with Hepatocellular Carcinoma. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 46, n. 5, p. 502–7, set. 2016.

WANG, Z.-H.; XU, C.-J. Research Progress of MicroRNA in Early Detection of Ovarian Cancer. **Chinese Medical Journal**, v. 128, n. 24, p. 3363, 20 dez. 2015.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WAPINSKI, O.; CHANG, H. Y. Long noncoding RNAs and human disease. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 354–361, jun. 2011.

WENG, Z. et al. microRNA-450a targets DNA methyltransferase 3a in hepatocellular carcinoma. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 2, n. 5, p. 951–955, set. 2011.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, mar. 2009.

WITTEN, D. et al. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 58, 11 maio 2010.

WU, H.; WANG, W.; XU, H. Depletion of C3orf1/TIMMDC1 inhibits migration and proliferation in 95D lung carcinoma cells. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 11, p. 20555–71, 10 nov. 2014.

WU, X. et al. MicroRNA-424 inhibits cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition by downregulating doublecortin-like kinase 1 in ovarian clear cell carcinoma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 1 fev. 2017.

XU, J. et al. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. **Oncogene**, n. March, p. 1–12, 2 abr. 2012.

XU, W. et al. Identifying microRNA targets in different gene regions. **BMC bioinformatics**, v.

15 Suppl 7, n. Suppl 7, p. S4, 2014.

YANG, L. et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. **Molecular systems biology**, v. 10, n. 5, p. 728, 5 maio 2014.

YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 675–686, nov. 2015.

YEUNG, T.-L. et al. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 309, n. 7, p. C444–C456, 1 out. 2015.

YEUNG, T.-L. et al. Targeting Stromal-Cancer Cell Crosstalk Networks in Ovarian Cancer Treatment. **Biomolecules**, v. 6, n. 1, p. 3, 6 jan. 2016.

ZANOLINI, A. et al. Pure myopathy with enlarged mitochondria associated to a new mutation in MTND2 gene. **Molecular genetics and metabolism reports**, v. 10, p. 24–27, mar. 2017.

ZHANG, B.; KIROV, S.; SNOODY, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic acids research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W741-8, 1 jul. 2005.

ZHANG, X.-M. et al. Identification of active miRNA and transcription factor regulatory pathways in human obesity-related inflammation. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 76, 7 mar. 2015.

ZHANG, Y. et al. Sphingosine kinase 1 and cancer: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e90362, 27 fev. 2014.

8. ANEXOS

8.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese

Pesquisador: Bruna Rodrigues Muys

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 20007313.3.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 402.806

Data da Relatoria: 08/08/2013

Apresentação do Projeto:

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs não codificadores que fazem parte dos circuitos moleculares da célula e possuem papel regulatório importante na expressão gênica em praticamente todos os processos biológicos, como no desenvolvimento; proliferação celular; diferenciação; metabolismo e apoptose. A alteração dos níveis de miRNAs é uma das causas ou efeito da tumorigênese e atualmente vários miRNAs têm mostrado ter efeito de oncogenes ou de genes supressores tumorais. Especificamente no cromossomo X estão localizados 10% dos miRNAs humanos atualmente conhecidos, sendo que vários destes possuem participação no estabelecimento e progressão do câncer. Em nosso trabalho anterior, foi verificado que dois miRNAs ainda pouco explorados localizados na região Xq26, o miR-450a e o miR-450b-5p, foram superexpressos em um painel de tecidos saudáveis comparado a um painel de linhagens tumorais e também foram coexpressos em tecidos saudáveis com o miR-424, um miRNA supressor tumoral em vários tipos de cânceres que está localizado na mesma região. Além disso, alguns dados da literatura apontam tais miRNAs como agentes supressores tumorais. Tendo como base nossos resultados preliminares e as evidências de outros autores, hipotetizamos que a superexpressão destes miRNAs em determinado(s) tipos tumorais pode levar ao atenuamento de fenótipos associados a células tumorais. Desta forma, o objetivo deste projeto é realizar a caracterização

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 402.806

funcional in vitro dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese, tendo em vista que miRNAs são potenciais biomarcadores clínicos para o diagnóstico e prognóstico de pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar a caracterização funcional in vitro dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese.

Objetivos específicos

Padronizar a expressão ectópica dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p em linhagens tumorais cujos valores de expressão dos mesmos sejam os menores em relação aos tecidos normais correspondentes;

Analisar in vitro o efeito da superexpressão dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p na regulação de processos biológicos ligados a tumorigênese como apoptose, proliferação e migração celular;

Realizar uma análise de expressão global para selecionar genes que são modulados pela expressão ectópica dos miRNAs miR-450a e miR-450b-p;

Validar os alvos preditos selecionados no item anterior;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Considerando que todas as linhagens a serem utilizadas são comerciais e que as novas linhagens geneticamente modificadas serão produzidas e manipuladas em local que segue as normas de biosseguranças estabelecidas para OGMs de classe de risco 2, o risco de acidentes para o pesquisador e dos outros usuários do laboratório é muito baixo.

Benefícios:

Elucidar a função dos miRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese, tendo em vista a geração de biomarcadores clínicos para o diagnóstico e prognóstico de pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa visa determinar a função dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese. Sendo que a pesquisa vai ser conduzido com células de linhagens tumorais humanas comerciais e de RNA de tecidos normais humanos também comerciais, os quais os indivíduos já foram submetidos ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido inerente ao processo de obtenção das amostras, não há problemas éticos que impedem a condução desta pesquisa.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 402.806

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi incluído um orçamento detalhado. A pesquisadora pediu dispensa do TCLE porque o projeto será realizado com células de linhagens tumorais humanas comerciais e RNA de tecidos normais humanos também comerciais.

