#### **JULIANA ALVES DE CAMARGO**

# Edição genômica com CRISPR/Cas9 para avaliação do papel da MMP9 e seu regulador o microRNA-21 no câncer de próstata metastático: Estudo *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis Faria

SÃO PAULO 2022

#### **JULIANA ALVES DE CAMARGO**

# Edição genômica com CRISPR/Cas9 para avaliação do papel da MMP9 e seu regulador o microRNA-21 no câncer de próstata metastático: Estudo *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis Faria

SÃO PAULO 2022

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

#### Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

#### ©reprodução autorizada pelo autor

Camargo, Juliana Alves de

Edição genômica com CRISPR/Cas9 para avaliação do papel da MMP9 e seu regulador o microRNA-21 no câncer de próstata metastático : estudo in vitro e in vivo / Juliana Alves de Camargo. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.MicroRNAs 3.Metaloproteinase 9 da matriz 4.Sistemas CRISPRcas 5.Apoptose 6.Expressão gênica

USP/FM/DBD-034/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

#### Dedicatória

Aos meus pais Sandra Lúcia e Gerson, pelo exemplo, amor incondicional e por todo o esforço que sempre fizeram por mim, pelas minhas escolhas e realizações. Todo meu amor e minha eterna gratidão.

#### Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, minha fonte de luz espiritual que me guia e me protege a cada passo todos os dias.

À Professora Dra. Sabrina T. dos Reis Faria, minha orientadora, que me aceitou como aluna, confiou em mim e me deu todo o suporte para realizar esse trabalho, com muito carinho e dedicação, desde o primeiro dia que eu entrei no LIM55. Agradeço pelo seu grande exemplo como orientadora, como líder de equipe, sempre com muito amor, respeito e humildade. Obrigada por me aceitar, me ouvir e me permitir realizar esse trabalho. Um passo muito importante na minha vida.

À Professora Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, um grande exemplo de liderança, agradeço por todos os momentos de aprendizado, por compartilhar conosco sua experiência, sempre de braços abertos, agradeço por nos incentivar a fazermos nossos trabalhos da melhor maneira possível.

Ao Professor Dr. Miguel Srougi, pelo seu incentivo à pesquisa e nos apoiar nos nossos trabalhos no LIM55. Agradeço pelo grande exemplo de humildade, cooperatividade, sabedoria e compartilhar conosco suas histórias e trajetória de vida.

À Dra. ErickaTrarbach, do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular, LIM25, da FMUSP, por abrir as portas do seu laboratório e compartilhar comigo sua experiência, sempre solícita a ajudar e também orientar nos experimentos quando foi preciso. Seu apoio foi fundamental para a realização desse trabalho.

À Professora Dra. Marilene Lopes, do Laboratório de Neurobiologia de Células – Tronco do ICB, que me recebeu no início desse trabalho e deu todo o

suporte necessário para os experimentos iniciais. Suas reuniões contribuíram muito para o meu aprendizado.

Ao Professor Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, e Dra. MeireloshieHiyane do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental do ICB, por nos receber edar espaço em seu laboratório para realizar os experimentos com os animais. Agradeço por toda a disponibilidade

À Professora Dra. Irene de Lourdes Noronha e Dra. Margoth Ramos Garnica, do Laboratório de Nefrologia Celular e Genética Molecular, LIM29 da FMUSPpor nos receber e nos ajudar nos experimentos com imunofluorescência e coleta de dados desse trabalho.

Atodos os funcionários da disciplina de Urologia, e em especial, à secretária da pós-graduação, Elisa Cruz, por toda a ajuda e disponibilidade durante esses anos de Doutorado, e também às secretárias Tereza, Aparecida e Inisabete, pelo apoio.

Ao Iran Amorim Silva, sempre disponível a nos ajudar nos experimentos, compartilhar sua experiência, e nos ensinar tudo o que for preciso, com muita dedicação. Seu trabalho é essencial para todos os nossos projetos.

À Dra. Nayara Izabel Viana, por me receber desde o primeiro dia no laboratório de braços abertos, sempre solícita a me ajudar em tudo o que foi preciso, com muito amor e dedicação. Obrigada por compartilhar sua experiência comigo nessa jornada.

Agradeço a todos os amigos do LIM55, que me ajudaram nesse trabalho todos os dias, nos experimentos, as discussões de artigos e também nas horas de distração. Ruan Pimenta, Vanessa Shereiter, Denis Reis, Fábio Galucci, Gustavo Inoue, Gabriel Arantes, Poliana Romão, Patrícia Cândido, VictóriaGhazarian, aos

alunos de iniciação científica e aos estagiários. Obrigada a cada um de vocês por contribuir, a sua maneira, com esse trabalho.

Agradeço a todos da minha família, em especial meus pais Sandra Lúcia Alves Camargo e Gerson Franco de Camargo, por todos os ensinamentos, os exemplos, todo o esforço que vocês fizeram por mim e pela nossa família, sempre com muito amor, respeito carinho e dedicação. Agradeço por aceitar e me apoiar em minhas escolhas.

Às minhas irmãs Alessandra Alves Camargo e Carolina de Fátima Alves Camargo, por todos os momentos que vivemos juntas, nas alegrias e nos momentos de dificuldade. Mesmo com a distância física, agradeço pelo apoio e companheirismo, pelo aprendizado e pelo amor. Vocês são tudo na minha vida.

Essa dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de *InternationalCommitteeof Medical JournalsEditors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *ListofJournalsIndexed in Index Medicus*.

#### Sumário

### Lista de abreviaturas Lista de Tabelas Lista de figuras

#### Resumo

### Summary

1. Introdução	1
1.1 Câncer de Próstata	2
1.2 O Papel dos microRNA	8
1.3 Metaloproteinase da Matriz	11
1.4 A Técnica de CRISPR	13
2.00bjetivos	17
2.1 ObjetivoGeral	18
2.2 ObjetivosEspecíficos	18
3.0 Materiais e Métodos	20
3.1 Linhagens Celulares	21
3.2 Crispr-Cas9	21
3.3 Ensaio de viabilidade celular	25
3.4 Ensaio de transfecção	25
3.5 Ensaios de proliferação por citometria de fluxo	25
3.6 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo	26
3.7 Isolamento de RNA	27
3.8 Síntese do DNA complementar	28
3.9 Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real	28
3.10 Ensaio de Extração e análise proteica por immunoblotting	29
3.11 Ensaio de invasão	31
3.12 Ensaio de Imunofluorescência	32
3.13 Ensaios <i>in vivo</i>	33

1. Resultados	34
4.1 Padronização dos experimentos com o plasmídeo PX-330 com os sgRNA	35
4.2 Padronização da edição gênica da MMP9 e miR-21 <i>in vitro</i> com CRISF Cas9	
4.3 Crescimento tumoral <i>in vivo</i> de células editadas com CRISPR-Cas9 pa	
5. Discussão	.60
6. Conclusão	67
7. Referências Bibliográficas	69
Apêndice	74

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC - American Joint Committee on Cancer

ASO - antisenseoligonucleotídeo

BTRUS - Biópsia transretal da próstata guiada por ultrassonografia

β2M - Beta 2 microglobulina

CaP - Câncer de próstata

cDNA – DNA complementar

CPRC – Câncer de próstata resistente a castração

CRISPR – Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas(*ClusteredRegularlyInterspaced Short PalindromicRepeats*)

crRNA - CRISPR - derived RNA

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotpideos Fosfatados

HPB – Hiperplasia prostática benigna

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISUP – Sociedade Internacional de Patologia Urológica

mL - Mililitros

MMPs – Metaloproteinases de matriz

miR - microRNA

miRNA - MicroRNA

miR-21 - microRNA 21

MEC – Matriz extracelular

Ng - Nanogramas

PSA – Antígeno prostático Específico

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RB – Recidiva bioquímica

RA – Receptor de andrógeno

PR -Prostatectomia radical

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

RNAi – RNA de interferência

SFB – Soro Fetal Bovino

sgRNA – single guide RNA

TNM –Estádio Tumoral

TR – Toque retal da próstata

tracrRNA – trans - ativação de crRNA

#### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Classificação de risco para recorrência, segundo Critérios	
	7
Tabela 2.sgRNAs para a edição gênica de MMP9 e miR-21	21
<b>Tabela 3</b> . Principais achados do trabalho após a edição gênica com	CDISDD Caco
para MMP9 e miR-21	60

#### **LISTA DE FIGURAS**

	Estimativa								
estimados	Distribuição para 202	20,	exceto	pele	não	melanor	ma,	segundo	0
	lova graduaçã idiva de acord								
Figura 4. E	Biogênese dos	microl	RNAs						9
Figura 5. E	Estrutura geral	das m	etalopro	teinases.					12
	Eletroforese er s insertos dos								
_	Placas de bac					-		-	
	Gel de agarose								
_	Sequenciam dos em preto)		-			_			
	Viabilidade ce atamento com								
	Viabilidade ce tratamento co								
-	Viabilidade c amento com p		-			-	-		

<b>Figura 13.</b> Linhagens celulares Du 145 e PC-3M-luc-C6 transfectadas com o plasmídeo PX-330 sgRNA 2 para MMP9. Imagens em microscópio de fluorescência
<b>Figura 14.</b> Expressão gênica de MMP-9 nas linhagens celulares Du145 e PC-3M-luc-C6, transfectadas com o PX-330 sgRNA1 e 2 e controle ( <i>Scramble</i> ) sem transfecção
<b>Figura 15.</b> Western Blotting de MMP9 e βactina (controle) das linhagens PC-3M-luc-C6 e DU145, transfectadas com PX-330 sgRNA1 e 2 comparado ac Scramble
<b>Figura 16.</b> Edição gênica de MMP9 e miR-21 com CRISPR- Cas947
<b>Figura 17.</b> Expressão proteica de MMP9 e RECK em células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21 em linhagens de CaP metastáticas49
Figura 18. Expressão gênica de alvos do miR-21 em linhagens celulares de CaP metastáticas
Figura 19. Expressão gênica de CDH1, integrinas, BAX e mTOR em linhagens metastáticas de CaP54
<b>Figura 20.</b> Citometria de fluxo para avaliação de proliferação e apoptose em linhagens celulares de CaP metastático
Figura 21. Ensaio de invasão com células de CaP metastáticas58
<b>Figura 22.</b> Crescimento tumoral do modelo ortotópico de CaP. Imagens de Bioluminescência de camundongos Balb/c Nude, nos dias 5, 8, 12 e 14 após a inoculação das células PC-3M-luc-C6 na próstata dos animais

#### Resumo

Camargo JA. Edição genômica com CRISPR/Cas9 para avaliação do papel da MMP9 e seu regulador o microRNA-21 no câncer de próstata metastático: Estudo in vitro e in vivo[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

INTRODUÇÃO:O Câncer de Próstata (CaP), possui alta prevalência e representa um importante problema de saúde, com forte impacto econômico se considerarmos o rastreamento, diagnóstico, tratamento e a mortalidade pela doença. Com o avanço da metodologia do CRISPR, novas possibilidades se abriram para o entendimento e controle dos mecanismos de resistência celular. A edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas9 é efetiva na correção de mutações celulares que promovem resistência. O microRNA-21, que atua sobre o gene supressor tumoral RECK e o oncogene MMP-9, apresenta um papel importante no processo de migração e invasão das células tumorais para outros tecidos, gerando metástases. Devido à importância destas moléculas na carcinogênese, são necessárias maiores investigações sobre o seu papel no CaP. OBJETIVO: Avaliar o papel da MMP-9 e seu regulador indireto miR-21 no CaP, com a edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas9. MÉTODOS: Inicialmente foi feita a inserção das sequências de RNAs - guia (sgRNA) da MMP9 e miR-21 no plasmídeo PX-330. Em seguida, os plasmídeos com os insertos para MMP-9 foram transfectados em linhagens celulares de CaP DU145 e PC-3M-luc-C6. Foi feita a análise da expressão gênica e proteica da MMP9 por qPCR e Western Blotting, e a imunofluorescência. Os genes alvo do miR-21, incluindo RECK, MARKS, BTG2, PDCD4, as integrinas ITGB1 e ITGB3, CDH1, BAX e mTOR, foram avaliados por gPCR. Foi feita a citometria de fluxo para validar a expressão proteica relacionada à apoptose e proliferação celular, em células editadas para MMP9 e miR-21, utilizando os marcadores Annexin5 e 7-AAD. eKi67 respectivamente. Foi feito o ensaio de invasão com matrigel, e as células foram analisadas 48 horas após, com microscopia ótica. O grupo controle consistiu em células transfectadas com plasmídeo PX-330 sem as inserções de sgRNA(Scramble). O crescimento tumoral foi avaliado por um sistema de bioluminescência in vivo, após a injeção de 300 mil células, divididas em grupos, Scramble, editadas para MMP9 e miR-21 com CRISPR-Cas9 em camundongos Balb/c Nude. Esses animais foram acompanhados por 14 dias. RESULTADOS: Foi realizada a padronização das técnicas de digestão e inserção dos sgRNAs da MMP9 e miR-21 no plasmídeo PX-330, validadas por sequenciamento. Após essa etapa, observamos que as linhagens celulares transfectadas com o plasmídeo com sgRNA1 e 2 para MMP9 apresentaram GFP positivo, o que mostra a eficácia da transfecção. As células editadas para miR-21 com CRISPR-Cas9 apresentaram expressão gênica de RECK, MARKS, BTG2, e PDCD4 aumentadas em relação ao grupo Scramble. CDH1 e integrinas ITGB3 e ITGB1 foram aumentadas em células

editadas para MMP9 e miR-21 com CRISPR-Cas9 quando comparado ao *Scramble*.O aumento do BAX e a diminuição da expressão de mTOR foram observados nas células editadas para MMP9 e miR-21 com CRISPR-Cas9 comparação ao grupo *Scramble*. Estes resultados foram validados por citometria de fluxo, mostrando a redução da proliferação e aumento da apoptose em células editadas para MMP9 e miR-21 com CRISPR-Cas9 quando comparados ao *Scramble*. No ensaio de invasão celular, observamos que as células editadas para MMP9 e miR-21 apresentam taxas de invasão inferiores às do grupo *Scramble*. Nos experimentos *in vivo*, o crescimento tumoral foi significativamente reduzido nos animais que receberam células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9, quando comparadas ao *Scramble*. Não encontramos diferença nos animais que receberam células editadas para miR-21. **CONCLUSÃO:** A edição gênica por CRISPR-Cas9 de MMP9 e miR-21 em linhagens celulares de CaP metastáticas modula fatores moleculares que atenuam a proliferação e invasão celular e estimulam a apoptose, possivelmente impedindo a evolução do tumor.

Descritores: Neoplasias da próstata; MicroRNAs; Metaloproteinase 9 da matriz; Sistemas CRISPR-Cas; Apoptose; Expressão gênica.

