

**RUAN CÉSAR APARECIDO PIMENTA**

**Potencialização do eixo androgênico acionado pelo colesterol e a  
função supressora do miR-137 sobre os coativadores p160 no câncer de  
próstata**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sabrina Thalita dos Reis  
Faria

**São Paulo**

**2023**

**RUAN CÉSAR APARECIDO PIMENTA**

**Potencialização do eixo androgênico acionado pelo colesterol e a  
função supressora do miR-137 sobre os coativadores p160 no câncer de  
próstata**

**São Paulo**

**2023**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pimenta, Ruan César Aparecido  
Potencialização do eixo androgênico acionado pelo  
colesterol e a função supressora do miR-137 sobre os  
coativadores p160 no câncer de próstata / Ruan César  
Aparecido Pimenta. -- São Paulo, 2023.  
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.Colesterol 3.Coativadores de receptor nuclear  
4.Neoplasias da próstata resistente à castração  
5.microRNAs

USP/FM/DBD-288/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, José e Luzia (in memoriam), pelo amor e carinho. Em especial à minha Mãe, que não pôde estar comigo até o final, mas sei que está sempre presente. Esta tese foi concluída com todo amor e cuidado que ela me ensinou. Agradeço por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e por me dar forças todos os dias, e principalmente nestes últimos meses.

Gostaria de expressar minha gratidão à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sabrina T. Reis. Seu profissionalismo, orientação e dedicação foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para o sucesso deste trabalho. Agradeço por sua paciência, sabedoria e apoio contínuo ao longo destes anos. Sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de aprender com você e por todo o suporte que você ofereceu. Muito obrigado por ser uma mentora e amiga excepcional e por me ajudar a alcançar este marco em minha jornada acadêmica.

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Kátia Leite, minha profunda gratidão pela oportunidade de acompanhar o trabalho além do meu mestrado e doutorado. Sua liderança inspiradora, expertise e apoio inestimável foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal durante esse período. Agradeço pela confiança depositada, por me receber tanto no LIM55 quanto na Genoa e, principalmente, pela liberdade de explorar novos desafios. Sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de trabalhar ao seu lado e aprender com sua experiência. Sua dedicação ao avanço científico e ao LIM55 é inspiradora.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao Prof. Dr. Miguel Srougi por seu constante incentivo e apoio aos trabalhos realizados no LIM55. Sua dedicação em compartilhar conhecimento e promover um ambiente de aprendizado inspirador é verdadeiramente admirável. Agradeço por tudo o que aprendi com você e por ser um exemplo de excelência acadêmica e humanidade.

A todos os funcionários da Urologia, em especial à nossa secretária, Eliza Cruz. Agradeço também à Tereza (in memoriam), por todo carinho e alegria com que nos recebia. À Inisabete e à Aparecida, por sempre estarem dispostas a nos ajudar.

Ao Iran Silva, nosso Biólogo e gerente do LIM55, ensinando mais que técnicas e soluções aos nossos alunos e amigos. Agradeço pelo companheirismo, convivência e ajuda em todos estes anos. É uma honra aprender com você.

Gostaria de agradecer especialmente também à Dr.<sup>a</sup>. Nayara Viana, com todo o meu carinho. Ao longo dessa jornada, compartilhamos inúmeros momentos de aprendizado e descontração, que foram verdadeiramente enriquecedores. Sua presença

trouxe leveza e alegria aos desafios enfrentados, tornando o caminho mais suave. Agradeço por todas as conversas inspiradoras, troca de ideias, risadas compartilhadas e principalmente, por me fazer acreditar que eu sempre fui capaz. Sua amizade e apoio foram essenciais para tornar essa experiência significativa e memorável. Muito obrigado por estar ao meu lado e fazer parte dessa jornada de descobertas e crescimento.

À Me. Vanessa, minha profunda gratidão. Minha querida amiga, obrigado pelo apoio inestimável em diversos momentos ao longo dessa jornada. Você tem sido um pilar memorável, fornecendo um suporte valioso em momentos desafiadores. Sua habilidade em compartilhar conhecimentos e experiências contribuiu significativamente para o meu crescimento. Sou grato por ter você ao meu lado, sempre disposta a ajudar, mesmo que às vezes, por livre e espontânea pressão (rs) e oferecer seu apoio incondicional. Sua amizade tem sido um verdadeiro presente e sou grato por todos os momentos. Muito obrigado por sua presença constante e por ser uma amiga incrível.