Recomendações:

A pesquisa deve atender aos fundamentos éticos e científicos pertinentes de acordo com a Resolução CNS nº 466/2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa pode ser considerado aprovado, assim como a dispensa do TCLE.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 23 de Setembro de 2013

Assinador por:

MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

8.2. Parecer do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Estudo funcional dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese*", registrado com o número **141/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 26 de setembro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 30 camundongos NSG fêmeas pesando 22g oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/09/2016 a 10/10/2019.

We certify that the Protocol n° 141/2016, entitled "*Functional study of microRNAs miR-450a and miR-450b-5p on tumorigenesis*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/26/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 30 female NSG mice weighing 22g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 10/10/2019.

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

8.3. Parecer da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 04 de março de 2015.

O projeto de pesquisa intitulado “Estudo funcional in vivo dos microRNAs miR-450a e miR-450b-5p na tumorigênese do câncer de ovário”, em nome de Bruna Rodrigues Muys, orientada pelo Prof Dr Wilson Araújo da Silva Júnior, foi avaliado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2016.008-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Ilustríssimo Senhores
Bruna Rodrigues Muys
Prof Dr Wilson Araújo da Silva Júnior

PH-1.17 - REV. 1 RUA TEN. CATÃO ROXO ° 2501 - CEP. 14051-140 - RIBEIRÃO PRETO - SP - PABX: (16) 2101-9300 - FAX: (16) 2101-9309
CNPJ 60.255.791/0001-22 - INSCR. EST.: ISENTA

9. APÊNDICE

9.1. Manuscrito a ser submetido para publicação

Muys B R^{1,2}, Sousa J F², Araújo L F^{1,2}, Praça J², Sarshad AA⁴, Anastasakis D⁴, Vidal D O⁵, Hafner M⁴, and Silva WA Jr^{1,2}

¹Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

²Center for Cell-Based Therapy (CEPID/FAPESP); National Institute of Science, and Technology in Stem Cell and Cell Therapy (INCTC/CNPq), Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil.

³Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

⁴Laboratory of Muscle Stem Cells and Gene Regulation, NIAMS, Bethesda, USA.

⁵Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil

brunamuys@usp.br

Keywords: miR-450a, miR-450b-5p, function, cancer, ovary

MiR-450a and miR-450b-5p negatively impact the tumorigenic potential of ovarian epithelial cancer cells by inhibiting targets from EMT or energetic metabolism

Abstract

Ovary cancer is the fifth largest cause of cancer-related deaths in women worldwide, with patients presenting extremely low survival rates. MicroRNAs (miRNAs), non-coding RNAs around 22 ribonucleotides, play a critical role in gene expression regulation in virtually all biological processes. miR-450a and miR-450b-5p, two underexplored miRNAs, are downregulated in ovarian cancer compared to ovary normal tissue. The aim of this work was to verify if both miR-450a and miR-450b-5p display tumor suppressor functions in ovarian cancer. For this purpose, we used *in vitro* assays and an *in vivo* xenographic model. Anoikis was higher for A2780 and SKOV3 ovarian cancer cell lines after miR-450a overexpression. Additionally, A2780 cells overexpressing miR-450a proliferated at higher rate. However, these cells presented fewer but noticeable larger colonies at the clonogenic assay. Conversely, miR-450b decreased proliferation in SKOV-3, which was corroborated in clonogenic assay. Overexpression of miR-450a or miR-450b-5p resulted in lower migration and invasion in both cell lines. Correspondingly, we verified that both miRNAs impaired tumor growth in an *in vivo* xenographic assay. We also verified that most of the validated targets found through PAR-CLIP in this work for miR-450a are related to energetic metabolism (*TIMMDC1*, *ACO2*, *ATP5B*) besides *VIM*, the canonical marker of EMT. The direct target for miR-450b, *ME1*, is also related to energetic metabolism. Our analysis indicates that miR-450a and miR-450b-5p are tumor suppressors relevant to the tumorigenic process of ovarian epithelial tumors. Additionally, they act mostly by directly downregulating genes responsible by the EMT or energetic metabolism.

Introduction

Ovarian cancer is the most lethal kind of gynecological tumor worldwide¹, which is due to a lack of specific symptoms and reliable biomarkers. As a consequence, 75% of patients are already in an advanced stage at the time of diagnosis and only 27% of them are able to survive for at least 5 years²⁻⁵. Therefore, there is an urgent need to develop biomarkers capable to help diagnose ovarian cancer earlier or targets to improve the actual treatment.

MicroRNAs (miRNAs), non-coding RNAs around 22 ribonucleotides long, play a key role in gene expression regulation in virtually all biological processes. MiRNAs act associated with the miRISC complex, which is composed of Argonaut proteins (AGO), GW182 and other accessory proteins. Those proteins guide miRNAs to their targets, what are recognized by 6-8 nucleotides at the 5' end of the miRNA, the seed sequence⁶. The miRNAs function consists of gene silencing through translational repression of their target mRNAs. Changing levels of miRNAs are a cause or effect of tumorigenesis and currently many of them operate as oncogenes or tumor suppressor genes⁷. There is abundant evidence of the expression modulation of several miRNAs in ovarian cancer, with many of them acting as tumor suppressor or oncogene⁸⁻¹². miRNAs miR-450a and miR-450b are underexplored and we verified that both are underexpressed in a panel of tumor cell lines compared to a panel of normal tissues (Supplementary Figure 1A). Li and collaborators showed that miR-450a-5p is downregulated in serous ovarian carcinoma compared to matched normal oviduct tissues¹³. Also, miR-450b-5p was also found to be downregulated in whole blood

derived from ovarian cancer patients compared to healthy volunteers¹⁴, what probably reflects the expression in ovary.