#### **Abstract**

Camargo JA. CRISPR/Cas9 genomic editing to evaluate the role of MMP9 and microRNA-21 in metastatic prostate cancer: In vitro and in vivo study[thesis]. "São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

**INTRODUCTION:** Prostate Cancer (PCa) has a high prevalence and represents an important health problem, with a strong economic impact if we consider screening, diagnosis, treatment, and mortality from the disease. With the advance of CRISPR methodology, new possibilities have opened for the understanding and control of cellular resistance mechanisms. Gene editing by the CRISPR-Cas9 technique is effective in correcting cellular mutations that promote resistance. The microRNA-21, which acts on the tumor suppressor gene RECK and the oncogene MMP-9, has an important role in the process of migration and invasion of tumor cells into other tissues, generating metastases. Due to the importance of these molecules in carcinogenesis, further investigations of their role in PCa are needed. OBJECTIVE: To evaluate the role of MMP-9 and the indirect regulator miR-21 in PCa, with gene editing by CRISPR-Cas9 technique. METHODS: Initially, insertion of the MMP9 and miR-21 guide RNAs (sgRNA) seguences into the PX-330 plasmid was performed. Then, the plasmids with the inserts for MMP-9 were transfected into PCa DU145 and PC-3M-luc-C6 cell lines. MMP9 gene and protein expression analysis was performed by qPCR, Western Blotting, and immunofluorescence. The target genes of miR-21, including RECK, MARKS, BTG2, PDCD4, the integrins ITGB1 and ITGB3, CDH1, BAX and mTOR, were evaluated by gPCR. Flow cytometry was performed to validate protein expression related to apoptosis and cell proliferation, in cells edited for MMP9 and miR-21, using the markers Annexin5, 7-AAD andKi67 respectively. Matrigel invasion assays were performed, and cells were analyzed after 48 hours, with light microscopy. The control group consisted of cells transfected with plasmid PX-330 without the sgRNA insertions(Scramble). Tumor growth was assessed by an in vivo bioluminescence system in mice Balb/c Nude. After injection of 300.000 cells, divided into groups, Scramble, edited for MMP9 and miR-21 with CRISPR-Cas9 These animals were followed up for 14 days. RESULTS: We standardized the techniques of digestion and insertion of the sgRNAs of MMP9 and miR-21 into the plasmid PX-330, validated by sequencing. After this step, we observed that the cell lines transfected with the plasmid with sgRNA1 and 2 for MMP9 showed positive GFP, which shows the efficiency of the transfection. Cells edited for miR-21 with CRISPR-Cas9 showed increased gene expression of RECK, MARKS, BTG2, and PDCD4 compared to the Scramble group. CDH1 and integrins ITGB3 and ITGB1 were increased in cells edited for MMP9 and miR-21 with CRISPR-Cas9 when compared to Scramble. Increased BAX and decreased mTOR gene expression were observed in cells edited for MMP9 and miR-21 with CRISPR-Cas9 compared to the Scramble group. These results were validated by flow cytometry, showing reduced proliferation and increased apoptosis in cells edited for MMP9 and miR-21 with CRISPR-Cas9 compared to Scramble. In the cell invasion assay, we observed that cells edited for

MMP9 and miR-21 have lower invasion rates than the Scramble group. In the in vivo experiments, tumor growth was significantly reduced in animals that received cells edited with CRISPR-Cas9 for MMP9 compared to Scramble. We found no difference in animals that received cells edited for miR-21. **CONCLUSION:** Gene editing by CRISPR-Cas9 for MMP9 and miR-21 in metastatic PCa cell lines modulates molecular factors that attenuate cell proliferation and invasion and stimulate cell apoptosis, possibly preventing PCa tumor evolution.

Descriptors: Prostatic neoplasms; MicroRNAs; Matrix metalloproteinase 9; CRISPR – Cas systems; Apoptosis; Gene expression.

## 1. Introdução

#### 1.1 Câncer de Próstata

Dentre as neoplasias maiscomuns no mundo, está o câncer de próstata (CaP), classificado como osegundomais frequenteem homens, e a segunda causa de morte por neoplasia nessa mesma população. As estimativas mostram que em 2020, foram diagnosticados 1.414.259 novos casos em todo o mundo, com uma mortalidade de 6,8%. As maiores taxas foram observadas nos países da Europa, América do Norte e Austrália, ou seja, nas regiões mais desenvolvidas.Em relação a mortalidade, estimou-se 375.304 casos em todo o mundo, o que corresponde a 5ª principal causa de morte entre os homens (Figura 1) (1, 2).



**Figura 1.** Estimativa de novos casos de câncer no mundoem 2020. Fonte: Globocan 2020.

No Brasil, dados do INCA mostraram que o CaP é o mais comum entre homens, excluindo os tumores cutâneos. As estimativas demostram 65.840 homens foram diagnosticados com CaPem 2020. A distribuição mostra que nas Regiões Sul e Sudeste concentra-se grande parte da ocorrência de novos casos, com 96,85/100

mil na Região Sul, 69,83/100mil na Região Sudeste, 66,75/100mil na Região Centro-Oeste, 56,17/100 mil na Região Nordeste e 29,41/100 mil na Região Norte(Figura 2) (3)

Localização primária	Casos	%	
Próstata	65.840	29,2%	
Cólon e Reto	20.540	9,1%	Homens
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%	
Estômago	13.360	5,9%	
Cavidade Oral	11.200	5,0%	
Esôfago	8.690	3,9%	
Bexiga	7.590	3,4%	•
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	•
Laringe	6.470	2,9%	1
Leucemias	5.920	2,6%	

<sup>\*</sup> Números arredondados para múltiplos de 10

**Figura 2.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, exceto pele não melanoma, segundo o INCA.

O CaP representa um importante problema de saúde, com forte impacto econômico se considerarmos o rastreamento, diagnóstico, tratamento e a mortalidade pela doença. As evidências apontam que os fatores genéticos e ambientais possuem um papel relevante na evolução da doença, porém, são necessários mais estudos(4).

Os principais fatores de risco descritos hoje para o CaP são idade, história familiar e etnia. A maior parte dos casos são diagnosticados em pacientes com mais de 65 anos de idade, sendo que apenas 1% dos homens com menos de 50 anos possuem a doença (5). A incidência e mortalidade aumentam significativamente em

pacientes com idade mais avançada(6). Além disso, foi constatado que pacientes da raça negra desenvolvem o CaP em uma maior frequência, consequentemente com uma evolução mais agressiva. Histórico familiar, de pai ou irmão com CaP, aumenta o risco em 3 a 10 vezes, em relação à população geral, em pacientes com menos de 60 anos de idade (7). Alguns trabalhos mostraram que fatores exógenos, como dieta rica em gordura animal, carnes vermelhas, tabagismo e etilismo também são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de CaP (8). O excesso de calorias consumidas juntamente com o sedentarismo, levam ao acúmulo de tecido adiposo e obesidade, produzindo fatores inflamatórios em excesso, e culminando em inflamação subclínica, que pode ser um importante fator de risco para a doença (9).

Para o rastreamento do CaP, é feito inicialmente o toque retal (TR) e a dosagem da concentração sérica do antígeno prostático específico (PSA) (10). A associação desses dois fatores é importante para a possível indicação para a biópsia, o que possibilita uma maior chance de cura e redução em 29% da mortalidade (11). Em relação às concentrações do PSA,os valores ainda são controversos. Não pode ser considerado um marcador específico do câncer, pois pode estar alterado em hiperplasia benigna da próstata (HPB), ou prostatites. Porém, PSA ≥ 2,5ng/mL em homens com mais de 50 anos e ≥ 4,0 ng/mL em homens acima de 60 anos é indicativo de biópsia (12).

Em casos de elevados níveis de PSA e TR alterado, o único método indicado para o diagnóstico definitivo do CaP é a biópsia prostática guiada pela ultrassonografia transretal (BTRUS) seguido pelo estudo anatomopatológico (13).

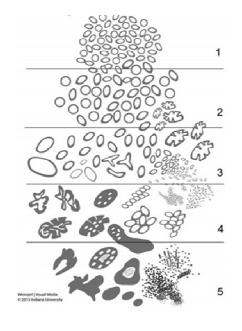
Para a análise da biópsia, aplica-se a graduação de Gleason, que classifica o CaP e avalia o padrão da arquitetura glandular do tecido e sua relação com o estroma prostático. O diagnóstico final é dado pela soma dos valores dos dois focos

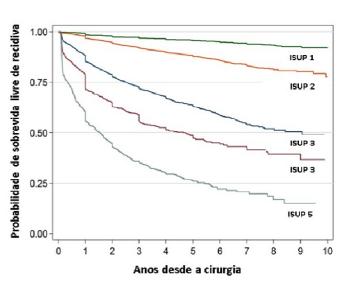
mais representativos da neoplasia, que será classificada em um escore de 2 a 10. Tumores com um escore de Gleason 2 a 6 são considerados bem diferenciados e menos agressivos, enquanto o escore de 7 a 10, são considerados mais agressivose mais indiferenciados(14).

Sabe-se que 85% dos casos de CaP são classificados como Gleason 6 e 7 (14, 15). A maioria dos trabalhos mostra que raramente é feito um diagnóstico de um tumor com escore de 2 a 5, sendo que na biópsia, a menor graduação é o Gleason6 (3+3). Sendo assim, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) propôs um novo modelo de graduação que classifica os tumores de 1 a 5 (Figura 3) (16).

Fig ura 3: Nov gra dua ção pro pos ta pel а ISU Р par a o Ca Ре as cur

vas de





Gleason	ISUP	
3+3	1	
3+4	2	
4+3	3	
4+4, 3+5, 5+3	4	
4+5, 5+4, 5+5	5	

sobrevida livre de recidiva de acordo com a nova graduação.

A classificação em grupos de risco pode ser feita pelo sistema D´Amico, o qual considera as concentrações de PSA, o escore de Gleason da biópsia e o estadiamento clínico. A progressão da doença pode estar relacionada ao grau de diferenciação, que pode ser variado, existem tumores de baixo grau que têm evolução indolente enquanto outros possuem alta capacidade de progressão (Tabela 1) (17, 18).

**Tabela 1:**Classificação de risco para recorrência, segundo Critérios de D´Amico.

RISCO	BAIXO	INTERMEDIÁRIO	ALTO
PSA	<10 ng/mL	10-20ng/mL	>20 ng/mL
GLEASON	<7	7	8-10
ESTÁDIO CLÍNICO	cT1-2a	T2b	cT2c

A diferenciação histológica e classificação pelo escore de Gleason/ISUP são considerados fatores prognósticos importantes. Os casos mais avançados, foram associados a alta possibilidade de progressão do CaP com recidiva bioquímica (RB). Sendo assim, foram publicados diversos trabalhos que mostram os mecanismos moleculares que esses tipos celulares mais agressivos desenvolveram para sobrevivência e progressão da doença(19).

Os tratamentos são feitos de acordo com o escore de Gleason/ISUP, idade, estadiamento patológico e comorbidades prévias do paciente, que possa trazer riscos e possíveis efeitos adversos ao tratamento.Deve-se considerar a vigilância ativa, nos casos de baixo risco.Para os demais riscos, o tratamento curativo, seja ele

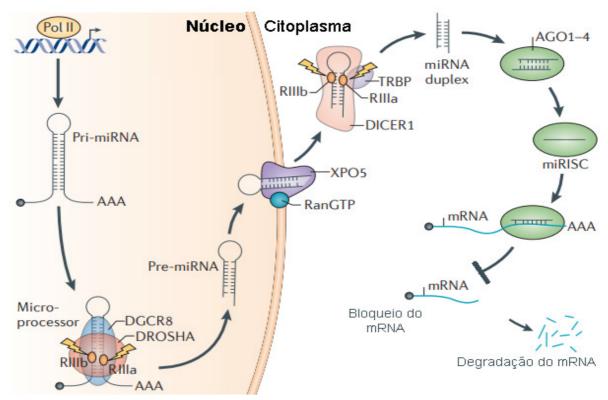
cirúrgico, radioterápico é indicado para os casos localizados ou localmente avançados.O tratamento sistêmico, com bloqueio hormonal e quimioterapia é indicado para os casos metastáticos(20). Margens cirúrgicas comprometidas, após a prostatectomia radical (PR), está relacionado com a progressão da doença e recidiva bioquímica (21).

Na doença metastática, o tratamento consiste na terapia antiandrogênica, com a castração clínica ou cirúrgica, com o intuído de diminuir os níveis séricos de PSA(22).

#### 1.20 Papel dos microRNAs

Múltiplas formas de pequenas moléculas de RNAs estão relacionadas com a supressão da tradução em eucariotos, como estimulador de uma atividade celular, indução de apoptose, diferenciação, proliferação e até mesmo degradação de RNAm(23). Essas pequenas moléculas, conhecidas como microRNAs, quando maduras são constituídas por 19 a 30 nucleotídeos. São transcritos pela enzima RNA polimerase II, juntamente com precursores de RNA em forma de grampo, conectados por uma região terminal de RNA fita simples (alça). Essas estruturas, grampo e alça formam uma capa poli A, ligada à região 3´. Esse é o processo de síntese dos miRNAs primários (pri-miRNAs). Após a síntese desse complexo no núcleo da célula, ocorre a maturação do pri-miRNA em pré-miRNA, o qual sofre a ação de um microprocessador (Drosha-DGCR8), enzimas de RNAse-II, que realizam o fenômeno *cropping*, que é a clivagem da capa do pri-miRNA. O pré-miRNA, com aproximadamente 70 nucleotídeos é transportado para o citoplasma pela enzima Exportina 5. Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA sofre a ação da enzima Dicer,

que cliva a alça, formando o miRNA duplex, contendo o miRNA maduro e sua fita complementar de aproximadamente 22 nucleotídeos (24). No complexo silenciador



induzido por RNA (RISC), é montada uma das fitas do complexo duplex de miRNA, que age sobre o RNA mensageiro alvo, causando o bloqueio da tradução em proteína ou sua degradação. O mesmo miRNA pode agir em mais de 100 RNAm alvos com atividades diferentes(Figura 4) (23).

Figura 4. Biogênese dos microRNAs(25).

Até hoje, mais de 1000 sequências de miRNAs foram identificadas em diferentes regiões do DNA, como intergênicas ou íntrons, fazendo parte da fita codificante ou não codificante(23).

Grande parte dos miRNAsforam caracterizadoscomo componentes moleculares chave em estados normais e patológicos das células. Muitos trabalhos mostraram a importância destas moléculasna biologia do câncer através do controle

da expressão dos genes alvo facilitando o crescimento tumoral, invasão e angiogênese (26). Além disso, os miRNAs podem atuar como supressores tumorais, inibindo o desenvolvimento tumoral (27).

Dentre os miRNAs que tem como alvo os genes supressores tumorais, chamados de oncomiRs,um dos primeiros miRNAsdetectados em humanos, altamente regulados em diferentes modelos tumorais é o miR-21(28). Sabe-se que os níveis da expressão estão relacionados aos fatores clínico-patológicos, sugerindo que este miRNA pode estar associado a tumores mais agressivos e metastáticos (29).localizado Em humanos. está no cromossomo 17q23.2, (http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/MIRN21ID44019ch17g23.html), residente no décimo intron do gene TMEM49. Estudos mostraram que o aumento da expressão do miR-21 está associado a diversos modelos tumorais, como glioblastoma, câncer de pulmão, estômago, mama, hepatocarcinoma, linfoma e câncer de próstata (27, 30, 31). Em glioma, foi demonstrado que o miR-21 pode estar associado ao aumento da expressão de STAT3 e HIF1-α, mediador celular de resposta à hipóxia. Estudos recentes mostraram que genes associados à apoptose, como PDCD4, BCL2 e BTG2 podem ser regulados pelo miR-21, bem comoMARCKS, que pode regular a adesão e invasão celular (32-34).

Além disso, observou-se que o miR-21 pode regular a expressão de RECK, que por sua vez, regula MMPs. Sendo assim, a inibição de miR-21 diminui a atividade de MMP *in vitro* e *in vivo* em glioma (35). Estudos do nosso grupo mostraram que o miR-21 pode estar relacionado ao comportamento do CaP, sendo que sua superexpressão foi associada à recorrência bioquímica, possivelmente direcionada ao bloqueio da expressão de RECK, o que promove a invasão de células tumorais (36, 37). Porém, ainda hápoucos trabalhos publicados sobre esse

assunto, sendo necessária maior investigação sobre esse miRNA em relação aos possíveis marcadores moleculares.

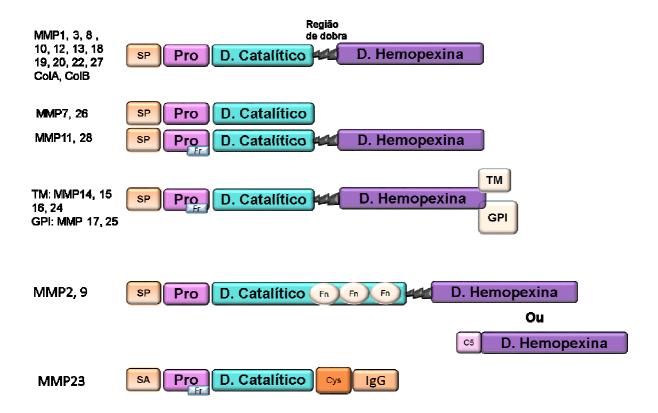
#### 1.3 Metaloproteinase da Matriz

A proteína indutora de reversão tumoral, rica em cisteína e com motivos kazal (RECK), apresenta um papel essencial no desenvolvimento, morfogênese, remodelação e estabilização arquitetural de tecidos normais, assim como migração e interação entre células(38, 39). RECK é conhecido como um supressor de tumor e metástases, por demostrar um papel crucial na regulação de invasão e atividade metastática de células tumorais(39). A alta expressão de RECK está positivamente associada à sobrevida de pacientes com câncer de pulmão, mama, cólon, próstata, entre outros(40-43),sendo que esta proteína regula negativamente metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-1, MMP-2 e MMP-9(44). A baixa expressão de RECK está associada à alta expressão de MMPs, ou seja, RECK reduz a atividade de MMPs, que, consequentemente, diminui o mecanismo de invasão de células tumorais e metástases.