À Me. Patrícia Candido, minha amiga de longa data. Agradeço por todo o carinho e apoio que você me ofereceu ao longo dos anos. Sua presença tem sido um verdadeiro presente e sou grato por sempre me incentivar a buscar o meu melhor. Obrigado por estar sempre ao meu lado, compartilhar risadas e acreditar em mim.

À Dr.<sup>a</sup>. Juliana Camargo, gostaria de expressar minha profunda gratidão. Ju, obrigado pela ajuda fundamental em padronizar os modelos animais. Sua experiência e positividade foram de valor inestimável.

Aos meus queridos amigos do LIM55: Feres Camargo, Poliana Romão, Carol Mie, Caroline Chiovatto, Karina Serafim, Vitória Ghazarian, Gabriel Arantes, Luana Silva, Maria Carolina Lee, Marina Violini, Vinicius Genuíno, Giovana Caetano, Giovanna Tamarindo, Guilherme Nebó, Fábio Galucci e Gustavo Inoue. Agradeço pela amizade e por compartilharmos momentos inesquecíveis. Vocês foram verdadeiros parceiros, tornando o ambiente de trabalho agradável e estimulante. Sou grato por todas as trocas de conhecimento, as risadas compartilhadas e o apoio mútuo durante os desafios enfrentados. Vocês são uma parte especial dessa experiência, e estou feliz por tê-los ao meu lado. Muito obrigado por fazerem parte da minha jornada no LIM55.

À minha querida Mãe Luzia Pimenta (in memoriam). Não existem palavras suficientes que possam expressar o quanto sinto sua falta. Sua presença e amor foram e continuam sendo inestimáveis. Agradeço por todo carinho, apoio e ensinamentos que

você me proporcionou. Seu amor incondicional e extremo cuidado, sempre será lembrado e valorizado. Mesmo não estando mais fisicamente ao meu lado, sei que você está sempre comigo, guiando-me e protegendo-me de alguma forma. Sua memória vive em meu coração e cada conquista é dedicada a você. Obrigado por ser minha Mãe e por todo amor que compartilhamos.

Ao meu Pai José Pimenta, minha gratidão por todo amor, apoio e sacrifícios ao longo da minha vida. Sou grato por seus conselhos sábios e seu amor incondicional. Sou abençoado por tê-lo como meu pai.

Agradeço em especial à minha família, meu irmão Evandro Pimenta, sua esposa Magareth e ao meu sobrinho Pablo Pimenta. Aos meus tios e tias: Edna, Rita, Neide, Aparecida, José dos Reis, Benedito e Donizete. Aos meus primos: Eduarda Costa, Thaís Rodrigues, Miriam Rodrigues, Rafael Pimenta, Rosimeire Pimenta e Rogério Pimenta, obrigado por tanto, sou imensamente grato pelo carinho que vocês têm para comigo.

Ao meu querido namorado, Dr. Guilherme Gonçalves, gostaria de expressar minha profunda gratidão por tudo o que você me ensinou, tanto em termos de técnicas científicas quanto de experiências de vida. Sua dedicação em compartilhar seu conhecimento e me apoiar em minha jornada acadêmica é verdadeiramente inspiradora. Além disso, sou grato por todas as lições valiosas que aprendi ao seu lado, que me ajudaram a moldar quem eu sou hoje. Obrigado por estar sempre presente, me encorajando e sendo um pilar de apoio em todos os aspectos da minha vida.

Aos meus amados amigos, Paulo Ricardo, Joabe Campos, Taina Silva, Liz Silva, Itallo Santos e Renan de Paula, Eduardo Moura, Denis Schreiter, Elizabete Ribeiro, Rozi Viana, Antônio Viana, Leandro Faria e Alessandra Reis. Agradeço por serem a família que escolhi e por fazerem a minha caminhada mais feliz e leve.

Por fim, agradeço com todo meu respeito aos animais desse estudo, cujas vidas não se foram em vão e serviram ao propósito maior e mais nobre de beneficiar outras vidas e o avanço científico. Agradeço também aos meus filhos caninos, Isabela (Bela), Theodoro (Theo) e Janaina (Nina), pela companhia de muitas tardes e noites escrevendo esta tese.

À FAPESP pelo apoio concedido tanto para realização deste trabalho (2020/01317-1) como para minha bolsa de doutorado (2019/00156-7), para permanência e dedicação exclusiva à pós graduação.

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (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 *List of Journals Indexed in Index Medicus*.