The aim of this work was to verify the hypothesis that both miR-450a and miR-450b-5p display tumor suppressor functions in ovarian cancer. To accomplish this task, we used a lentiviral expression vector to stably overexpress miR-450a or miR-450b in A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cell lines (Supplementary Figure 1B) and performed *in vitro* and *in vivo* assays. Additionally, we performed RNA-Seq and AGO2-PAR-CLIP with those cell lines to search for miR-450a-5p and miR-450b-5p targets.

Results

miR-450a impaired viability by increasing anoikis rate in A2780 and SKOV-3 cell lines

miR-450a decreased the viability of cell lines A2780 and SKOV-3 after cultivation for 24 hours in non-adherent plates compared to the control group (Figure 1A). The decreased viability was reflected in an increase in the anoikis rate (Figure 1B).

miR-450a or miR-450b inhibited growth in A2780 and SKOV-3 cell lines

We verified that miR-450a reduced the number of colonies in A2780 cell line (Figure 2C and 2D). Curiously, miR-450a elevated the proliferation rate between 24 and 48 hours (Figure 2A). This probably is reflected on the larger size observed in the colonies in figure 2C compared to the control group. miR-450b diminished the proliferation rate between 72 and 120 hours

in SKOV-3 cell line (Figure 2B), which was corroborated with the clonogenic assay (Figure 2C and 2D).

miR-450a and miR-450b impaired migration and invasion in A2780 and SKOV-3 cell lines

The overexpression of miR-450a and miR-450b also reduced the migration and invasion rate in A2780 and SKOV-3 cell lines compared to the respective control groups (Figure 3).

miR-450a and miR-450b inhibited the growth of A2780 cell line in immunodeficient mice

After injecting A2780 cells stable overexpressing miR-450a or miR450b in the peritoneal cavity of NOD SCID female mice, the control group presented a visible swelling at abdominal cavity compared to treated ones (Figure 4A). Correspondingly, the recovered tumors had their total weight decreased compared to control cell line (Figure 4B).

Most probable targets from miR-450a-5p and miR-450b-5p are in the coding region of mRNAs in A2780 cell line

Subsequently to the successful recovery of AGO2 and their RNAs bound using TNRC6B peptide¹⁵ or antibody anti-AGO2 (Supplementary Figure 2), AGO2-PAR-CLIPs experiments with A2780 cell line showed that most of the sequences (clusters) from recovered RNA bound to AGO-2 are in 3'UTR or coding regions of mRNAs (Supplementary Figure 3). Furthermore, most of the sequences that appeared exclusively in overexpressed miR-450a

or miR-450b samples compared to the control group and that contained the complementary sequence of their seed regions are in the coding region of mRNAs (Figure 5).

miR-450a-5p directly targets ACO2, MAML1, PAPSS1 and VIM; and miR-450b-5p directly targets ME1

From the clusters selected after miR-450a or miR-450b overexpression (Supplementary Table 1), we verified that ACO2, MAML1, PAPSS1 and VIM genes were downregulated in miR-450a treated cell lines regarding their mRNA expression and protein expression in at least in one of the cell lines utilized (Figure 6A, 6D-E). We also indicated that other genes (ATP5B, MT-ND2 and TIMMDC1 and CITED2) are targets from miR-450a-5p based on AGO2-PAR-CLIP, RNA-Seq and RT-qPCR from A2780 cell line. (Supplementary Figure 4). Additionally, there was a negative correlation between miR-450a-5p expression and ACO2 or ATP5B in ovarian serous cystadenocarcinoma from TCGA data (Supplementary Figure 5). Furthermore, we found that ME1 is a direct target from miR-450b-5p, based on AGO2-PAR-CLIP, RNA-Seq, RT-qPCR and Western blot experiments in A2780 cell line (Figure 6B-C).

miR-450a indirectly inhibited other mesenchymal markers and upregulated cadherin in A2780 and SKOV-3 cell lines

After RNA-Seq analysis we found that the expression of some of the most important markers of EMT process, such as TGFB1, TGFB2, SNAIL, ZEB2 and VIM were downregulated after miR-450a overexpression in both

cells lines analyzed. On the other hand, CHD1, the canonical marker of epithelial morphology, had its expression increased after the same treatment. The same clear contrary effect was not observed for miR-450b, which downregulated CDH2, SNAI1 and TWIST2, but did not upregulate CDH1 (Figure 7).

Discussion

To date few works cited and rare have specifically addressed miRNAs miR-450a or miR-450b-5p. However, those who mentioned them in the context of gynecological cancers, almost always in large-scale expression studies, were in agreement with our initial hypothesis that they are tumor suppressor elements^{13,14,16,17}.