O meio extracelular possui uma grande quantidade de compostos, como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas chamadas fibronectina e laminina, que fazem parte da matriz extracelular (MEC). Essas proteínas são essenciais para a estrutura do tecido, bem como crescimento e diferenciação (45). Preenchem todo o espaço existente entre as células, como o epitélio do tecido conjuntivo. Sendo assim, as MMPs são responsáveis pelo remodelamento do meio extracelular. São proteases pertencentes a um grupo de aproximadamente 20 enzimas que podem ser divididas em subgrupos, com sequências e características específicas,

responsáveis por degradar os componentes daMEC, causando a renovação do tecido, cicatrização, angiogênese e embriogênese. Essas enzimas são secretadas por células onde o aumento de fatores de crescimento e inflamatórios, como TGF-β e IL-1β, levam à maior expressão e atividade de MMPs que, consequentemente, promovem o crescimento e reestruturação do tecido (46).

São compostas por 4 regiões: o pró-domínio, domínio catalítico, uma região de dobra *("hingeregion")* e um domínio hemopexina (Figura 5). São divididas em grupos: Colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas.



**Figura 5.**Estrutura geral das metaloproteinases. As MMPs apresentam estruturas divididas em domínios, como pró-peptídeo, o que caracteriza a latência das enzimas, o domínio catalítico portador de um íon zinco. A estrutura TM da enzima é transmembranar, e glicosilfosfatidilinositol (GPI) funciona como uma âncora. Esses domínios TM e GPI, que estão presentes em algumasMMPs são anexados ao domínio hemopexina, que determina substratos e inibidores de cada MMP. A estrutura C5 é semelhante à do colágeno. Essas proteínas são semelhantes a

colagenases. A estrutura Fn, característica das MMPs, 2 e 9, são repetições de fibronectina. SP e SA são peptídeos de sinais(47).

Sabe-se que a atividade de MMPs na carcinogênese é de extrema importância, por serem enzimas que degradam a MEC, promovendo o deslocamento e invasão de células tumorais para outros tecidos, ou seja, sua expressão alterada pode contribuir para o crescimento de CaP, metástases e angiogênese em linhagens celulares comoLNCaP, DU-145 e PC-3, e que apresentam baixo, moderado e alto potencial metastático respectivamente (48),(37, 49).Na literatura, esses dados são controversos, sendo necessária maior investigação sobre o assunto. Em 2009, nosso grupo publicou um estudo mostrando que polimorfismos das MMPs em regiões promotoras podem estar associados ao prognóstico de CaP (50). Em 2011, nosso grupo demonstrou que em pacientes submetidos àPR, com neoplasia maligna da próstata, as amostras de espécimes cirúrgicos apresentaram uma alta expressão de MMP9, relacionada à níveis de PSA acima de 10ng/ml (51).

Em trabalhos aprofundados sobre a regulação de RNAm e miRNAs, são utilizadas ferramentas como antisenseoligonucleotídeos (ASO), e também os RNAs de interferência (RNAi), que correspondem a pequenas moléculas de complementariedade que se ligam à região promotora e inibem ou alteram a expressão de genes. Porém, existem limitações para esse mecanismo, sendo que o silenciamento pode não ocorrer por completo, e apenas diminuir a expressão gênica, sendo uma ferramenta não tão eficaz para o bloqueio da MMP9(52).

#### 1.4A Técnica de CRISPR

Em procariotos, foi observado um mecanismo de proteção contra infecção de vírus, o qual pode ser comparado à imunidade adaptativa, previamente descrita por ocorrer apenas em eucariotos. Sendo assim, as células procarióticas desenvolveram um sistema de proteção, guiadopelo próprio RNA de parasitas, que é distinto do mecanismo de RNAi(53). Essas células integram o material genético externo e clivam, com as enzimas Cas 1 e 2, gerando pequenos fragmentos que serão inseridos no seu próprio cromossomo, em sequências repetidas e sequências espaçadoras, intercaladas e de função desconhecida, desenvolvendo a técnica conhecida como Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) (54). Logo após a origem dessa sequência, ocorre a transcrição ininterrupta do loco CRISPR, gerando várias sequências repetidas e espaçadores, inseridos em um único RNA longo seguido do gene Cas, dando origem ao crRNA (*CRISPR-derived RNA*).

Em seguida, foi demonstrado que essas sequências têm origem extra cromossômica, proveniente de patógenos que são incapazes de infectar bactérias portadoras de espaçadores cujas sequências são correspondentes a trechos de seus genomas. Ou seja, moléculas de RNA geradas a partir desses espaçadores são complementares ao patógeno invasor. Dessa forma, as bactérias adquiriram uma memória capaz de reconhecer e destruir o genoma de invasores (55). Posteriormente, pesquisadores observaram que existe mais de um sistema do CRISPR. Um deles é regulado pela proteína Cas3, a qual juntamente com crRNA, especifica o sítio de clivagem dentro do genoma invasor e cliva o material genético, causando sua destruição (56).

No segundo sistema de CRISPR, foi observada uma estrutura chave no processo de biogênese do crRNA, a sequência não codificante *trans* - ativação de

crRNA (tracrRNA), que hibridiza com o crRNA, para facilitar a ligação com o RNA alvo que será clivado pela proteína Cas9, levando à perda da função (56). Desde então, alguns trabalhos sugeriram que o sistema CRISPR-Cas9 pode ser usado para manipulação do genoma de mamíferos e aplicado à ciência básica, biotecnologia e medicina, considerando que a Cas9 é compatível com outras espécies (57). A vantagem desse mecanismo ser usado em eucariotos é que o sistema é simples, de fácil manipulação e altamente específico.

Para aplicar a técnica de CRISPR em laboratório, foi criado o single guide RNA (sgRNA ou gRNA), uma molécula quimérica resultante da junção do crRNA e tracrRNA, gerada para acumular as duas funções, que são altamente dependentes de suas estruturas. Assim, a técnica de CRISPR utiliza apenas dois elementos exógenos: a proteína Cas9 e sgRNA, facilitando o procedimento experimental (52).Com o CRISPR - Cas9, surgiram diversas possibilidades de estudos em diversas doenças, como por exemplo a inibição de genes que regulam vias inflamatórias pode reverter o quadro de osteoartrite, reduzindo a senescência e morte de células musculares (58). Outro estudo mostrou que é possível gerar modelos de animais transgênicos para estudos com ablação de genes específicos, onde a Cas9 juntamente com o sgRNA, desenhado para o gene de interesse e transcrito, podem ser injetados diretamente em zigotos fertilizados para obter a modificação genética hereditária em um ou vários alelos, em modelos de roedores, e posteriormente avaliar as consequências ou soluções dessas alterações no metabolismo do animal, como uma possível terapia gênica. Com esse novo mecanismo, o tempo de geração de animais transgênicos pode ser reduzido a mais de 1 ano para apenas algumas semanas. Tal avanço irá facilitar o custo – benefício, e melhorar a especificidade dos dados obtidos(59).

Após a primeira aplicação do sistema CRISPR-Cas9 em cultura de células e em animais, surgiu a possibilidade de ser usado para exploração de mecanismos e tratamentos em câncer, sendo que esse sistema atua na reparação de genes e é altamente específico e controlável (60). Um recente estudo mostrou que CDK11 poderia ser um novo alvo terapêutico para osteosarcoma, por ser altamente relacionado ao crescimento dessas células. Portanto, ao usar o sistema CRISPR-Cas9 para silenciar o CDK11 em linhagens celulares, foi detectado uma redução significativa na proliferação e invasão, indicando que esse novo método com CDK11, pode ser considerado como um novo alvo terapêutico para osteosarcoma (61).

A habilidade de células tumorais em desenvolver resistências à quimioterapia é a causa primordial para a ineficiência do tratamento. Porém, a aplicação do sistema CRISPR-Cas9 para inativar ou corrigir os genes relacionados à resistência à quimioterapia, pode ser uma estratégia essencial para o aumento da eficiência dos tratamentos quimioterápicos que já estão no mercado (62). Outra estratégia celular de sobrevivência é a autofagia. Entretanto, um grupo de pesquisadores mostrou que a eficiência da inibição da autofagia pelo método de CRISPR-Cas9, superou o mecanismo de RNAi, pela especificidade da interrupção completa da autofagia(63).

Em humanos, um estudo recente mostrou que o CRISPR-Cas9 pode ser aplicado em células sanguíneas, que foram coletadas do paciente com câncer de pulmão, feitas alterações genéticas *in vitro*, e essas células modificadas, após serem reinseridas na corrente sanguínea do próprio paciente, poderiam apresentar um papel importante da redução da proliferação do tumor (64).

Os dados sobre o efeito do bloqueio da MMP9 e miR-21 no CaPcom objetivo terapêutico, ainda são controversos. Através do sistema CRISPR-Cas9 em modelos metastáticos, será possível estudar com mais confiabilidade o efeito da edição do

gene e a perda total de sua função no microambiente tumoral, bem como avaliara inibição do mecanismo proliferativo e metastático com esse novo método.

## 2. Objetivos

#### 2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do bloqueio do miR-21 e do geneMMP-9,pelo método de CRISPR-Cas9, no CaP metastático.

#### 2.2 Objetivos Específicos

#### **IN VITRO**

- Padronização da técnica de edição gênica, CRISPR-Cas9,para o bloqueio do miR-21e do gene MMP-9,em cultura celular deCaP metastático, linhagens PC-3M-luc-C6 e DU145.
- Análise da apoptose, proliferação e invasão nas linhagensPC-3M-luc-C6 e DU
  145 com o bloqueio do miR-21 e do gene MMP-9.
- Análise da expressão dos genes RECK, (inibidor de MMP-9) PDCD4, BTG2 e MARCKS, (alvos de miR-21)nas linhagensPC-3M-luc-C6 e DU145, editadas por CRISPR-Cas9.

#### IN VIVO

Inoculação das células de linhagem PC-3M-luc-C6, editadas com o sistema
 CRISPR-Cas9 para o bloqueio do miR-21 e do gene MMP-9, em camundongos Balb/c Nude,com posterior análise do estabelecimento e do crescimento tumoral por bioluminescência pelo método IVIS.

3. Materiais e Métodos

#### 3.1Linhagens Celulares

As linhagens de CaP metastático PC-3M-luc-C6 e DU145 do*MD Anderson Cancer Center (Universityof Texas/Novartis Institute for BiomedicalResearch)*foram adquiridasda *CaliperLiffeSciences (Hopkintos, MA, EUA)* e cultivadas em meio MEM suplementadas com glutamina. Nas culturas, foi adicionado 10% de soro fetal bovino e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St. Louis, MO, EUA) a 1% a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.A linhagem PC-3M-luc-C6 é derivada de metástase óssea humana, transfectada com o gene *Luciferase*do vaga-lume (Firefly) do plasmídeo pGL3. A linhagem celular DU145 é derivada de metástase cerebral.

#### 3.2 Crispr-Cas9

A padronização dos experimentos com Crispr-Cas9 foi baseada nométodo publicado por Zhang e cols.(65). Foi feita a seleção de 3 sequências de sgRNAs, utilizando a ferramenta <a href="https://crispr.mit.edu">https://crispr.mit.edu</a>. Dessas sequências, 2 foram no exon 1 e 1 no exon 2 para MMP9, e 2 sgRNAs para miR-21 (Tabela 2).

Tabela 2. sgRNAs para a edição gênica de MMP9 e miR-21.

GUIDES	TOP	воттом
SGRNA 1 MMP9	CACCGgtgagaaccaatctcaccgac	AAACgtcggtgagattggttctcacC
SGRNA 2 MMP9	CACCGgaagggtggactggcgctgtc	AAACgacagcgccagtccacccttcC
SGRNA 3 MMP9	CACCGgcatgcgaaccccacggtgcg	AAACcgcaccgtggggttcgcatgcC
SGRNA 1 MIR-21	CACCggtcatggcaacaccagtcgat	AAACatcgactggtgttgccatgacC
SGRNA 2 MIR-21	CACCggatgttgactgttgaatctca	AAACtgagattcaacagtcaacatcC

Utilizamos o plasmídeo px-330, o qual possui sequência para resistência a ampicilina epuromicina, GFP, Cas9, e o sítio de restrição para a enzima de digestão. Digerimos o plasmídeo na concentração de 1ug por 30 minutos a 37ºC com a enzima Bbsl. A validação da digestão foi feita em gel de agarose 0,8%.

Foi feito o anelamento dos sgRNAs top + bottom, que são complementares, na concentração de 100μM, cada um deles com o tampão da enzima T4 Ligase. No termociclador, a reação foi: 37°C por 30 minutos; 95°C por 5 minutos; e a cada minuto, a temperatura diminuiu em 5°C, até chegar a 25°C.

Após o anelamento dos sgRNAs, foi feita a inserção com a enzima T4 Ligase, dos sgRNAs ao plasmídeo previamente digerido com a enzima Bbsl. Para a reação de inserção, foi utilizado 50ng de plasmídeo PX-330, 1μl dos sgRNAs anelados, diluídos em 1:200, 1μl da enzima T4 Ligase por 10 minutos a 25°C.

Após a inserção dos sgRNAs, foi feita a transformação em bactéria Dh5α competente. Foram utilizados 25ng do plasmídeo com o sgRNA; 5μl de CaCl<sub>2</sub>1M por 30 minutos a 0°C; 1 minuto a 42°C; 2 minutos a 0°C novamente. A transformação foi feita por choque térmico. As bactérias foram expandidas em 500μl em meio SOC,

por 2 horas a 37°C e posteriormente, plaqueadas em meio de cultura LB com ágar e ampicilina, *overnight*.

Foram selecionadas as colônias e expandidas em meio líquido de cultura LB com ampicilina, no volume de 3ml. Esses plasmídeos foram então extraídos das bactérias com o kit mini prep(Thermo#k210011), onde as amostras de bactéria foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspendidoem 250µl com o tampão R3 com RNAse A. Em seguida, foram adicionados 250µl do tampão L7 e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 350µl do tampão N4. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12000g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna com um tubo de 2 ml e centrifugado a 12000g por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500µl do tampão de lavagem (W10) com etanol na coluna. As amostras foram incubadas por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugadas a 12000/g por 1 minuto. O líquido foi descartado e 700µl do tampão (W9) com etanol foram adicionados à coluna. Foi feita novamente a centrifugação a 12000g por 1 minuto. O líquido foi descartado e a coluna foi novamente centrifugada a 12000g por 1 minuto. Após a centrifugação, em um novo tubo, foram adicionados àcoluna, 75µl do tampão TE a 70°C e incubados por 1 minuto em temperatura ambiente. Novamente foi feita a centrifugação e as amostras foram quantificadas em um espectofotômetro (Nanodrop DN-1000, wilmington, EUA) (260/280 nM) e armazenadas a -20°C.