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XIII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XVII
<b>RESUMO</b> .....	XVIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XX
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1</b> Câncer de Próstata.....	23
<b>1.2</b> Câncer de Próstata Resistente à Castração .....	25
<b>1.3</b> Câncer de Próstata <i>versus</i> Colesterol .....	26
<b>1.4</b> Cofatores do Receptor de Andrógeno .....	29
<b>1.5</b> MicroRNAs .....	30
<b>1.6</b> Justificativa e hipótese .....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>2.1</b> Objetivo geral.....	36
<b>2.2</b> Objetivos específicos.....	36
<b>3. METODOLOGIAS</b> .....	37
<b>3.1</b> Estudos <i>in vitro</i> .....	38
<b>3.1.1</b> Suplementação das células PC-3 com colesterol .....	38
<b>3.1.2</b> Ensaio de eficácia de suplementação com colesterol .....	38
<b>3.1.3</b> Transfecção celular com o miR-137 .....	39
<b>3.1.4</b> Extração do RNA total .....	40
<b>3.1.5</b> Transcrição reversa .....	41
<b>3.1.6</b> Análise de expressão de gênica e do miR por qPCR.....	42
<b>3.1.7</b> Análise de viabilidade, apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo .....	43
<b>3.1.8</b> Imunofluorescência <i>in vitro</i> .....	44
<b>3.1.9</b> Ensaio de migração celular.....	45
<b>3.1.10</b> Ensaio de invasão celular .....	45
<b>3.2</b> Estudos <i>in vivo</i> .....	46
<b>3.2.1</b> Padronização do Modelo animal hipercolesterolêmico.....	46

3.2.2	Perfil lipídico.....	47
3.2.3	Inoculação dos Xenoenxertos.....	47
3.2.4	Desenho Metodológico da padronização do modelo HCOL.....	49
3.2.5	Western Blot.....	50
3.3	Tratamento <i>in vivo</i> com miR-137.....	50
3.4	Ensaio de Imunohistoquímica.....	53
3.5	Imunofluorescência <i>in vivo</i> .....	54
3.6	Análise Estatística.....	55
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
4.1	Resultados <i>in vitro</i> .....	57
4.1.1	O aumento do colesterol associa-se positivamente com a superexpressão dos coativadores p160 no CaP.....	57
4.1.2	Suplementação das células PC-3 com colesterol reduz a apoptose, induz a proliferação e promove a migração celular.....	61
4.1.3	A restauração da expressão do miR-137 em linhagem celular PC-3 impacta negativamente na expressão dos coativadores p160.....	63
4.1.4	A superexpressão do miR-137 nas células PC-3 regula negativamente a migração e invasão celular, alterando o ciclo celular e induzindo a apoptose.....	66
4.2	Resultados <i>in vivo</i> .....	68
4.2.1	Modelo experimental de CPRC com hipercolesterolemia induzida por dieta.....	68
4.2.2	Relação entre aumento do perfil lipídico e expressão de cofatores AR no CPRC..	72
4.2.3	Tratamento intratumoral com miR-137 no modelo experimental de CPRC com hipercolesterolemia induzida por dieta.....	76
4.2.4	A restauração intratumoral do miR-137 leva à redução da expressão da família p160 em xenoenxertos CaP avançados, levando à redução da proliferação.....	79
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>95</b>
	<b>Anexo – 1.</b> Autenticação da linhagem celular PC-3LUC2.....	96
	<b>Anexo – 2.</b> Ficha técnica da ração hipercolesterolêmica.....	97
	<b>Anexo – 3.</b> Ficha técnica da ração controle.....	98
	<b>Anexo 4 -</b> Ficha técnica da ração hipercolesterolêmica PragSoluções.....	99

<b>Anexo 5</b> – Ensaio de viabilidade celular após suplementação das células PC-3 serem suplementadas com colesterol.....	100
<b>Anexo 6</b> – Tempo de suplementação da célula PC-3 com colesterol 2µg/mL. ....	101
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
<b>APÊNDICES</b> .....	108

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AD – Androstenediona;

AR – Receptor Androgênico;

BSA – Albumina de soro bovino;

CaP- Câncer de Próstata;

cDNA – DNA complementar;

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais;

CPHS- Câncer de Próstata Hormônio Sensível;

CPRC- Câncer de Próstata Resistente à Castração;

Ctr - Controle

DHT- Diidrotestosterona;

DP – Dieta Padrão;

HAT- Histona Acetil Transferase;

HCOL - Hipercolesterolêmico;

HDL- Lipoproteína de alta densidade;

IF – Imunofluorescência;

ISUP- Sociedade Internacional de Patologia Urológica;