Considering that tumor cells can survive in the absence of adhesion to the extracellular matrix during their pathway from one organ to another through the systemic circulation¹⁸ or peritoneal fluid; that cell dishes which prevent cell adhesion partially mimic such a metastatic process¹⁹; and that tumor cells migrate and invade other tissues, we suggest that miR-450a acts as a tumor suppressor that decreases the metastasis ability in SKOV-3 and A2780. This was corroborated by the *in vitro* and *in vivo* assays, by the EMT markers expression and the validated target, the canonical mesenchymal gene, VIM. We also suggest that miR-450a act like tumor suppressor by inhibiting genes related to energetic metabolism (ACO2, ATPB5, MT-ND2 and TIMMDC1), all related to have oncogenic effects^{20–25}.

In the seminal paper from Hanahan and Weinberg²⁶ the reprogramming of energy metabolism was included as one of the characteristics of tumor cells. Tumor cells actively divide and require more glucose to generate energy even under normal oxygen conditions, deviating the pyruvate produced in the glycolysis to the production of lactic acid rather than breaking it completely for the generation of carbon dioxide. This phenomenon, also known as aerobic glycolysis, is called the Warburg effect, after which Otto Warburg first observed it²⁷. However, even though this general effect has been observed, many types of cancers maintain a high rate of oxidative phosphorylation²⁷. In fact, tumor cells may not only require more glucose but may be "glutamine-addicted," which is the most abundant free amino acid found in blood^{27,28}. Accordingly, increased glutaminolysis rate, glutamine catabolism, is also a hallmark of tumor cell metabolism²⁹. In glutaminolysis, glutamine byproducts are also not completely oxidized for ATP production, but rather they can return to the citric acid cycle for the production of lipids and amino acids, important for cell replication^{29,30}.

ME1 gene, the target validated for miR-450b in line A2780, produces the malic enzyme, which transforms the malate into pyruvate and NADPH; and the ACO2 target gene validated for miR-450a in the same cell line codifies the mitochondrial aconitase 2 protein, which in turn transforms the citrate into isocitrate and participates in the citric acid cycle, are genes involved in the glutaminolysis process³⁰. Yang and colleagues²⁸ found that highly invasive ovary cancer cells have a higher rate of glutaminolysis than less invasive cells, more dependent on glucose and, therefore, on the glycolysis process. The same group found that the high expression of genes

associated with the citric acid cycle, such as ACO2, is correlated with the shorter patient survival.

The other genes validated to be targets from miR-450a (CITED2, MAML1 and PAPSS1) play a role in development and differentiation; Notch signaling pathway and sulfate metabolism, respectively. They have also been demonstrated to be upregulated in tumor compared to the correspondent normal tissues^{31–33}.

miR-450b inhibited migration, invasion and could decrease proliferation. Since it had no consequence in proliferation in A2780 cell line, we suggest that his main effect as a tumor suppressor was due to migration and invasion effect. This could be supported if we observe that the tumors with miR-450b overexpression recovered from mice in xenographic assay are larger than that overexpressing miR-450a, which, besides migration and invasion, has also an effect on anoikis. We also demonstrated that miR-450b-5p targets ME1, which has his expression modulated by p53³⁴, also has a role in energetic metabolism and a tumorigenic effect in colorectal cancer³⁵.

Conclusion

In this work, we confirmed our hypothesis that miR-450a and miR-450b are tumor suppressors in ovarian cancer. We used *in vitro* models that demonstrated that miR-450a and miR-450b inhibited migration and invasion; that they could inhibit grow, and that miR-450a increased anoikis rate. Our *in vivo* model corroborated these experiments. We also validated some of important miR-450a and miR-450b targets through RNA-Seq and AGO2-PAR-

CLIP analysis. This knowledge will allow us to pinpoint therapeutically valuable targets for treatment, diagnosis, and prognosis of ovarian cancer.

Material and Methods

Cell culture maintenance

We used the commercial human cell lines A2780, purchased from Cell bank of Rio de Janeiro (BCRJ) and SKOV-3 was kindly donated from Molecular Oncology Research Center in Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil. A2780 was cultivated in RPMI medium (Gibco, Catalog No. 31800–022) and SKOV-3, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Catalog No. 11995065). The other cells lines used in the tumor cell line panel to compare with normal tissues were previously described³⁶. All mediums were supplemented with 10% FBS (GE Healthcare, Catalog No. SH30071.03) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich Co., Catalog No. P4333). Cells were cultivated at 37°C and 5% CO₂. All experiments described below were performed three times independently.

Plasmid construction and transduction

Plasmids expression vectors containing GFP and the pri-miR-450a or pri-miR-450b sequences were constructed using pLVX-IRES-ZsGreen Vector (Clontech, Catalog No. 632187, modified for restriction enzymes positions), EcoRI and BamH1 restriction enzymes (New England BioLabs Catalog No. R0101S and R0136S, respectively). We used DNA derived from blood to generate the pri-miRNAs sequences with the following primers: miR-450a

Forward: 5'attgataGGATCCgaggctatcaggaagtat 3', miR-450a *Reverse:* 5'gctgagaGAATTCataattctgcatcttacat 3', miR-450b *Forward:* 5'attgataGGATCCaagatggaggaataagc 3' and miR-450b *Reverse:* 5'gctgagaGAATTCgagaaaaacaaacattacc 3'. The capital letters refer to the restrict site for BamHI (GGATCC) and EcoRI (GAATTC) enzymes. miR-450a and miR-450b-5p were overexpressed permanently in SKOV-3 and A2780 (ovarian tumor cell lines) by using the produced lentiviral expression vectors and selected for GFP by FACS.