Após a extração, esses plasmídeos com os insertos foram digeridos com a enzima BbsI e validados em um gel de agarose 0,8%. Por fim foi feita a PCR e reação de sequenciamento dos plasmídeos com os insertos do sgRNA para

validação final dessas amostras, sob as seguintes condições: *Primer Fwd:* 5 GGGCCTATTTCCCATGATTCC-3′ e *Rev*: 5 CGCGCTAAAAACGGACTAGC-3′. Os *primers* e DNTP foram utilizados na concentração de 10μM e a reação de PCR foi em: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos em 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos. Foi feito um gel de agarose para validar a reação. No sequenciamento, foram feitas duas reações separadas, com a mesma amostra de PCR, porém uma com o *primerFwd* e uma com o *primerRev*. Foi adicionado o reagente *Big Dy* e o Tampão. A reação foi sob as seguintes condições: 96°C por 2 minutos, 35 ciclos de: 96°C por 1 segundo, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a confirmação por sequenciamento, as amostras das bactérias com os plasmídeos e seus respectivos insertos foram expandidas em 450ml de meio de cultura LB com ampicilina, *overnight*a 37ºC.

kit Após expansão. essas amostras foram extraídas com Maxiprep(#K210017). As bactérias foram centrifugadas a 4000/g por 10 minutos, em temperatura ambiente, e o meio de cultura foi descartado. Foram adicionados ao pellet, 30 ml do tampão (EQ1), diretamente à coluna do kit, até passar todo o líquido pela força da gravidade. O filtrado foi descartado. Nas amostras, foram adicionados 10ml do tampão (R3) com RNAse A. Em seguida, foram adicionados 10ml do tampão(L7). Após 5 minutos, foram adicionados 10 ml do tampão(N3). Todo o conteúdo foi adicionado à coluna, até passar todo o líquido pela força da gravidade. Em seguidaforam adicionados 10 ml do tampão (W8). O cartucho da coluna foi descartado e foi feita novamente a lavagem com 50ml do tampão (W8). O filtrado foi descartado. A coluna foi adicionada a um tubo estéril, e 15 ml do tampão de eluição (E4) foram aplicados pela força da gravidade. A coluna foi descartada e junto ao filtrado foram adicionados 10,5ml de isopropanol e centrifugados a 12000g por 30 minutos,a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 5ml de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 12000g por 5 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram abertos para secar o etanol totalmente, por 10 minutos. Ao *pellet* foram adicionados 500μl de TE. As amostras foram quantificadas e armazenadas a -20ºC.

#### 3.3 Ensaio de viabilidade celular

Para os ensaios de viabilidade celular, foi utilizado o kit de viabilidade celular Muse™ (MCH100102). Foram plaqueadas 20.000 células em meio de cultura MEM, em 10% de SFB, livre de antibiótico. Após os tratamentos, foram adicionados200µL do reagente presente no kit e as amostras permaneceram por 5 minutos em temperatura ambiente livre de luz, conforme recomendações do fabricante. Foi feita a marcação celular com 2 corantes de ligação de DNA presentes no kit, de acordo com sua permeabilidade. Os dados gerados pelo Muse ™ *Count&Viability*fornecem a contagem de células viáveis (células / mL); contagem total de células (células / mL) e porcentagem de viabilidade da amostra.

#### 3.4 Ensaio de transfecção

Foram feitas as transfecções dos plasmídeos PX-330 com os sgRNAs 1 2 e 3 para MMP9 e sgRNA 1 e 2 para miR-21 com o reagente *Xfect™ TransfectionReagent#631317.* Foram plaqueadas 20.000 células em uma placa de 6 poços. No dia seguinte, após as células aderirem, foram adicionados 7,5µg dos

plasmídeos ao tampão do reagente em um volume de 100μl e homogeneizado por 10 segundos. Em seguida, foram adicionados 2,25μl do polímero e homogeneizado por 10 segundos. Esse mix foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, todo o conteúdo foi adicionado ao meio de cultura juntamente com as células aderidas na estufa a 37ºC, durante 24 horas. Após esse período, foi feita a troca do meio de cultura. A validação da transfecção foi feita pelo GFP (*Green fluorescentprotein*).

### 3.5 Ensaios de proliferação por citometria de fluxo

Para determinar a porcentagem de proliferação celular por citometria de fluxo, foi utilizado o *Muse® Ki67 Proliferation kit MCH100114*, que quantifica as células PC-3M-luc-C6 marcadas com o anticorpo para proliferação Ki67.

Primeiramente o equipamento foi calibrado com os reagentes do mesmo kit, garantindo a confiabilidade dos dados.

Para a realização do ensaio, as células foram plaqueadas (1 x 10<sup>5</sup>) com 1% de soro e livre de antibióticos. Após o experimento de edição gênica com CRISPR-Cas9, essas células foram ressuspendidas com 50μl da solução de fixação, e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, foi adicionado 150μl da solução tampão e centrifugado e descartado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 100μl da solução de permeabilização e incubado novamente por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 100μl da solução tampão, centrifugado e descartado o sobrenadante. Após a lavagem, foi feita a incubação com 50μl de solução tampão por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 10μl do anticorpo *Muse® Hu Ki67-PE* e

incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Feito isso, foi adicionado 150µl da solução tampão e as células foram analisadas no mini citômetro Muse™ como indicado pelo fabricante. Esse experimento foi realizado em triplicata.

#### 3.6Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

O ensaio para avaliar a apoptose celular foi realizado utilizando o *Muse®* annexin V DeadCell Kit MCH 100105, o qual analisou a apoptose inicial, tardia e necrose em linhagens celulares de CaP. Foi adquirida a porcentagem e concentração de células de cada uma dessas etapas.

Antes do experimento, foi realizada a calibragem do aparelho com kit Muse™ System Check Kit para uma melhor confiabilidade nos dados obtidos.

Na realização do ensaio, foram plaqueadas 1 x 10<sup>5</sup> células com soro a 10%, livre de antibiótico. Após o experimento de edição gênica com CRISPR-Cas9, essas células foram ressuspendidas em 100µl do reagente Anexina V, incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente, em ausência de luz. Após a incubação, as células foram analisadas no mini citômetro Muse™ como indicado pelo fabricante.

#### 3.7Isolamento de RNA

Para a análise de expressão gênica dos ensaios *in vitro*,o RNA foi extraído pelo método do kit mirVana (*Ambion, Austin, TX, EUA*), seguindo as recomendações do fabricante. Com esse kit, foi feito o isolamento do RNA total do *pellet* das células tripsinizadas. Aos tubos com as amostras, foram adicionados 250µl do tampão de lise e 25µl do aditivo. Após homogeneizar, as amostras foram deixadas por 4 min no

gelo. Em seguida, foram adicionados 250µl da solução fenol-clorofórmio, e posteriormente as amostras foram vortexadas e centrifugadas a 10 000 RPM por 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi passado para outro tubo, e foi adicionado um terço do volume de etanol 100%. Esta solução foi transferida para uma coluna e centrifugada a 10 000 RPM por 30 segundos. Na coluna está a amostra de RNA e o líquido passado por ela foi descartado. Logo após, foram feitas as etapas de lavagens do RNA, com 700µl de *washsolution*, e duas lavagens com 500µl da solução dois terços *washsolution*, centrifugadas por 30 segundos a 10 000 RPM. Após esse processo, o filtrado foi descartado e na coluna foram adicionados 50µl de água livre de *RNAse* a 95°C, para a eluição do RNA. As amostras foram quantificadas em um espectofotômetro (*Nanodrop DN-1000*, *wilmington, EUA*) (260/280 nM) e armazenadas a -20°C.

#### 3.8Síntese do DNA complementar

Após a quantificação do RNA, foi feita a síntese do DNA complementar (cDNA), e realizada a transcriptase reversa com iniciadores randômicos, utilizando a enzima *MultiScribe® Reverse Transcriptase* (ApliedBiosystems, Fostercity, CA, EUA).

O RNA total foi diluído em água livre de nucleasse, em volume final de 20μl na concentração de 50ng por μl. Dessa diluição, foram utilizados 4μl da amostra e 16μl do mix de cDNA, que contém 2μl da enzima transcriptase reversa (50 U/μl); 1,6μl do mix de dNTPs (100mM); 4μl do tampão da enzima (10x) e 8,4μl de água livre de nuclease. As soluções foram submetidas a ciclos de temperaturas: 10

minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 min a 85°C. Após o término dos ciclos o cDNA foi armazenado a -20°C.

#### 3.9Expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real

As reações de expressão gênica foram realizadas de acordo com o kit (*Applied Biosystems® TaqMan® Universal PCR Master Mix*) para RNA. Otermociclador utilizado foi ABI 7500 fast (*Applied Biosystems, CA, EUA*) no modo standard. Para quantificação das amostras, foi utilizado o reagente TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EUA).

Foram utilizados reagentes nas seguintes concentrações: 0,5μl do primer específico; 5μl de *TaqMan® master mix*; 2,5μl de água livre de nuclease e 2,0μl de cDNA (concentrado em 15ng de RNA).Os primers utilizados foram: MMP9 (Hs00957562\_m1), RECK (Hs01019185\_m1), MARKS (Hs00158993\_m1), BTG2 (Hs00198887\_m1), PDCD4 (Hs00377253\_m1), miR-21 (Hs04231424\_s1), BAX (Hs00180269\_m1), mTOR (Hs00234508\_m1), CDH-1 (Hs01023895\_m1), ITGB1 (Hs05351551\_g1), ITGB3 (Hs01001469\_m1) (*Invitrogen*).As condições de ciclagem de PCR foram: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C.O nível de expressão dos genes foi obtido pelo método 2<sup>-ΔCT</sup>, adquirido do *Applied BiosystemsDataAssist Software*.Todas as reações foram realizadas em duplicata e o gene da β2- microglobulina (B2M) (*Applied Biosystems, CA, EUA*) foi utilizado como controle endógeno para RNA.

#### 3.10Ensaio de Extração e análise proteica por immunoblotting

Para avaliar a expressão proteica de MMP-9 de 92 kDa, foi feito o ensaio de *Western Blotting* das amostras dos experimentos *in vitro*.

Foi adicionado o tampão de lise RIPA (*Lysis Buffer, Millipore*) nas amostras, que foram deixadas por 30 minutos no gelo. Logo após, foi feita a centrifugação refrigerada dessas amostras por 20 minutos a 11.000 rpm em 4ºC. Foi preservado o sobrenadante e armazenado a -80ºC.

Após a extração de proteínas, foi feita a quantificação por espectrofotometria (*Nanodrop® ND-1000, Wilmington, EUA*). Para calibrar o equipamento, realizou-se uma curva de calibração com um padrão de concentração de proteínas, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) pelo método de *Pierce®* (660nm ProteinAssay, Thermo), bem como a quantificação das amostras.

Após a quantificação proteica, foi adicionado o tampão de Laemmli, em uma proporção de 1:2(66).

Em seguida, foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, que é formado a partir da polimerização de dois compostos, acrilamida e bis-acrilamida.

O marcador de peso molecular determina o tamanho e a altura no gel das proteínas, e também monitora a corrida eletroforética. Foi utilizado o *Precision Plus Protein™ Standards* (Bio-Rad).

As amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida, na concentração de 50μg/ml, que foram submersos em um tampão de corrida e submetidos a uma carga de 80 V por 30 minutos durante a passagem pela fase de empilhamento *stacking*. Posteriormente a voltagem passará para 100 V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos ou até o final do gel de resolução *resolving*.

Após a corrida, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose submersas em um tampão de transferência à base de glicina e tris (1x), sob refrigeração. Essa membrana foi envolvida por uma esponja e papel filtro, com contato direto com o gel de poliacrilamida, formando um "sanduíche" (esponja/papel filtro/membrana/gel de poliacrilamida/papel filtro/esponja) que foi submetido a transferência à 120 V por 90 minutos (67). Para validar o sucesso dessa transferência, as membranas foram submetidas ao *PonceauRed* (Ponceau S Solution – Sigma), para visualização das bandas de proteínas.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com BSA 1% em TBS-T (Tampão tris salina Tween 20) por 15 segundos. A incubação com os anticorpos foi realizada no aparelho SNAP (*SNAP i.d.*® *system* – Millipore) que otimiza os tempos de incubação utilizando um sistema a vácuo. Esses anticorpos foram diluídos em BSA 1% na concentração sugerida pelo fabricante, sendo feita a incubação por 10 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS-T para remoção do excesso de anticorpo primário.

O anticorpo secundário foi diluído da mesma maneira que o primário, segundo orientação do fabricante. As membranas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, seguidas de 3 lavagens com TBS-T por 10 minutos.

Para a revelação dessas membranas, foi utilizado o substrato Luminata™ Forte, (*Western HRP Substrate* – Millipore), o qual detecta as proteínas marcadas com os anticorpos.Para obtenção das imagens, foi utilizado o Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge). O equipamento possui uma câmara dentro de um gabinete, que detecta

a quimioluminescência da membrana, transformando o sinal em uma imagem digital para análise com o software (Alliance 16.06) fornecido com a máquina de detecção.

#### 3.11 Ensaio de invasão

Para a determinação da capacidade das células editadas pelo método de CRISPR-Cas9 invadirem tecidos, foi realizado o ensaio de invasão em câmaras bioCoatMatrigelInvasion Chamber (Becton Dickinson, Bedford, MA) constituídas por poros de 8μm, revestidas por Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As células foram tripsinizadas e plaqueadas (12 x 10<sup>4</sup> células/câmara) com meio de cultura livre de soro no compartimento superior da câmara. O compartimento inferior, foi composto por meio suplementado com 10% de soro fetal bovino, que é usado como quimioatrativo. As células foram incubadas durante 48 horas a 37ºC em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células que não ultrapassaram a câmara, foram removidas da parte superior. As células da parte inferior da câmara foram fixadas com paraformoldeído e coradas com cristal violeta 0,2%. Essas células que migraram foram quantificadas em 9 campos sob microscopia, com uma ampliação de 200x para determinar o número de células. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 3.12 Ensaio de Imunofluorescência

As células foram plaqueadas em lamínulas de 18mm em placas de 12 poços. 24 horas depois, foi realizada a fixação com paraformoldeído 4% em PBS por 10 minutos. Em seguida foi feita a lavagem com PBS 1x 3 vezes de 5 minutos. Foi feito o bloqueio com BSA 3% por 30 minutos, com posterior incubação com o anticorpo primário para MMP9, *overnight* em BSA 1% em PBS na concentração de 1:200 de anticorpo primário. No dia seguinte, foi feita a lavagem com PBS 3 vezes de 5 minutos e incubação com anticorpo secundário *rabbitalexa flúor 488* de cor verde por 2 horas. Após essa incubação, foi feita novamente a lavagem com PBS 3 vezes de 5 minutos e novamente o bloqueio com BSA 3%. Após essa etapa, foi feita a incubação *overnight* com o segundo anticorpo primário RECK em solução de BSA 1% em PBS. No dia seguinte, foi feita a lavagem com PBS 3 vezes de 5 minutos, com posterior incubação com o segundo anticorpo secundário *mouse alexa flúor 647* de cor vermelha por 2 horas. Foi feita novamente a lavagem com PBS por 3 vezes durante 5 minutos. As lamínulas foram retiradas da placa de 12 poços e adicionadas a lâminas de microscopia com meio de montagem contendo DAPI. Esse protocolo foi feito com proteção à luz.

#### 3.13Ensaios in vivo

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos Balb/c Nude, com um N de 5 por grupo. Foram inoculadas 3x10<sup>5</sup> células PC-3M-Luc-C6em 20µl de meio MEM suplementado com 20% de SFB pelo método ortotópico. As células inoculadas forameditadas com CRISPR-Cas9 para MMP9, miR-21 e células sem edição, transfectada com o plasmídeo PX-330 sem nenhuma inserção como controle (*Scramble*) com o intuito de avaliar o crescimento tumoral e capacidade de invasão *in vivo* dessas células já editadas, em comparação com o *Scramble*. Foi feito o acompanhamento a cada 2 dias da evolução dos tumores pela bioluminescência do equipamento IVIS, onde foi administrado o substrato Luciferina na concentração

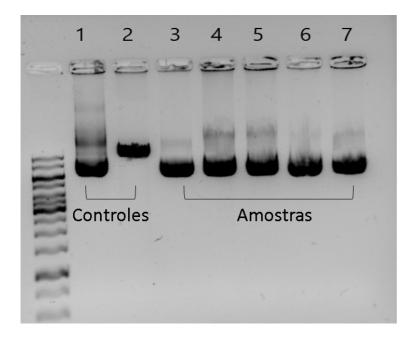
de 150mg/kg em um volume final de 200 $\mu$ l. Esses animais foram acompanhados durante 14 dias.

### 4. Resultados

# 4.1 Padronização dos experimentos com o plasmídeo PX-330 com os sgRNAs.

O primeiro passo foi a seleção dos sgRNAs de dupla fita, digestão do plasmídeo PX-330 com a enzima BbsI, com o intuito de clivar a região onde essas sequências foram inseridas, e logo após foi feita uma reação de inserção, com a enzima T4 ligase, a qual fecha o plasmídeo com o sgRNA de interesse inserido na região onde o plasmídeo foi clivado.

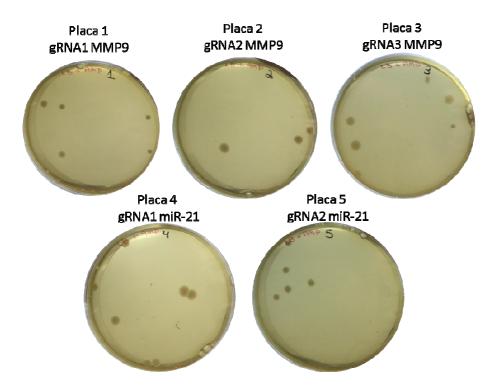
Para validar esses ensaios, fizemos novamente uma digestão do plasmídeo Px-330 com a enzima Bbsl, após a inserção do sgRNA, para verificar se a enzima perdeu seu sítio de ligação, que é o esperado quando acontece o inserto da sequência. Após esses ensaios, foi feito um gel de agarose 0,8% com essas amostras e analisado o padrão de bandas. Observamos na amostra 1 o padrão de banda do plasmídeo sem o sgRNA e sem a digestão. Na amostra 2, o plasmídeo apenas digerido com a enzima Bbsl. As amostras 3 a 7, são dos insertos, com posterior digestão. Cada amostra com um sgRNA, ou seja, amostras 3 a 5, sgRNAs 1,2 e 3 da MMP9 respectivamente, e as amostras 6 e 7, sgRNAs 1 e 2 do miR-21 (Figura 6).



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% com as amostras do plasmídeo PX-330 com os insertos dos sgRNAs após a digestão.

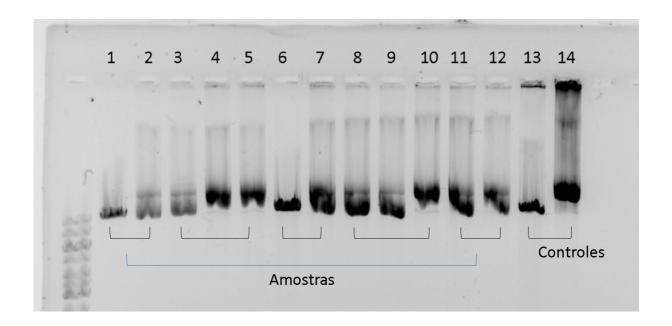
Observamos que as amostras 3 a 7, apresentam o mesmo padrão de banda de um plasmídeo não digerido, ou seja, consideramos que essas amostras perderam o sítio de ligação da enzima Bbsl devido ao sgRNA estar inserido no plasmídeo.

Após os insertos, foi feita a transformação em bactérias DH5α competentes. Na Figura 7, observamos colônias de bactérias nas placas, que foram selecionadas separadamente e expandidas, para posterior checagem dos plasmídeos. Uma placa para cada amostra de plasmídeo com seu respectivo sgRNA.



**Figura 7.** Placas de bactéria DH5 $\alpha$  em meio LB com ampicilina e suas respectivas colônias.

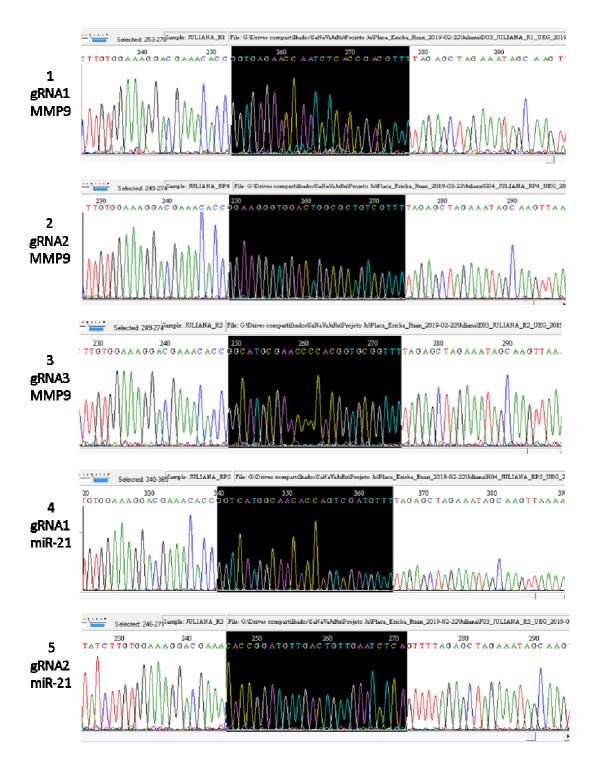
De todas as placas, foram selecionadas no total 12 colônias de bactéria, para checagem de quais colônias são positivas para os insertos dos sgRNAs, nos plasmídeos, ressaltando que nem toda colônia bacteriana possui plasmídeos com o inserto. Sendo assim, após a expansão dessas colônias isoladamente, foi feita a extração dos plasmídeos, que foram então digeridos com a enzima BbsI e corridos em um gel de agarose para validação dos insertos (Figura8).



**Figura 8.** Gel de agarose 0,8% dos plasmídeos com gRNA digeridos com a enzima Bbsl.

Cada amostra foi extraída de uma colônia de bactéria, sendo que as amostras 1 e 2 foram da placa 1, ou seja, do sgRNA 1 da MMP9, as amostras 3, 4 e 5 foram do sgRNA2 (placa 2) da MMP9, as amostras 6 e 7 foram do sgRNA3 (placa 3) da MMP9, as amostras 8, 9 e 10 foram do sgRNA 1 do miR-21 (placa 4) e as amostras 11 e 12 foram do sgRNA 2 do miR-21 (placa 5). A amostra 13 é o controle do plasmídeo sem sgRNA, porém digerido e a amostra 14 é um controle do plasmídeo sem digestão. Observamos que apenas as amostras 1 e 6 não apresentaram o sgRNA, por demonstrar um padrão de banda igual ao controle positivo para a digestão, sendo assim, foi escolhida uma amostra de cada placa exceto a 1 e 6, para expansão.

Após a seleção dos plasmídeos com os respectivos sgRNAs, foi feita a expansão novamente em bactérias,para obtenção de uma maior concentração de plasmídeos. E por fim, para validação final dos insertos, foi feito o sequenciamento de todas as amostras (Figura9).



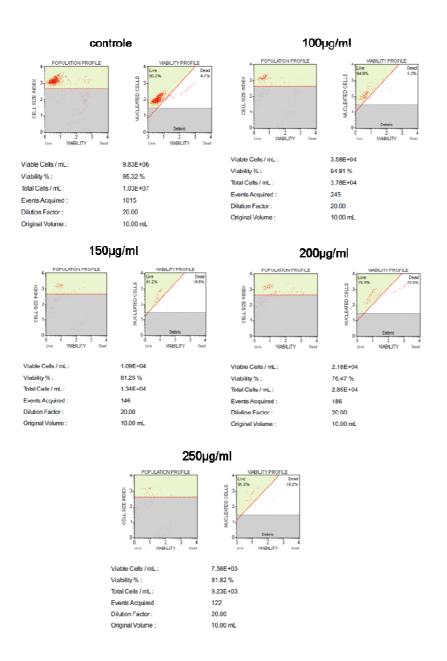
**Figura 9.** Sequenciamento dos plasmídeos com os sgRNAs de interesse (selecionados em preto).

Na análise dos resultados do sequenciamento de cada amostra, observamos que a sequência dos sgRNAs está inserida no plasmídeo, ou seja, nas amostras 1, 2

e 3, observamos a sequência dos sgRNAs 1, 2 e 3, respectivamente, da MMP9. Nas amostras 4 e 5, ressaltamos a sequência dos sgRNAs 1 e 2 do miR-21. Sendo assim, consideramos essas amostras do CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21 válidas para edição gênica *in vitro*.

## 4.2 Padronização da edição gênica da MMP9 e miR-21 *in vitro* com CRISPR-Cas9.

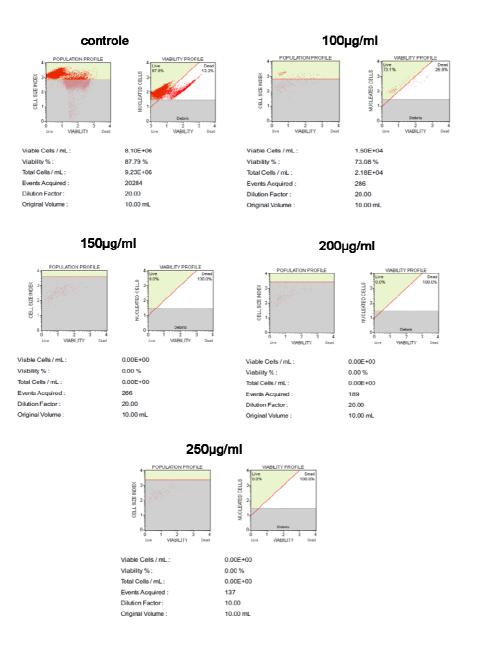
O primeiro passo foi padronizar a concentração do antibiótico puromicina na linhagem celular PC-3M-luc-C6e o tempo de tratamento, para selecionar as células que foram transfectadas com o plasmídeo px-330, que possui umgene que dá resistência ao antibiótico. Sendo assim, fizemos uma curva dose resposta para viabilidade celular (Figura10).



**Figura 10**. Viabilidade celular por citometria de fluxo da linhagem PC-3M-luc-C6 com 8 dias de tratamento com puromicina nas concentrações de 100, 150, 200 e 250  $\mu$ g/ml.

Plaqueamos 20.000 células por poço em uma placa de 48 poços. No dia seguinte, com essas células aderidas, fizemos o tratamento com puromicina em 4 concentrações distintas, sendo 100μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml e 250μg/ml, a cada 48

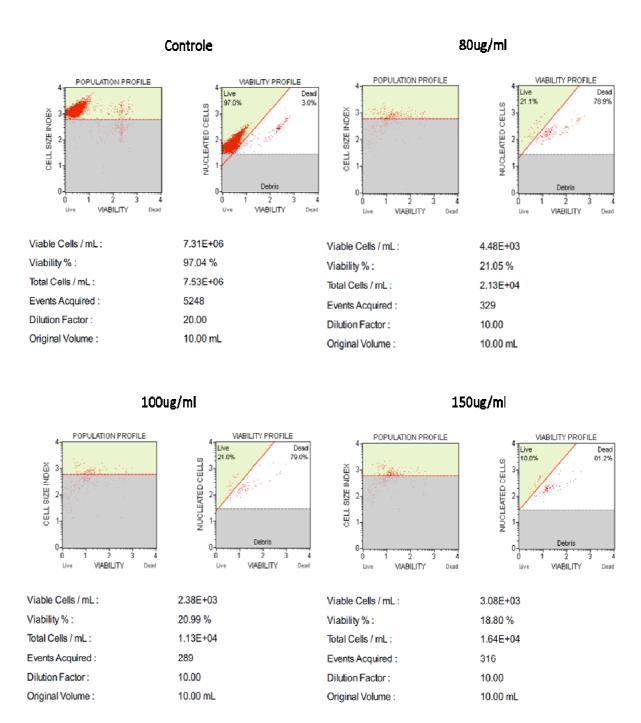
horas, durante 8 dias. Observamos uma alta taxa de viabilidade celular em todas as concentrações, porém o número de células diminuiu significativamente em relação ao controle sem tratamento. Sendo assim, decidimos prolongar esse tratamento por até 10 dias (Figura 11).



**Figura 11**. Viabilidade celular por citometria de fluxoda linhagem PC-3M-luc-C6 com 10 dias de tratamento com puromicina nas concentrações de 100, 150, 200 e 250 μg/ml.

No décimo dia observamos poucas células, em relação ao controle, na concentração de 100μg/ml, com 73,08% de viabilidade. Já nas concentrações de 150, 200 e 250μg/ml, não observamos células viáveis, o que mostra que a concentração ideal de puromicina para seleção das células é de 150μg/ml por 10 dias de tratamento.

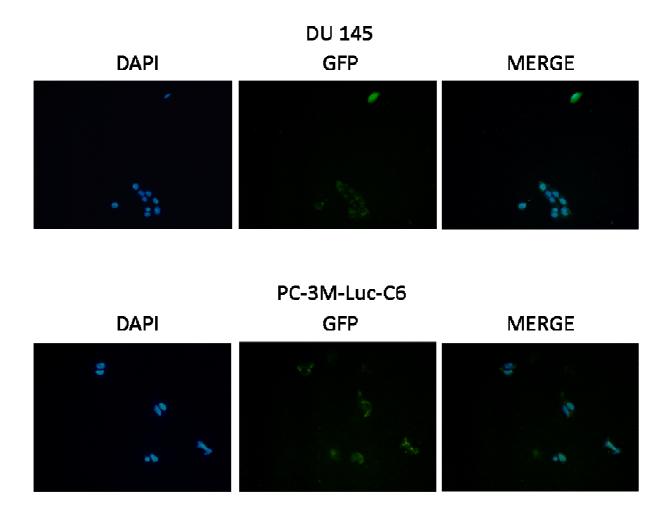
Partindo desses resultados, o mesmo protocolo foi feito para a linhagem celular DU145, com a finalidade de encontrar a melhor concentração de puromicina (Figura 12).



**Figura 12.** Viabilidade celular por citometria de fluxo da linhagem DU145 com 10 dias de tratamento com puromicina nas concentrações de 80, 100 e 150µg/ml.

Nesta linhagem, na concentração de 150μg/ml, observamos um número total de células bem inferior ao controle e apenas 18% de células viáveis, sendo assim, levamos em consideração essa última concentração.

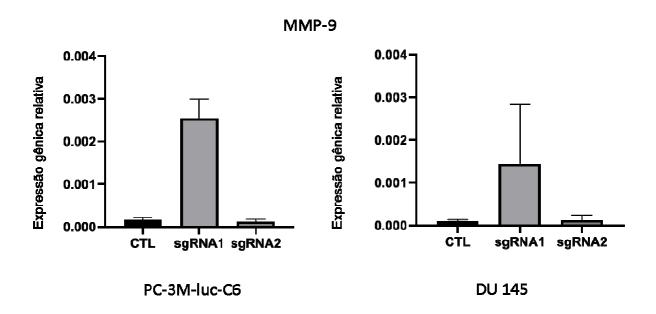
Ao realizar as transfecções dos plasmídeos PX-330 com os respectivos sgRNAs para MMP-9 e miR-21, nas linhagens PC-3M-Luc-C6 e DU 145, observamos células com GFP, o que mostra que a transfecção foi eficiente, devido ao plasmídeo PX-330 apresentar a sequência dessa proteína (Figura 13).



**Figura 13.** Validação da transfecção.Linhagens celulares Du145 e PC-3M-luc-C6 transfectadas com o plasmídeo PX-330. Imagens em microscópio de fluorescência 40x.

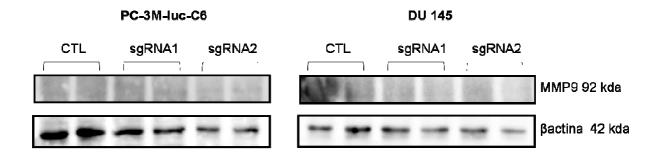
Ao avaliarmos a expressão gênica por q-PCR da MMP9 nas linhagens transfectadas com PX-330sgRNA 1, observamos um aumento tanto na linhagem DU 145 quanto da PC-3M-luc-C6, quando comparadas às células sem transfecção. Já

nas amostras das células transfectadas com PX-330sgRNA 2, não observamos diferença na expressão gênica em relação ao controle (CTL) (Figura 14).



**Figura 14.** Expressão gênica de MMP-9 nas linhagens celulares Du145 e PC-3M-luc-C6, transfectadas com o PX-330 sgRNA1 e 2 e controle (CTL) sem transfecção.

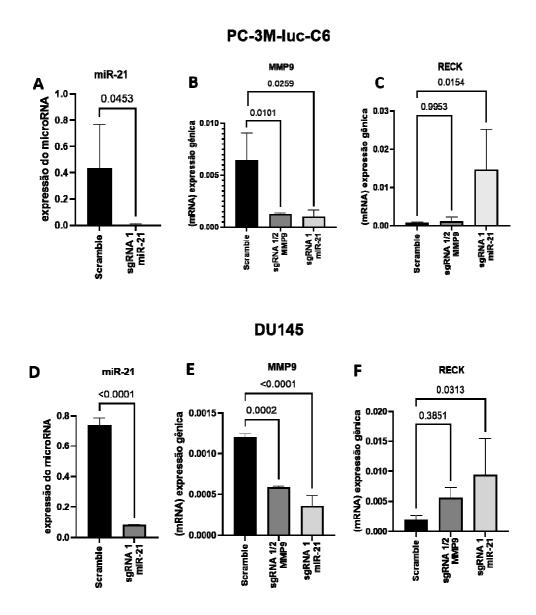
Em relação à expressão proteica, não observamos esse mesmo padrão, ou seja, não conseguimos detectar uma diferença clara de MMP9 nos controles e nas células transfectadas com os sgRNAs 1 e 2 (Figura 15).