Anoikis assay

We plated 10⁵ cells in Ultra-Low attachment 6 well plates (Corning® Costar®, Catalog No. CLS3471-24EA) for 24 hours and measured the viability and anoikis percentage using Annexin V APC (BD Biosciences, Catalog No. 550474) and PI (BD Biosciences, Catalog No. 5506463) at FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences).

Migration and invasion assays

Cell migration was evaluated in 24-well transwell plates (Greiner BioOne, Catalog No 662638). Matrigel Invasion Chamber (Corning, Catalog No. 354480) replaced the filters, in the invasion assay. Before the assays, cells were starved for 24 hours by removing FBS from medium. In the upper part of the insert were added cells in incomplete medium (without FBS) and at the bottom part, complete medium. Cells from the upper compartment were removed with a cotton swab and cells that migrated to the lower face of the

filter were fixed in 4% formaldehyde (in PBS) and stained with 0.5% crystal violet. The number of cells was manually counted using Image J software.

Clonogenic assay

For this assay, we synchronized the cells before the experiment by removing FBS from medium for 48 hours (5% in the first day and 0% in the second day). Single cells were plated in a 6 well plate and after 9 (A2780) or 15 (SKOV-3) days they were fixed in 4% formaldehyde (in PBS), stained with 0.5% crystal violet and colonies formed by at least 50 cells approximately were manually counted.

Proliferation assay

We measured the proliferation rate using CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Catalog No. C34557). For this, we synchronized cells as in the clonogenic assay and marked them with the dye second to the manufacturer. Next, we collected the cells in different times (0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours) and verified the fluorescence in BD FACSCANTO II (BD Biosciences). We analyzed the data using *FlowJo* 8.7 software.

In vivo assay

All procedures were performed after approval of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo. We used 9-11 weeks NSG female mice and injected 5×10^6 cells from A2780

cell line in their peritoneal cavity. After 4 weeks, the mice were sacrificed and the tumors collected and weighted.

RT-qPCR

To evaluate the expression of miRNAs in normal tissues, we used RNA extracted from cancer cell lines and a panel of 20 normal tissues (FirstChoice Human Total RNA Panel Survey, Ambion, Catalog No. AM6000). Reverse transcription was performed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, Catalog No. 4368813), according to supplier's protocol. The RT-qPCR for mRNA analysis was performed using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Catalog No. 4367659). The expression was normalized for mRNAs using primers from TUBB and HPRT1 housekeeping genes. The sequences of all primers are in the Supplementary Table 2. For miRNAs, were used Taqman miRNA Assay (Applied Biosystems) probes (Catalog No.002303 for miR-450a-5p and 002207 for miR-450b-5p) with Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, catalog No. 4304437). The snoRNAs RNU24 (Catalog No. 001001) and RNU48 (Catalog No. 001006) were used as endogenous genes. All reactions were performed in replicates at 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Catalog No. 4351107). To calculate miRNAs expression in the panel of normal tissues compared to tumor cell lines, we used $2^{-\Delta Ct}$. We calculated the remaining relative expression using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ considering the samples with empty vector or the normal ovary tissue as the reference.

Western blot

Whole cell lysates were obtained by sonication of cells in RIPA or IP (Tris 20 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM and NP40 1%) buffers. Protein were quantified using *Bio-Rad Protein Assay Kit* (Bio Rad, Catalog No. 5000001) and 20 µg of protein were loaded into the gel. We used the following primary antibodies: AGO2 (Abcam, Catalog No. ab32381), LAMIN A/C (Santa Cruz, Catalog No. sc-20681), PAPSS1 (Proteintech), ACO2 (Proteintech, Catalog No. 11134-1-AP), VIM (Proteintech, Catalog No. 10366-1-AP), anti-MAML1 (Proteintech, Catalog No. 55493-1-AP) and ME1 (Proteintech, Catalog No. 16619-1-AP). Membranes were developed with Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore, Catalog No. WBLUR0500).

RNA-Seq

Total RNA was extracted from three biological replicates from each cell line using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Catalog No. 15596026) second to recommendations from manufacturer. We used the NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Catalog No. E7760) with NEBNext rRNA Depletion Kit (NEB, Catalog No. E6318). The samples were sequenced in *HiSeq® 3000 (Illumina)* in single-read with 50 cycles. Analysis were made after alignment in h19 genome using TopHat with Cufflinks and Cuffdiff for differential expression³⁷.

AGO2-PAR-CLIP

PAR-CLIP method was made in biological replicate as described previously³⁸. The samples were sequenced at *HiSeq® 3000 (Illumina)* in single-read with

50 cycles. The analysis were made using PARalyser³⁹ with PARpipe⁴⁰ pipeline. The probable targets were selected based on the presence of the complementary region of the seeds from miRNAs miR-450a-5p or miR-450b-5p subtracted from those present on control sample.

Correlation analysis with TGCA data

To verify if there was a negative correlation between the expression of the miRNAs miR-450a-5p and miR-450b-5p, and their validated targets, we downloaded the published miRNA-Seq data for the serous ovarian cystadenocarcinoma samples and the mRNA data derived from RNA-Seq by the cgdscr package⁴¹ in R software⁴². Expression levels are normalized in RSEM (Expectation-Maximization).

Statistics Analysis

The expression data were analyzed using Student's t-test. For functional assays, we used ANOVA followed by Bonferroni post-test. To verify correlation regarding the expression of miRNAs and their targets in TCGA data, we used Pearson's correlation coefficient. All the statistical analysis was performed with GraphPad Prism 4 software and $p < 0.05$ was considered as significant.