**Figura 15.** Western Blotting de MMP9 e βactina (controle) das linhagens PC-3M-luc-C6 e DU145, transfectadas com PX-330 sgRNA1 e 2 comparado ao *Scramble*.

Optamos por transfectar nas linhagens celulares PC-3M-luc-C6 e DU-145, os sgRNA1 e 2 para MMP9 na mesma amostra, com o intuito de fazer uma dupla edição gênica no exon 1, em posições diferentes da MMP9 e avaliar a eficácia da edição. Além disso, fizemos a edição gênica do miR-21 em ambas as linhagens celulares, e observamos que na linhagem PC-3M-luc-C6, houve uma diminuição significativa da expressão do miR-21 em comparação com o grupo de controle transfectado com o plasmídeo sem sgRNAs (*Scramble*) (p=0,0453). A expressão gênica da MMP9 foi significativamente reduzida em células PC-3M-luc-C6co-transfectadas com MMP9 sgRNAs 1 e 2 e também nos grupos transfectados com sgRNA 1 para o miR-21 em comparação ao Scramble (p=0,0101 e p=0,0259, respectivamente) (Figura 16 A-B). A expressão de RECK permaneceu inalterada nas células co-transfectadas com MMP9 sgRNAs 1 e 2. Por outro lado, foi significativamente maior em células transfectadas com miR-21 sgRNA 1 em comparação com Scramble (p=0,0154) (Figura 16 C).

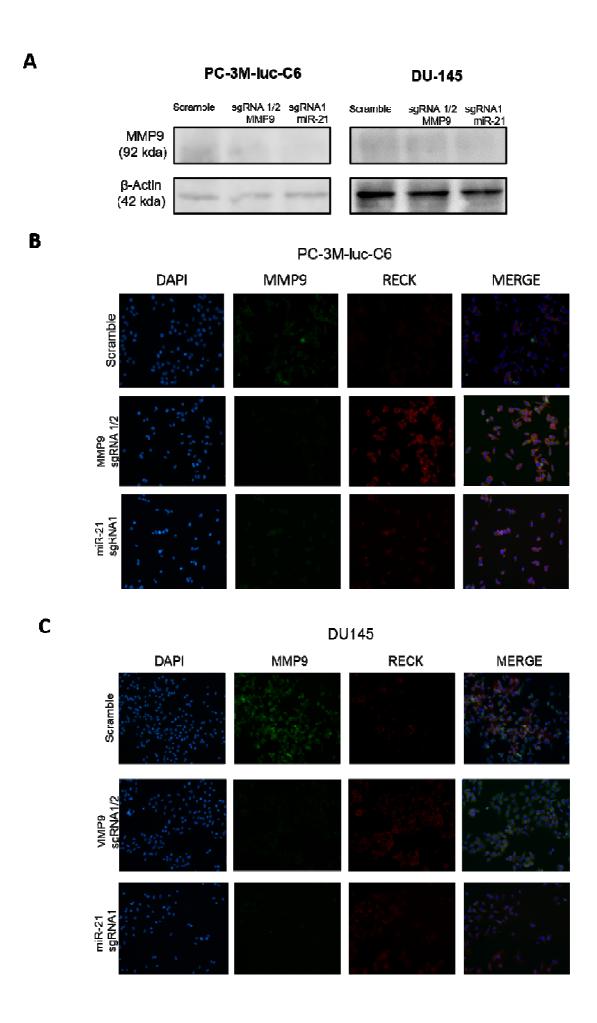
Resultados semelhantes foram vistosna linhagem de celular DU145. A expressão do miR-21 foi reduzida em células editadas com CRISPR-Cas9 para o miR-21 em comparação ao Scramble (p<0,0001) e também observamos uma diminuição da expressão de MMP9 nas amostras editadas tanto para MMP9 como para miR-21 (Figura 16 D-E). Células editadas com CRISPR-Cas9 para o miR-21 exibiram níveis de expressão gênica de RECK significativamente mais elevados do que (p=0,0313) Scramble. (Figura 16F).



**Figura 16.**Edição gênica de MMP9 e miR-21 com CRISPR-Cas9. (A) Expressão do miR-21 em amostras editadas com sgRNA 1 para miR-21 e o seu respectivo controle transfectado com o plasmídeo sem qualquer inserção (*Scramble*) na linhagem celular PC-3. (B e C) Expressão dos genes MMP9 e RECK em amostras editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9, sgRNAs 1 e 2 e amostras editadas para miR-21 com sgRNA1 em comparação ao *Scramble*. (D) Expressão do miR-21 em amostras editadas com CRISPR-Cas9 miR-21 sgRNA 1, comparado ao *Scramble* na linhagem celular DU145. (E e F) Expressão dos genes MMP9 e RECK em amostras editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 sgRNAs 1 e 2 e miR-21 sgRNA1 em comparação com o *Scramble*. Significância estatística adotada (p<0,05).

Ao avaliar a expressão proteica por *Western blotting* da MMP9 nessas amostras, observamos que tanto na linhagemPC-3M-luc-C6 quanto DU-145, houve uma diminuição dessa expressão nas amostras editadas CRISPR-Cas9 para MMP9

com sgRNA 1 e 2 e miR-21 sgRNA 1 quando comparado ao *Scramble* (Figura 17A). Na imunofluorescência, observamos uma menor expressão proteica da MMP9, nas amostras editadas com sgRNA 1 e 2 para MMP9 e sgRNA 1 para miR-21 quando comparados ao *scramble*. Ao analisar a expressão proteica de RECK, observamos um aumento nas amostras editadas com CRISPR-Cas9 tanto para MMP9, quanto para miR-21, quando comparados ao *scramable*. Esses resultados foram observados nas linhagens PC-3M-luc-C6 e DU145 (Figura 17B e C).



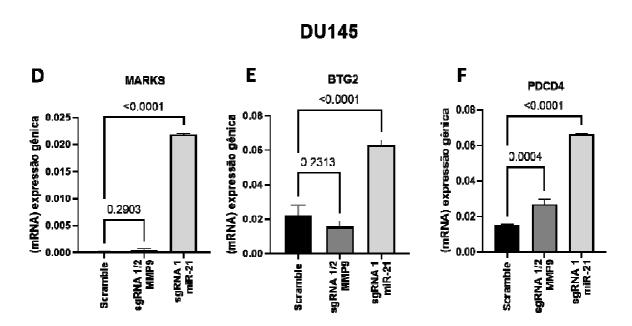
**Figura 17.**Expressão proteica de MMP9 e RECK em células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21 em linhagens de CaP metastáticas. (A) *Western Blotting* de MMP9 e βactina (controle) das linhagens PC-3M-luc-C6 e DU-145, das amostras *scramble* e transfectadas com PX-330 sgRNA1 e 2 para MMP9 e sgRNA 1 para miR-21. (B-C) Imunofluorescência de MMP9 (verde) e RECK (vermelho) em amostras editadas com MMP9 sgRNA 1/2 e miR-21 sgRNA1 nas linhagens PC-3M-luc-C6 e DU-145.

Depois de confirmar a baixa expressão de miR-21 nas linhagens celulares editadas por CRISPR-Cas9, observamos que na PC-3M-luc-C6, a expressão gênica de MARKS, alvo do miR-21, foi maior nessas amostras, quando comparado ao *scramble* (p=0,0302) (Figura 18A). Em relação a expressão do gene BTG2, não encontramos diferença das amostras editadas com CRISPR-Cas9 quando comparado ao grupo *Scramble* (Figura 19B). Porém, observamos um aumento da expressão gênica do programador de apoptose PDCD4 em amostras editadas com miR-21 sgRNA1 em comparação com *Scramble* (p = 0,0453) (Figura 18C). As amostras editadas com MMP9 sgRNAs1 e 2 não apresentaram diferenças significativas em comparação com o *Scramble* (Figura 18A-C).

Na linhagem celular DU145, as células editadas com miR-21 sgRNA1 apresentaram uma alta expressão gênica de MARCKS (p<0,0001) quando comparadas ao grupo *Scramble* (Figura 18D). A expressão do gene BTG2 foi regulada positivamente em células editadas com miR-21 sgRNA1 em comparação com o grupo *Scramble* (p <0,0001). Não observamos diferença de expressão gênica de BTG2 nas células editadas com sgRNA 1 e 2 para MMP9 (Figura 18E). Já o gene PDCD4 se mostrou superexpresso em ambos os grupos em comparação com o controle *Scramble* (MMP9 sgRNA 1/2, p = 0,0004; miR-21 sgRNA1, p <0,0001) (Figura 18F).

#### C A В BTG2 PDCD4 MARKS 0.0453 C.5474 0 0302 1.0 (mRNA) expressão gênica 0.9818 0.3485 0.8/31 800.0 (mRNA) expressão gênica (mF04A) expressae genica 8.0 0.006 0.6 0.004 0.4 0.002 0.2 0.000 SgRNA 1/2 MMP9 sgRNA 1 miR-21 SGRNA 1/2 MMP9 sgRNA 1:2 MMP9 SGRNA 1 Seramble -Seramble

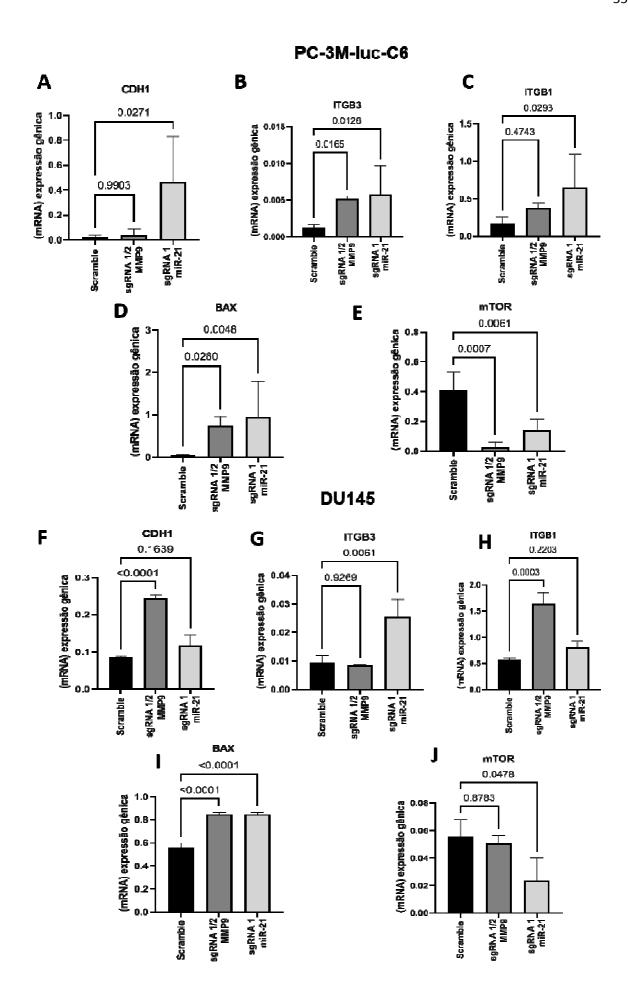
PC-3M-luc-C6



**Figura 18.** Expressão gênica de alvos do miR-21 em linhagens celulares de CaP metastáticas. Expressão gênica de (A) MARKS, (B) BTG2 e (C) PDCD4 em células PC-3 editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21 e (D) MARKS, (E) BTG2 e (F) PDCD4 em células DU145 editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21.

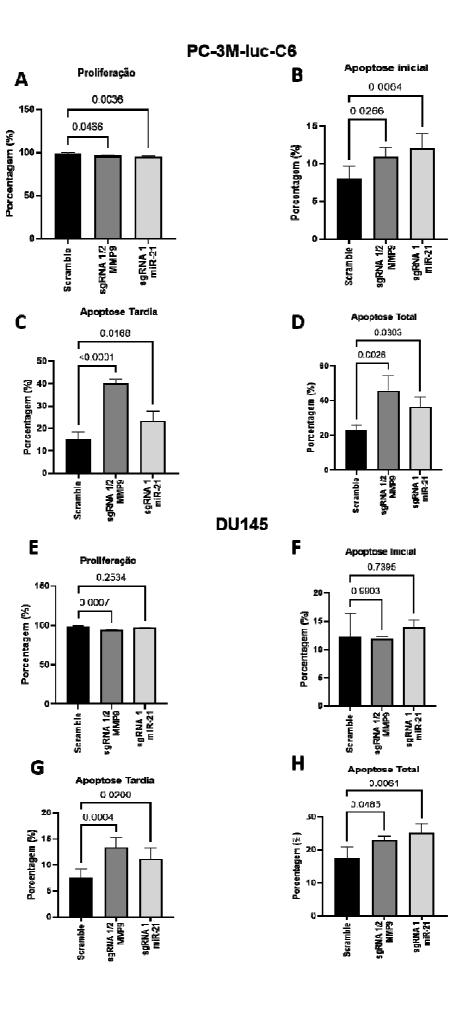
Também avaliamos a expressão gênica de outros fatores que as MMPs podem degradar nas linhagens celulares PC-3M-luc-C6 e DU145. A expressão do gene CDH1 foi aumentada em células editadas com miR-21 sgRNA1 em comparação com o grupo Scramble (p=0,027) (Figura 19A). O gene ITGB3 foi superexpresso em células editadas MMP9 sgRNA 1/2 e miR-21 sgRNA1 em comparação com o grupo Scramble (MMP9 sgRNA 1/2, p = 0,0165; miR-21 sgRNA1, p = 0,0126) (Figura 19B). Por outro lado, a expressão do gene ITGB1 não foi alterada em células editadas com MMP9 sgRNA1/2, mas foi superexpresso em células editadas com miR-21 sgRNA1 em comparação com *Scramble* (p = 0,0293) (Figura 19C). Também avaliamos a expressão gênica de marcadores de apoptose e proliferação, como BAX e mTOR, e encontramos uma expressão aumentada de BAX em células editadas com MMP9 sgRNA1/2 e miR-21 sgRNA1 quando comparadas ao Scramble (MMP9 sgRNA 1/2, p= 0,0260; miR-21 sgRNA1, p=0,0048) (Figura 19D). O gene mTOR se mostrou subexpresso em células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 sgRNA 1/2 e miR-21 sgRNA1 quando comparado ao Scramble (MMP9 sgRNA 1/2, p=0,0007; miR-21 sgRNA1, p=0,0061) (Figura 19E).Na linhagem DU145 editadas com sgRNA MMP9 1/2, houve uma superexpressão do gene CDH1 em comparação com o grupo Scramble (p <0,0001), mas não houve diferença observada nas células editadas com miR-21 sgRNA1 (Figura 19F). Observamos um aumento da expressão do gene ITGB3 foi maior em células editadas com miR-21 sgRNA1 quando comparados ao *Scramble* (p = 0,0061) (Figura 19G). O gene ITGB1 em células editadas MMP9 sgRNA 1/2 se mostrou superexpresso em comparação com o grupo Scramble (p = 0,0003) (Figura 19H). Também foi determinado que a expressão do gene BAX foi maior em células editadas com MMP9 sgRNA 1/2 e miR-21 sgRNA1 em relação ao Scramble (MMP9 sgRNA 1/2, p<0,0001; miR-21 sgRNA1,

p<0,0001) (Figura 19I). O gene mTOR, foi subexpresso nas células editadas com miR-21 sgRNA1 (p=0,0478) e não houve diferença nas células editadas com MMP9 sgRNA 1/2 em comparação ao grupo *Scramble* (Figura 19J).



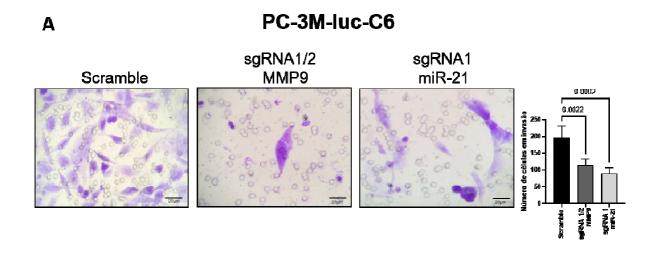
**Figura 19.**Expressão gênica de CDH1, integrinas, BAX e mTOR em linhagens metastáticas de CaP. (A) Expressão gênica de e-caderina CDH1, (B-C) integrinas ITGB3 e ITGB1, (D) BAX e (E) mTOR em células PC-3M-luc-C6 editadas por CRISPR-Cas9 para MMP9 sgRNA 1/2 e miR-21 sgRNA1. Expressão gênica de (F) e-caderina CDH1, (G-H) integrinas ITGB3 e ITGB1, (I) BAX e (J) mTOR em células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 com sgRNA 1/2 e miR-21 sgRNA1 da linhagem celular DU145.

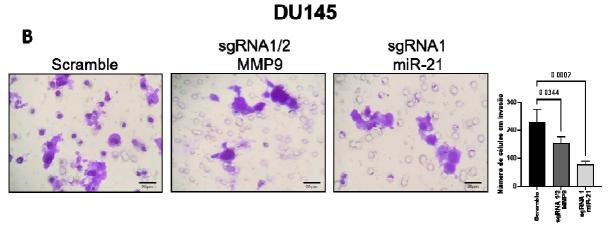
Avaliamos a proliferação e apoptose em células PC-3M-luc-C6 e DU145 editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21 usando citometria de fluxo. Nas células PC-3M-luc-C6, a taxa de proliferação foi menor no grupo editado com sgRNA 1/2 para MMP9 (p=0,0456) e sgRNA1 miR-21 (p=0,0036) em relação ao grupo Scramble (Figura 20A). Em relação a apoptose, as células PC-3M-luc-C6 editadas com sgRNA 1/2 para MMP9 apresentaram um aumento da apoptoseinicial (p = 0,0266), tardia (p < 0,0001) e total (p = 0,0026) quando comparados ao *Scramble*. Resultado semelhante foi observado em células editadas com miR-21 sgRNA1 que exibiram uma maior taxa de apoptose inicial (p = 0,0064), tardia (0,0168) e total (p = 0,0303) em comparação ao grupo Scramble (Figura 20B-D). Na linhagem celular DU145, as células editadas com sgRNA 1/2 MMP9 exibiram uma taxa de proliferação diminuída em relação ao Scramble (p = 0,0007). Em contraste, a proliferação das células editadas com miR-21 sgRNA1 não apresentou diferença (Figura 20E). Ao avaliar a apoptose inicial, não observamos diferença significativa entre as amostras editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 com sgRNA 1/2 e sgRNA1 para miR-21 em relação ao Scramble. Porém, ambos os grupos apresentaram aumento da apoptose tardia (MMP9 sgRNA 1/2 = 0,0004; miR-21 sgRNA1, p=0.02) e total (MMP9 sgRNA 1/2, p=0.0485; miR-21 sgRNA1, p=0.0061) em relação ao grupo *Scramble* (Figura 20F-H).



**Figura 20**. Citometria de fluxo para avaliação de proliferação e apoptose em linhagens celulares de CaP metastático. (A) Células PC-3M-luc-C6 editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 sgRNA1/2 e sgRNA1 para miR-21, marcadas com anticorpo ki67 para avaliar a taxa de proliferação celular. (B-D) Células do grupo sgRNA1/2 para MMP9 e sgRNA1 para miR-21, comparadas ao *scramble*, marcadas com anexina-5 e 7-AAD para avaliar a porcentagem de células nos estágios inicial e tardio da apoptose e calcular a apoptose total. (E) Marcação de células da linhagem DU145 editadas com CRISPR-Cas9 sgRNA1/2 para MMP9 e sgRNA1 para miR-21 com o anticorpo ki67 para avaliar a taxa de proliferação celular. (F-H) Marcação de células editadas por CRISPR-Cas9 para MMP9 com sgRNA1/2 e sgRNA1 para miR-21 com anexina-5 e 7-AAD para avaliar a porcentagem de células nos estágios inicial e tardio da apoptose e calcular a apoptose total.

Avaliamos o potencial de invasão celular e observamos que células da linhagem PC-3M-luc-C6 editadas por CRISPR-Cas9 com sgRNA1/2 para MMP9 e sgRNA1 para miR-21 apresentaram um menor número de células em comparação ao grupo *Scramble* (MMP9 sgRNA1/2, p=0,0022; miR-21 sgRNA1, p=0,0002) (Figura 21A). Dados similares foram encontrados na linhagem celular DU145, que apresentou um menor número de células editadas com sgRNA1/2 para MMP9 e sgRNA1 para miR-21 quando comparado ao *Scramble* (MMP9 sgRNA1/2, p=0,0344; miR-21 sgRNA1, p=0,0002) (Figura 21B).





**Figura 21.**Ensaio de invasão com células de CaP metastáticas. Células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 com sgRNA1/2 e miR-21 sgRNA1 em invasão (A) PC-3M-luc-C6 e (B) DU145.

Os principais achados em relação a expressão gênica estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3**. Principais achados do trabalho após a edição gênica com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21.

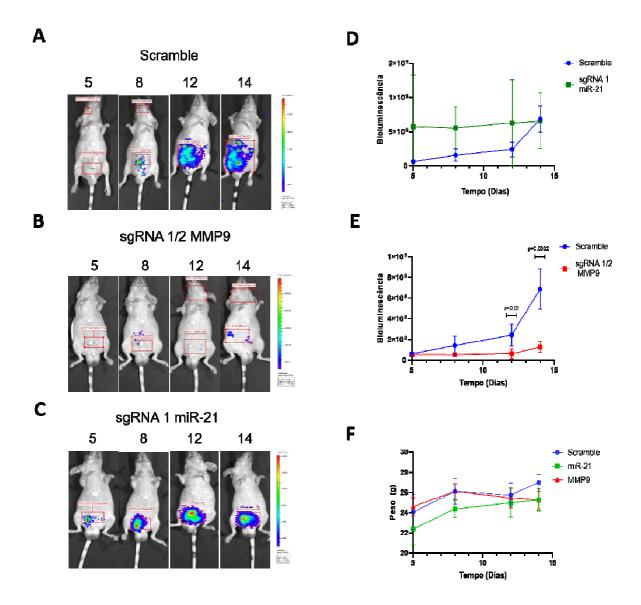
GENES	PC-3M-LUC-C6		DU145	
	sgRNAs			
	MMP9 sgRNA1/2	miR-21 sgRNA1	MMP9 sgRNA1/2	miR-21 sgRNA1
RECK	**	1	**	1
BTG2	**	**	**	<b>↑</b>
MARKS	**	1	**	1
PDCD4	**	1	<b>↑</b>	1
ITGB1	**	1	1	**
ITGB3	<b>↑</b>	1	**	1
CDH1	**	1	1	**
BAX	1	1	<b>↑</b>	1
mTOR			**	1

<sup>↓</sup> Subexpresso; ↑Superexpresso; \*\*Expressão gênica sem alteração

# 4.3 Crescimento tumoral*in vivo*de células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 e miR-21

Avaliamos o crescimento de células da linhagem PC-3M-luc-C6 em camundongos Balb/c Nude e observamos que em 14 dias, células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9 apresentaram uma evolução tumoral mais lenta quando comparado ao *Scramble*(Figura 22 A, B e E). Já as células editadas com sgRNA1

para miR-21, não apresentaram diferença estatística em comparação com o *Scramble* (Figura 22 A, C e D). Não observamos diferença de peso entre os grupos.



**Figura 22.** Crescimento tumoraldo modelo ortotópico de CaP. Imagens de Bioluminescência de camundongos Balb/c Nude, nos dias 5, 8, 12 e 14 após a inoculação das células PC-3M-luc-C6 na próstata dos animais.(A) Animais que receberam as células do grupo *Scramble*. (B) Grupo dos animais que receberam as células editadas com CRISPR-Cas9 sgRNA1/2 para MMP9. (C) Animais que receberam células CRISPR-Cas9 sgRNA1 para miR-21. (D e E) Quantificação da Bioluminescência dos 3 grupos avaliados. (F) Peso dos animais durante o experimento(N=5 por grupo).

### 5. Discussão

CRISPR-Cas9 é uma técnica de edição gênica inovadora, que trouxe diversas possibilidades de terapias e correções genéticas em múltiplas doenças relacionadas a mutações (62). Alguns trabalhos na literatura mostram que é possível utilizar essa técnica para correções de mutações de marcadores moleculares já descritos na literatura, ou até mesmo bloquear ou editar genes que podem ser possíveis candidatos na terapia alvo molecular (68-70).

Nesse estudo, buscamos avaliar o papel da MMP9 no CaPmetastático, através da técnica de CRISPR-Cas9. Os achados sobre o papel da MMP9 no câncer em geral ainda são controversos.Babichenko e col., encontraram uma diminuição da produção de MMP9 em casos mais avançados da doença(71). Porém, Cathcart e col. demonstraram que essa é uma proteína fundamental para a angiogênese e metástases,o que justifica estudar mais a fundo os mecanismos moleculares da MMP9 no CaP(72).

Para isso, padronizamos todos os experimentos iniciais, com a inserção dos sgRNAs nos plasmídeos e expansão dessas amostras em cultura de bactérias, para que conseguíssemos uma concentração suficiente desses plasmídeos com os sgRNAs. Após essa etapa, realizamos as transfecções das sgRNAs 1 e 2 nas linhagens celulares PC-3M-luc-C6 e DU-145, seguindo o protocolo publicado pelo autor que desenvolveu essa técnica(65). Desta forma, ao avaliar a edição gênica por CRISPR-Cas9, utilizando os sgRNAs 1 e 2 isoladamente, observamos resultados inconclusivos, com um aumento da expressão gênica de MMP9 com a transfecção de sgRNA1, nas duas linhagens celulares, e não observamos diferença na expressão gênica nas amostras do sgRNA2. Entretanto, ao avaliar a expressão proteica, não observamos esse mesmo aumento, o que pode sugerir que houve uma edição gênica da MMP9 nas duas linhagens celulares, resultando em baixa

expressão proteica, e aumento da expressão gênica desse mesmo alvo, possivelmente como uma tentativa celular para aumentar a expressão proteica. Alguns trabalhos na literatura mostram que a edição gênica por CRISPR-Cas9 pode resultar em proteínas sem função, ou baixa expressão(73, 74).

Optamos por transfectar os 2 sgRNAs na mesma colônia de células, com o intuito de editar duas regiões da MMP9 e diminuir ainda mais expressão proteica. Alguns trabalhos mostram que a edição gênica em mais de uma região, pode ser mais eficiente (75). Sendo assim, nossos dados mostraram que com a transfecção de 2 sgRNAs na mesma célula, houve um aumento da expressão gênica de MMP9 na linhagem DU-145. Já na linhagem PC-3M-luc-C6 não observamos esse mesmo aumento. Ao avaliar a expressão proteica, os resultados foram opostos, ou seja, nas células editadas com os 2 sgRNAs houve uma diminuição da proteína, tanto na linhagem DU-145 e PC-3M-luc-C6, o que pode sugerir que o RNAm da MMP9 foi editado, resultando em um bloqueio da tradução da proteína, porém, a célula ainda assim, aumenta a expressão desse RNAm não funcional para tentar reverter esse bloqueio.

Confirmamos esses dados de expressão proteica com a imunofluorescência, onde observamos ausência de MMP9 nas duas linhagens editadas com os 2 sgRNAs, em relação ao *Scramble*, transfectado com o plasmídeo sem os sgRNAs.

Após essa etapa de validação da edição gênica da MMP9, fizemos ensaios de invasão celular, para verificar se as células editadas para MMP9 perdem ou reduzem sua capacidade de invadir os poros da membrana, e observamos uma diminuição significativa dessas células editadas, em relação ao *Scramble*, nas duas linhagens estudadas.

Além disso, avaliamos também os mecanismos de proliferaçãoe apoptose, e encontramos uma diminuição da proliferação nas duas linhagens, nas células editadas para MMP9, e aumento da apoptose, quando comparados ao *Scramble*. Não encontramos dados na literatura que mostram que a ausência de MMP9, diretamente, pode levar a célula a apoptose, porém, há dados que mostram que além da matriz extracelular, a MMP9 pode também degradar integrinas, ou seja, proteínas que estão presentes na parte externa da membrana celular (76).

Para comprovar esses dados, nós avaliamos a expressão gênica de CDH1, ITGB3 e ITGB1, proteínas possíveis de serem degradadas pela MMP9, e observamos que nas células editadas com os 2 sgRNAs, houve um aumento de ITGB3 na linhagem PC-3M-luc-C6 e aumento de CDH1 e ITGB1 na linhagem DU145, ou seja, segundo nossos dados, a edição gênica de MMP9 pode levar ao aumento da expressão gênica de integrinas. A literatura mostra que MMPs podem degradar, além da matriz extracelular, proteínas de junção e de membrana celular, o que corrobora com os nossos dados, onde encontramos que houve um aumento da expressão gênica de integrinas e-caderinana ausência da MMP9(77).

Para validar o mecanismo de apoptose e proliferação dessas células editadas com CRISPR-Cas9 para MMP9, nós avaliamos a expressão gênica de BAX, envolvida na apoptose celular e mtor, que é um dos marcadores mais importantes de proliferação celular(78, 79). Nossos dados mostram que as células editadas com os 2 sgRNAs simultâneos apresentam um aumento da expressão gênica de BAX, tanto na linhagem DU-145 como na linhagem PC-3M-luc-C6. Em relação a expressão gênica da mtor, nós encontramos uma diminuição da expressão na linhagem PC-3M-luc-C6 editada com CRISPR-Cas9.

Consideramos esses resultados *in vitro* como promissores, no sentido de que a MMP9 pode apresentar um papel importante para a progressão do câncer de próstata metastático. Além disso, nossos achados corroboram com dados da literatura que mostram que o aumento da MMP9 está associado a progressão de outros tumores como o câncer de mama, tireoide e linfoma(80-82).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o aumento da expressão MMP9 foi correlacionada com pior prognóstico de CaP, sendo que pacientes com PSA >20ng/mL apresentaram uma maior expressão em relação ao grupo controle (83).

Além dos estudos com MMP9, fizemos também a edição gênica do miR-21, o qual possui como alvo direto o gene RECK, que é um regulador de MMP9 (26). Nosso grupo já mostrou a importância desse microRNA para o CaP, onde encontramos uma maior expressão do mesmo em tumores de pior prognóstico(37). Outros trabalhos também descreveram a importância do miR-21 em diversos modelos tumorais, como cólon e leucemia (84). Seus genes alvo estão diretamente ligados à apoptose e marcadores de bloqueio da proliferação celular, que são fatores essenciais para a progressão tumoral (85). Sendo assim, decidimos bloqueá-lo com essa técnica inovadora, o CRISPR—Cas9.

O primeiro passo foi transfectar os sgRNAs nas células e depois avaliar a expressão do miR-21 nas mesmas, para validar essa edição. Encontramos ausência de expressão do microRNA, bem como respostas positivas para seus genes alvo direto RECK, PCD4, e MARCS na linhagem PC-3M-luc-C6 e DU145 onde observamos um aumento da expressão gênica nas células editadas com sgRNA 1 (G1) para mir-21 em relação ao *Scramble*, mostrando uma resposta celular efetiva ao bloqueio desse microRNA. Em relação ao BTG2, somente encontramos diferença significativa na linhagem DU145. Avaliando a expressão gênica de MMP9, que é

regulada pelo gene RECK, observamos uma diminuição nas amostras editadas com sgRNA 1 para miR-21, também nas duas linhagens estudadas. Esse resultado foi comprovado pela imunofluorescência, onde observamos uma maior expressão proteica de RECK e menor expressão de MMP9 nas células editadas para miR-21, quando comparadas ao *Scramble*, o que mostra que o mecanismo do CRISPR-Cas9 foi eficiente para o bloqueio do miR-21 nas duas linhagens celulares.