References

1. Hansen JM, Coleman RL, Sood AK. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2016;56:131-143. doi:10.1016/j.ejca.2015.12.016.
2. Cannistra SA. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med*. 2004;351:2519-2529. doi:10.1136/bmj.2.6195.935-c.
3. Lalwani N, Fasih N. Histologic , Molecular , and Cytogenetic Features of Ovarian Cancers : Implications for Diagnosis and Treatment 1. 2011.
4. Lengyel E, Burdette JE, Kenny HA, et al. Epithelial ovarian cancer experimental models. *Oncogene*. 2014;33(28):3619-3633. doi:10.1038/onc.2013.321.
5. Cho A, Howell VM, Colvin EK. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer - A Piece of a Puzzle. *Front Oncol*. 2015;5:245. doi:10.3389/fonc.2015.00245.
6. Hussain MU. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res*. 2012;349(2):405-413. doi:10.1007/s00441-012-1438-0.
7. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):704-714. doi:10.1038/nrg2634.
8. Prahm KP, Novotny GW, Haggall C, Haggall E. Current status on microRNAs as biomarkers for ovarian cancer. *Apmis*. 2016;124(5):337-355. doi:10.1111/apm.12514.
9. Li S-D, Zhang J-R, Wang Y-Q, Wan X-P. The role of microRNAs in ovarian cancer initiation and progression. *J Cell Mol Med*. 2010;14(9):2240-2249. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01058.x.
10. Lan H, Chen W, He G, Yang S. miR-140-5p inhibits ovarian cancer growth partially by repression of PDGFRA. *Biomed Pharmacother*. 2015;75:117-122. doi:10.1016/j.biopha.2015.07.035.
11. Yang L, Zhang X, Ma Y, Zhao X, Li B, Wang H. Ascites promotes cell migration through the repression of miR-125b in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8(31):51008-51015. doi:10.18632/oncotarget.16846.
12. Parikh A, Lee C, Joseph P, et al. microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun*. 2014;5:ncomms3977. doi:10.1038/ncomms3977.
13. Li Y, YAO L, LIU F, et al. Characterization of microRNA expression in serous ovarian carcinoma. *Int J Mol Med*. 2014;34(2):491-498. doi:10.3892/ijmm.2014.1813.
14. Häusler SFM, Keller A, Chandran PA, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer*. 2010;103(5):693-700. doi:10.1038/sj.bjc.6605833.
15. Hauptmann J, Schraivogel D, Bruckmann A, et al. Biochemical isolation of Argonaute protein complexes by Ago-APP. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(38):11841-11845. doi:10.1073/pnas.1506116112.
16. Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci*. 2010;101(1):241-249. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01385.x.
17. Witten D, Tibshirani R, Gu SG, Fire A, Lui W-O. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. *BMC Biol*. 2010;8(1):58. doi:10.1186/1741-7007-8-58.
18. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):241-245. doi:10.1016/j.ceb.2009.10.008.
19. Kunjithapatham R, Karthikeyan S, Geschwind J-F, et al. Reversal of anchorage-independent multicellular spheroid into a monolayer mimics a metastatic model. *Sci Rep*. 2014;4:6816. doi:10.1038/srep06816.
20. Tsui K-H, Feng T-H, Lin Y-F, Chang P-L, Juang H-H. p53 downregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in human prostate carcinoma cells. *Prostate*. 2011;71(1):62-70. doi:10.1002/pros.21222.
21. Tsui K-H, Chung L-C, Wang S-W, Feng T-H, Chang P-L, Juang H-H. Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in prostate carcinoma cells. *J Mol Endocrinol*. 2013;51(1):131-141. doi:10.1530/JME-13-0090.
22. Wu H, Wang W, Xu H. Depletion of C3orf1/TIMMDC1 inhibits migration and

- proliferation in 95D lung carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):20555-20571. doi:10.3390/ijms151120555.
23. Gusdon AM, Votyakova T V, Mathews CE. mt-Nd2a suppresses reactive oxygen species production by mitochondrial complexes I and III. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10690-10697. doi:10.1074/jbc.M708801200.
 24. Li W, Li Y, Li G, et al. Ectopic expression of the ATP synthase β subunit on the membrane of PC-3M cells supports its potential role in prostate cancer metastasis. *Int J Oncol.* 2017;50(4):1312-1320. doi:10.3892/ijo.2017.3878.
 25. Hjerpe E, Egyhazi Brage S, Carlson J, et al. Metabolic markers GAPDH, PKM2, ATP5B and BEC-index in advanced serous ovarian cancer. *BMC Clin Pathol.* 2013;13(1):30. doi:10.1186/1472-6890-13-30.
 26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
 27. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(10):685-698. doi:10.1038/nrc3365.
 28. Yang L, Moss T, Mangala LS, et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Mol Syst Biol.* 2014;10(5):728. doi:10.1002/MSB.20134892.
 29. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(4):362-369. doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.002.
 30. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol.* 2016;14(1):15. doi:10.1186/s12957-016-0769-9.
 31. Zhang Y, Wang Y, Wan Z, Liu S, Cao Y, Zeng Z. Sphingosine kinase 1 and cancer: a systematic review and meta-analysis. Katoh M, ed. *PLoS One.* 2014;9(2):e90362. doi:10.1371/journal.pone.0090362.
 32. Minemura H, Takagi K, Sato A, et al. CITED2 in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with proliferation, migration and chemoresistance. *Cancer Sci.* 2016;107(12):1898-1908. doi:10.1111/cas.13081.
 33. Hashemi Bidokhti M, Abbaszadegan MR, Sharifi N, Abbasi Sani S, Forghanifard MM. Contribution of MAML1 in esophageal squamous cell carcinoma tumorigenesis. *Ann Diagn Pathol.* 2017;27:79-82. doi:10.1016/j.anndiagpath.2017.01.010.
 34. Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature.* 2013;493(7434):689-693. doi:10.1038/nature11776.
 35. Shen H, Xing C, Cui K, et al. MicroRNA-30a attenuates mutant KRAS-driven colorectal tumorigenesis via direct suppression of ME1. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1253-1262. doi:10.1038/cdd.2017.63.
 36. Muys BR, Lorenzi JCC, Zanette DL, et al. Placenta-Enriched LincRNAs MIR503HG and LINC00629 Decrease Migration and Invasion Potential of JEG-3 Cell Line. Oudejans C, ed. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151560. doi:10.1371/journal.pone.0151560.
 37. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* 2012;7(3):562-578. doi:10.1038/nprot.2012.016.
 38. Benhalevy D, McFarland HL, Sarshad AA, Hafner M. PAR-CLIP and streamlined small RNA cDNA library preparation protocol for the identification of RNA binding protein target sites. *Methods.* November 2016. doi:10.1016/j.ymeth.2016.11.009.
 39. Corcoran DL, Georgiev S, Mukherjee N, et al. PARalyzer: definition of RNA binding sites from PAR-CLIP short-read sequence data. *Genome Biol.* 2011;12(8):R79. doi:10.1186/gb-2011-12-8-r79.
 40. Uwe Ohler's Lab at MDC. https://ohlerlab.mdc-berlin.de/software/PARpipe_119/. Accessed October 6, 2017.
 41. Anders Jacobsen. cgdsr: R-Based API for Accessing the MSKCC Cancer Genomics Data Server (CGDS) version 1.2.6 from CRAN. <https://rdr.io/cran/cgdsr/>. Accessed October 2, 2017.
 42. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. Accessed March 7, 2017.

Figures

Figure 1. miR-450a impaired viability by increasing anoikis. **A.** Percentage of viability (percentage of Annexin V and PI negative cells) of cell lines A2780 and SKOV-3. **B.** Percentage of anoikis (percentage of Annexin V positive cells). - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b. The values refer to the average of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 2. miR-450a or miR-450b inhibited growth in A2780 and SKOV-3 cell lines. **A-B.** Proliferation rate of A2780 and SKOV-3 cell lines, respectively. **C.** Representative images from colonies after clonogenic assay. **D.** Colony formation rate. Proliferation assay was performed using a fluorescent dye and the median from fluorescent intensity was calculated as: (initial-final fluorescent intensity)/ initial fluorescent intensity. - or +pLVX: empty vector; + miR-450a or +pLVX+miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b or +pLVX+miR-450b: pri-miR-450b. The values refer to the average of three independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 3. miR-450a or miR-450b impaired migration and invasion in A2780 and SKOV-3 cell lines. **A.** Representative images from inserts after migration (upper part) and invasion (bottom part) assay. **B.** Migration (upper part) and invasion (bottom part) rates. Each rate value was calculated setting 100% as the number of cells which migrated or invaded in control groups. - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b. The values refer to the average of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 4. miR-450a or miR-450b inhibited the growth of A2780 cell line in immunodeficient mice. **A.** Representative images from tumors collected in each mouse (bottom part) and mice before tumor collection (upper part). **B.** Tumor weights collected from all tumors in each mouse at the end of the experiment. - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b. The values refer to the average of 7 to 8 animals. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$.

Figure 5. Most probable targets from miR-450a and miR-450b are in the coding region of mRNAs in A2780 cell line. **A-B.** Relative frequency of clusters found exclusively in overexpressed miR-450a (A) or miR-450b (B) cells which contained complementary sequence of seed region (6 nt) of the respective miRNAs.

Figure 6. miR-450a-5p directly targets ACO2, MAML1, PAPSS1 and VIM; and miR-450b-5p targets ME1. **A.** Protein blots for ACO2, MAML1, PAPSS1 and VIM in A2780 and/or SKOV-3 cell lines. **B.** Protein blot for ME1 in A2780 cell line. **C.** RT-qPCR for ME1 in A2780 and SKOV-3 cell lines. **D-E.** RT-qPCR for ACO2, MAML1, PAPSS1 and VIM in A2780 (D) and SKOV-3 (E) cell lines. The values refer to the average of three different samples. - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

Figure 7. miR-450a indirectly inhibited other mesenchymal markers and upregulated cadherin in A2780 and SKOV-3 cell lines. Average fold change data between overexpressed miR-450a or miR-450b RNA-Seq and the control group derived from RNA-Seq with three biological replicates. +pLVX: empty vector; +pLVX+miR-450a: pri-miR-450a and +pLVX+miR-450b: pri-miR-450b.