Ao avaliar o crescimento das células editadas para o miR-21, observamos uma diferença nos experimentos de invasão, onde houve menos células em relação ao *Scramble*. Nos ensaios de proliferação e apoptose, células editadas da linhagem PC-3M-luc-C6 apresentam uma menor taxa de proliferação e maior taxa de apoptose, em relação ao *Scramble*. Na linhagem DU145, não foi observada diferença na proliferação, porém, houve uma maior taxa de apoptose tardia, quando comparada ao *Scramble*.

Na literatura esses dados são controversos. Folinie col. demonstraram que o miR-21 não apresenta um papel crucial como biomarcador para o CaP(86). Entretanto, Damodaran e col. encontraram que esse microRNA pode estar associado ao pior prognóstico da doença, justamente por ter como alvo, genes responsáveis pelo aumento da apoptose(87). Kanagasabai e col. Demonstraram que o bloqueio do miR-21 pode diminuir a proliferação e lipogêneseno CaP(88).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que, da mesma forma que a MMP9, existe uma correlação entre a alta expressão do miR-21 e pior prognóstico para CaP (36).

Outros pesquisadores também encontraram resultados parecidos, sendo que esse microRNA é então considerado como um oncomiR, ou seja, um bom alvo molecular para estudos como novas terapias (89).

Nosso grupo demonstrou em alguns estudos, que a alta expressão de MMP9 pode estar correlacionada ao pior prognóstico de CaP (78). Sendo assim, nós avaliamos o papel dessa proteína em duas linhagens metastáticas do CaP e sugerimos que ao efetuar o bloqueio direto da MMP9, pode levar a célula a um crescimento mais lento, dificultando seu mecanismo de invasão, o que é essencial para a progressão tumoral.

Ao avaliar esse crescimento tumoral nos animais, células da linhagem PC-3M-luc-C6 editadas para MMP9 apresentaram uma evolução tumoral mais lenta, comprovada pela bioluminescência, em relação ao *Scramble*. A edição gênica do miR-21, embora observamos resultados promissores nos experimentos *in vitro*, não apresentou resultados significativos na evolução tumoral. Acreditamos que a maior eficiência na resposta ao crescimento tumoral está nas células editadas para MMP9.

Para a edição gênica da MMP9, foi preciso editar a célula em 2 regiões distintas do EXON1, sendo que quando editamos as células em apenas uma região, não foi eficiente. Essa pode ser uma limitação do nosso estudo, pois exige um maior tempo e demanda dos experimentos.

Por outro lado, nós observamos que com a técnica de CRISPR-Cas9, foi possível, efetuar o bloqueio permanente da MMP9 e miR-21, e acompanhar a morfologia e tempo de crescimento das células editadas em relação ao controle, o que não é possível em experimentos onde são feitos tratamentos constantes ou transientes para inibir a expressão de marcadores moleculares. Com o sistema

CRISPR-Cas9, pudemos efetuar o bloqueio definitivo dos alvos em estudo, o que trouxe dados mais consistentes de resposta a um possível tratamento com essa técnica inovadora.

Alguns autores relatam que futuramente, com mais estudos, poderemos projetar novos inibidores como alvo a MMP9, para tratamento do câncer (90). Nosso estudo demonstra que essa importante e inovadora ferramenta de edição gênica, pode contribuir com o bloqueio da MMP9 em células tumorais, e retardar o crescimento ou até mesmo inibir o potencial metastático de células tumorais.

## 6. Conclusão

Com esses resultados, concluímos que a metodologia utilizada para construção e transfecção dos plasmídeos com os sgRNAs para a edição da MMP9 e miR-21 foi efetiva, pelos resultados positivos do GFP presente nas células transfectadas, o que mostra a validação da transfecção, e com os resultados da expressão proteica, concluímos que as linhagens celulares estudadas foram editadas para o gene da MMP9 pela metodologia de CRISPR-Cas9, com a transfecção simultânea de 2 sgRNAs, e também do miR-21, com o sgRNA 1.

A edição gênica da MMP9 e do miR-21 pelo método de CRISPR-Cas9 aumenta a apoptose e diminui a proliferação, invasão e aumenta a expressão gênica de ITGB3, ITGB1 e CDH1 em linhagens celulares de CaP metastático PC-3M-luc-C6 e DU 145.

Células editadas com CRISPR-Cas9 para miR-21 aumenta a expressão gênica e proteica do seu principal alvo direto RECK, diminui MMP9 e aumenta a expressão gênica dos alvos PDCD4, BTG2 e MARCKS nas linhagens DU-145 e PC-3M-luc-C6.

A edição gênica por CRISPR-Cas9 para MMP9 retarda *in vivo* o crescimento tumoral.

7. Referências Bibliográficas

- 1. Gandaglia G, Leni R, Bray F, Fleshner N, Freedland SJ, Kibel A, et al. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. Eur Urol Oncol. 2021;4(6):877-92.
- 2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
- 3. INCA. Instituto Nacional do Câncer 2020 [Available from: https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil.
- 4. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(12).
- 5. Jani AB, Johnstone PA, Liauw SL, Master VA, Brawley OW. Age and grade trends in prostate cancer (1974-2003): a Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry analysis. Am J Clin Oncol. 2008;31(4):375-8.
- 6. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. Eur Urol. 2011;59(4):572-83.
- 7. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. BJU Int. 2002;90(2):162-73.
- 8. Di Sebastiano KM, Bell KE, Mitchell AS, Quadrilatero J, Dubin JA, Mourtzakis M. Glucose metabolism during the acute prostate cancer treatment trajectory: The influence of age and obesity. Clin Nutr. 2016.
- 9. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010;140(6):883-99.
- 10. Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. Urology. 1999;54(5):780-6.
- 11. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med. 2012;366(11):981-90.
- 12. Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, Ward AM, Patnick J, Price CP, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. Eur Urol. 2005;48(3):386-99; discussion 98-9.
- 13. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. Eur Urol. 2017;71(4):618-29.
- 14. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol. 1992;23(3):273-9.
- 15. Kryvenko ON, Epstein JI. Prostate Cancer Grading: A Decade After the 2005 Modified Gleason Grading System. Arch Pathol Lab Med. 2016;140(10):1140-52.
- 16. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL, Committee IG. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol. 2005;29(9):1228-42.
- 17. Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, Tao M, Tsuzuki T, Hayashi I, et al. Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. Am J Pathol. 1995;147(4):1112-22.
- 18. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Prostate cancer major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017;67(3):245-53.
- 19. Wright JL, Lange PH. Newer potential biomarkers in prostate cancer. Rev Urol. 2007;9(4):207-13.
- 20. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. Eur Urol. 2021;79(2):243-62.
- 21. Chapin BF, Nguyen JN, Achim MF, Navai N, Williams SB, Prokhorova IN, et al. Positive margin length and highest Gleason grade of tumor at the margin predict for biochemical recurrence after

radical prostatectomy in patients with organ-confined prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2018;21(2):221-7.

- 22. Nishiyama T. Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012;129(3-5):179-90.
- 23. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509-24.
- 24. Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell. 2003;115(2):199-208.
- 25. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15(6):321-33.
- 26. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. Trends Mol Med. 2014;20(8):460-9.
- 27. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(7):2257-61.
- 28. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. Biochem Soc Trans. 2009;37(Pt 4):918-25.
- 29. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. Cell Res. 2008;18(3):350-9.
- 30. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res. 2005;33(4):1290-7.
- 31. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res. 2005;65(14):6029-33.
- 32. Shi GH, Ye DW, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhang HL, et al. Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. Acta Pharmacol Sin. 2010;31(7):867-73.
- 33. Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Saccà M, et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. Oncogene. 2013;32(14):1843-53.
- 34. Li T, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009;383(3):280-5.
- 35. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. Mol Cell Biol. 2008;28(17):5369-80.
- 36. Leite KR, Reis ST, Viana N, Morais DR, Moura CM, Silva IA, et al. Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. J Cancer. 2015;6(3):292-301.
- 37. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Dall'Oglio MF, Dip N, Passerotti CC, et al. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. BMC Urol. 2012;12:14.
- 38. Chen Y, Tseng SH. The potential of RECK inducers as antitumor agents for glioma. Anticancer Res. 2012;32(7):2991-8.
- 39. Noda M, Takahashi C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. Cancer Sci. 2007;98(11):1659-65.
- 40. Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, et al. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. Eur J Cancer. 2004;40(10):1617-23.
- 41. Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, et al. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. Br J Cancer. 2005;92(12):2171-80.

- 42. Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. Cancer. 2003;97(11):2710-5.
- 43. Namwat N, Puetkasichonpasutha J, Loilome W, Yongvanit P, Techasen A, Puapairoj A, et al. Downregulation of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) is associated with enhanced expression of matrix metalloproteinases and cholangiocarcinoma metastases. J Gastroenterol. 2011;46(5):664-75.
- 44. Nagini S. RECKing MMP: relevance of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs as a prognostic marker and therapeutic target for cancer (a review). Anticancer Agents Med Chem. 2012;12(7):718-25.
- 45. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell. 2001;107(6):789-800.
- 46. Gordon GM, Ledee DR, Feuer WJ, Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. J Cell Physiol. 2009;221(2):402-11.
- 47. Geervliet E, Bansal R. Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. Cells. 2020;9(5).
- 48. Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. Cancer Res. 2003;63(12):3069-72.
- 49. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. Cancers (Basel). 2014;6(3):1298-327.
- 50. Dos Reis ST, Pontes J, Villanova FE, Borra PM, Antunes AA, Dall'oglio MF, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: susceptibility and prognostic implications for prostate cancer. J Urol. 2009;181(5):2320-5.
- 51. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, de Sousa-Canavez JM, Dall'Oglio MF, Passerotti CC, et al. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. Int J Biol Markers. 2011;26(4):255-61.
- 52. Zhao Y, Dai Z, Liang Y, Yin M, Ma K, He M, et al. Sequence-specific inhibition of microRNA via CRISPR/CRISPRi system. Sci Rep. 2014;4:3943.
- 53. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. Annu Rev Microbiol. 2010;64:475-93.
- 54. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature. 2012;482(7385):331-8.
- 55. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology. 2005;151(8):2551-61.
- 56. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature. 2011;471(7340):602-7.
- 57. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. Cell. 2017;168(1-2):20-36.
- 58. Farhang N, Brunger JM, Stover JD, Thakore PI, Lawrence B, Guilak F, et al. CRISPR-Based Epigenome Editing of Cytokine Receptors for the Promotion of Cell Survival and Tissue Deposition in Inflammatory Environments. Tissue Eng Part A. 2017.
- 59. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014;157(6):1262-78.
- 60. Yi L, Li J. CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges. Biochim Biophys Acta. 2016;1866(2):197-207.
- 61. Zhou Y, Han C, Li D, Yu Z, Li F, An Q, et al. Cyclin-dependent kinase 11(p110) (CDK11(p110)) is crucial for human breast cancer cell proliferation and growth. Sci Rep. 2015;5:10433.
- 62. Liu T, Shen JK, Li Z, Choy E, Hornicek FJ, Duan Z. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. Cancer Lett. 2016;373(1):109-18.

- 63. O'Prey J, Sakamaki J, Baudot AD, New M, Van Acker T, Tooze SA, et al. Application of CRISPR/Cas9 to Autophagy Research. Methods Enzymol. 2017;588:79-108.
- 64. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. Nature. 2016;539(7630):479.
- 65. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013;8(11):2281-308.
- 66. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
- 67. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4350-4.
- 68. Fei T, Chen Y, Xiao T, Li W, Cato L, Zhang P, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(26):E5207-E15.
- 69. Wei C, Wang F, Liu W, Zhao W, Yang Y, Li K, et al. CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells. Mol Med Rep. 2018;17(2):2901-6.
- 70. Ye R, Pi M, Cox JV, Nishimoto SK, Quarles LD. CRISPR/Cas9 targeting of GPRC6A suppresses prostate cancer tumorigenesis in a human xenograft model. J Exp Clin Cancer Res. 2017;36(1):90.
- 71. Babichenko II, Andriukhin MI, Pulbere S, Loktev A. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-9 and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in prostate adenocarcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(12):9090-8.
- 72. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. Genes Dis. 2015;2(`1):26-34.
- 73. Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(34):13904-9.
- 74. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. Mol Neurodegener. 2015;10:35.
- 75. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell. 2013;154(6):1380-9.
- 76. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-33.
- 77. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.
- 78. Westphal D, Kluck RM, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. Cell Death Differ. 2014;21(2):196-205.
- 79. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 2017;168(6):960-76.
- 80. Zarkesh M, Zadeh-Vakili A, Akbarzadeh M, Fanaei SA, Hedayati M, Azizi F. The role of matrix metalloproteinase-9 as a prognostic biomarker in papillary thyroid cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):1199.
- 81. Joseph C, Alsaleem M, Orah N, Narasimha PL, Miligy IM, Kurozumi S, et al. Elevated MMP9 expression in breast cancer is a predictor of shorter patient survival. Breast Cancer Res Treat. 2020;182(2):267-82.
- 82. Yan W, Li SX, Wei M, Gao H. Identification of MMP9 as a novel key gene in mantle cell lymphoma based on bioinformatic analysis and design of cyclic peptides as MMP9 inhibitors based on molecular docking. Oncol Rep. 2018;40(5):2515-24.
- 83. de Moraes RP, Pimenta R, Mori FNC, Dos Santos GA, Viana NI, Guimarães VR, et al. Tissue expression of MMP-9, TIMP-1, RECK, and miR338-3p in prostate gland: can it predict cancer? Mol Biol Res Commun. 2021;10(4):149-56.
- 84. Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. Biomed Rep. 2016;5(4):395-402.

- 85. Ma X, Conklin DJ, Li F, Dai Z, Hua X, Li Y, et al. The oncogenic microRNA miR-21 promotes regulated necrosis in mice. Nat Commun. 2015;6:7151.
- 86. Folini M, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M, et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. Mol Cancer. 2010;9:12.
- 87. Damodaran M, Chinambedu Dandapani M, SimonDuraiRaj, SandhyaSundaram, VenkatRamanan S, Ramachandran I, et al. Differentially expressed miR-20, miR-21, miR-100, miR-125a and miR-146a as a potential biomarker for prostate cancer. Mol Biol Rep. 2021;48(4):3349-56.
- 88. Kanagasabai T, Li G, Shen TH, Gladoun N, Castillo-Martin M, Celada SI, et al. MicroRNA-21 deficiency suppresses prostate cancer progression through downregulation of the IRS1-SREBP-1 signaling pathway. Cancer Lett. 2022;525:46-54.
- 89. Zhao W, Ning L, Wang L, Ouyang T, Qi L, Yang R, et al. miR-21 inhibition reverses doxorubicin-resistance and inhibits PC3 human prostate cancer cells proliferation. Andrologia. 2021:e14016.
- 90. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. Eur J Med Chem. 2020;194:112260.





Certificamos que o trabalho científico

na modalidade Pôster,

#### intitulado CRISPR-CAS9 GENOME EDITING TO EVALUATION THE ROLE OF MMP9 IN PROSTATE CANCER

dos autores Juliana Alves Camargo, Nayara Izabel Viana, Ruan Cesar Pimenta, Vanessa Ribeiro Guimarães, Gabriel Arantes, Ericka B Trarbach, Kátia R M Leite, William C Nahas, Miguel Srougi, Sabrina T Reis,

foi submetido e aprovado no XI Congresso Internacional de Uro-oncologia.

São Paulo, 31 de março de 2020.

















#### Universidade de São Paulo

### Comissão de Ética no Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Edição genômica com CRISPR/Cas9 para avaliação do papel da MMP9 e microRNA21 no câncer de Próstata \*, protocolada sob o CEUÁ nº 3728200821, sob a responsabilidade de Niels Olsen Saraiva Câmara e equipe; Juliana Alves de Camargo; Fábio Pescarmona Gallucci; Meire Joshie Hiyane - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 22/10/2021.

We certify that the proposal "Genome editing with CRISPR/Cas9 to evaluate the role of MMP9 and microRNA21 in prostate cancer ", utilizing 45 Isogenics mice (45 males), protocol number CEUA 3728200821, under the responsibility of Niels Olsen Saraiva Câmara and team; Juliana Alves de Camargo; Fábio Pescarmona Gallucci; Meire Ioshie Hiyane - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 10/22/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses Depto/Setor: Imunologia

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Machos Idade ou peso: 6 a 7 semanas

Linhagem: Balb/c Nude N amostral:

São Paulo, 22 de outubro de 2021

Profa, Dra, Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)