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Expression of miR-450a-5p and miR-450b-5p. **A.** miR-450a-5p and miR-450b-5p are downregulated in a panel of tumor cell lines compared to a commercial panel of normal tissues. The arrows indicate the point correspondent to normal ovary expression. **B.** Both miRNAs were upregulated after overexpression in A2780 and SKOV-3 cell lines. - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b. ** $p < 0.01$

Supplementary Figure 2. Recovery of AGO2 and RNAs bound after crosslink. **A.** Phospho image from SDS-PAGE gel of marked ATP [γ - 32 P] RNAs and protein recovered from pull-down with TNRC6B peptide or antibody anti-AGO2. **B.** Blot of samples for AGO2 protein. Input: samples collected before the immunoprecipitation; Pull-down: samples derived from beads bound to TCRC6B peptide or antibody anti-AGO2. Supernatant: remaining of samples after immunoprecipitation. The AGO2 protein corresponds to 130 kDa. - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b.

Supplementary Figure 3. Distribution of recovered RNA bound to AGO2 regarding their classification or mRNA specific region. **A.** Empty vector sample. **B.** miR-450a overexpressed sample. **C.** miR-450b overexpressed sample.

Supplementary Figure 4. miR-450a-5p also directly targets ATP5B, CITED2, MT-ND2 and TIMMDC1. RT-qPCR for those genes in A2780 cell line. The values refer to the average of three different samples. - empty vector; + miR-450a: pri-miR-450a and + miR-450b: pri-miR-450b. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Supplementary Figure 5. Spearman's negative correlation between miR-450a-5p expression and ACO2 (left) or ATP5B (right) in ovarian serous cystadenocarcinoma samples from TCGA data. Data were downloaded from cgdscr package in R software.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Sequences from clusters selected for target validation. Regions complementary to seed sequence from miR-450a-5p (upper part) or miR-450b-5p (bottom part) are in bold.

Alignment region	Gene	Cluster sequence
coding	<i>ACO2</i>	AACATTAACATTGTT CGCAA AC
coding	<i>ATP5B</i>	ACTATGCGGCG CAA ACATCTCCTTCGCCAAAA
5'UTR	<i>CITED2</i>	GTCTTCGGAGCAGAAAT CGCAAAA
coding	<i>MAML1</i>	CTCCATAT CGCAA AGCAACCTCAT
coding	<i>MT-ND2</i>	CCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTTATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAAAACCAGCTAC GCAAA ATCT
coding	<i>PAPSS1</i>	AATTTATTTCAGGAACGAAATG CGCAA ACTT
3'UTR	<i>TIMMDC1</i>	TAAATAAAACATTT CGCAA AA
coding	<i>VIM</i>	GATGTTGACAATGCGTCTCTGGCACGCTTGACCTTGAAC CGCAA AG
Alignment region	Gene	Cluster sequence
3'UTR	<i>ACVR2B</i>	AAACCTAATGCT GCAAA CTCTACCTAG
3'UTR	<i>CAND1</i>	ACATCTCCTAATGCTG TGCAA ACAT
3'UTR	<i>CCND2</i>	TGCAA AGCAATGAACTCAAGAAGGAATTGAAATAAGGAGGACATG
coding	<i>CRY1</i>	TTCCCT TGCAA AATATATCTAT
coding	<i>HERPUD2</i>	ATGGGCAAAA TGCAA CAACTTGGAACTTGAA
3'UTR	<i>ME1</i>	ACTAAATGTGTTTACCTAT TGCAAAA
coding	<i>MYH10</i>	TCGGCCGAGACTATG TGCAAAA AG
3'UTR	<i>PARN</i>	AAATCG TGCAA ATCTACAACATG
coding	<i>TOMM70A</i>	CTCTCTTTAGACG TGCAA AAAG

Supplementary Table 2. Sequences from primers used to quantify mRNAs genes.

genes	sequences from primers used to quantify mRNAs
<i>ACO2 Forward</i>	5' AGCCCAACGAGTACATCCAT 3'
<i>ACO2 Reverse</i>	5' TCTTCTCCGAGAGTGTCAGC 3'
<i>ATP5B Forward</i>	5' TGTTTGCTGGTGTGTTGGTGAG 3'
<i>ATP5B Reverse</i>	5' GAGCACCAGGTGGTTCATTC 3'
<i>HPRT1 Forward</i>	5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3'
<i>HPRT1 Reverse</i>	5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT 3'
<i>MAML1 Forward</i>	5' CGGAACAGGAGAAGCAACAG 3'
<i>MAML1 Reverse</i>	5' TTGGATGGACCCAAGGTGTT 3'
<i>ME1 Forward</i>	5' GTTTCGGAAGCCAAGAGGTC 3'
<i>ME1 Reverse</i>	5' TACAGCCAAGGTCTCCCAAG 3'
<i>MT-ND2 Forward</i>	5' CCCAACCCGTCATCTACTCT 3'
<i>MT-ND2 Reverse</i>	5' AAATCAGTGCGAGCTTAGCG 3'
<i>PAPSS1 Forward</i>	5' AACTGAGGTCCAGTGGCATT 3'
<i>PAPSS1 Reverse</i>	5' GCACTTTGGCACCATGACTT 3'
<i>TIMMDC1 Forward</i>	5' CTACAGCAGGCATCATTGGC 3'
<i>TIMMDC1 Reverse</i>	5' TGCAGATTGCACAGCATCAA 3'
<i>TUBB Forward</i>	5' TCAACACTTTCTTCAGTGAAACG 3'
<i>TUBB Reverse</i>	5' AGTGCCAGTGCGAACTTCATC 3'
<i>VIM Forward</i>	5' CCCTGAACCTGAGGGAAACT 3'
<i>VIM Reverse</i>	5' ATTGCTGCACTGAGTGTGTG 3'