IT - Intratumoral

LDL- Lipoproteína de baixa densidade;

miRs – microRNAs;

PSA- Antígeno Prostático Específico;

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

RNAm – RNA mensageiro;

rpm- Rotação por minutos;

STR – Short Tandem Repeat;

T – Testosterona;

TCGA- Atlas do Genoma do Câncer;

TDA – Terapia de privação androgênica;

WB – Western Blot;

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via de sinalização da biossíntese de andrógenos na fisiologia normal e no câncer de próstata (8). Androstenediona (AD), Testosterona (T), Di-hidrotestosterona (DHT). ..... 28
- Figura 2.** Representação esquemática da biogênese do microRNA, adaptada (62). ..... 32
- Figura 3.** Plano Experimental. 21 dias antes do xenoenxerto, camundongos machos NOD/SCID com 6 semanas foram alocados para dieta hipercolesterolêmica (N = 11) e para dieta controle (N = 11). No dia 0, todos os animais (22) foram inoculados dorsalmente com células PC-3M-luc-C6 ( $1,5 \times 10^6$ ). A monitorização tumoral ocorreu do sétimo ao trigésimo segundo dia. Ao final de 32 dias, os níveis de colesterol foram aferidos e os animais foram eutanasiados para coleta e análises das peças tumorais. ... 49
- Figura 4.** Plano experimental do modelo hipercolesterolêmico tratado com miR-137. Vinte e um dias antes do xenoenxertos, camundongos machos NOD / SCID foram aleatoriamente designados para uma Dieta Padrão (DP, N = 8) ou uma dieta hipercolesterolêmica (HCOL, N = 8). No dia 0, as células foram injetadas no subcutâneo (dorso) dos animais. O volume do tumor e a bioluminescência foram medidos semanalmente, e o tratamento ocorreu quando os animais atingiram um volume de tumor  $\geq 50 \text{ mm}^3$ . Posteriormente, os animais foram separados em quatro grupos para tratamento: DP (Scramble N = 4 e miR-137 N = 4) e HCOL (Scramble N = 4 e miR-137 N = 4). . 52
- Figura 5.** Imagem ilustrativa da aquisição de bioluminescência dos animais xenoenxertados com células PC-3M-Luc-C6..... 53
- Figura 6.** Exposição da linha celular PC-3 ao colesterol ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) por 8h. A) Representação gráfica dos grupos Ctr e Colesterol corados com Oil Red O. As imagens superiores foram obtidas com uma ampliação de 10x e as inferiores com 20x. B) Níveis de expressão dos genes SRC-1 na ausência e na presença de Col. C) Níveis de expressão do gene SRC-2 na ausência e na presença de Col. D) Níveis de expressão do gene SRC-3 na ausência e na presença de Col. E) Níveis de expressão do gene AR na ausência e na presença de colesterol. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. O teste T foi usado em todas as análises. .... 58
- Figura 7.** Efeito da suplementação de células PC-3 com colesterol ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) por 8h, na expressão de proteínas coativadoras de AR por imunofluorescência (IF). A) Imagens representativas de IF dos grupos de controle e colesterol. Observamos uma maior concentração das proteínas no citoplasma, no grupo de controle. Após a suplementação com colesterol, observa-se uma migração das proteínas coativadoras para o núcleo da célula, aumentando, conseqüentemente, a expressão de AR. B) Níveis de expressão das proteínas SRC-1 e AR na ausência e na presença de colesterol. C) Níveis de expressão da proteína SRC-2 e AR na ausência e na presença de colesterol. D) Níveis de expressão da proteína SRC-3 e AR na ausência e na presença de colesterol. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. O teste T foi usado em todas as análises. 60
- Figura 8.** Influência do colesterol (Col) na migração celular e nos ensaios de citometria de fluxo com células PC-3. A) Imagens representativas do ensaio de migração celular, usando controle não suplementado (Ctr), e células suplementadas com Col em 0, 8, 24,

48 e 72 horas. B) Representação gráfica entre o aumento da migração celular com a progressão do tempo, teste T. C) Porcentagem de células apoptóticas suplementadas com Ctr e Col, teste T. D) Porcentagem de células suplementadas com Ctr e Col em cada fase do ciclo celular, teste T. E) Porcentagem de células em proliferação suplementadas com Ctr e Col. A proliferação celular é baseada nas porcentagens de células nas fases S e G2-M do ciclo celular, teste T. As células PC-3 foram suplementadas com 2 µg/mL de Col por 24 horas. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são exibidos acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. ... 62

**Figura 9.** Efeito da superexpressão do miR-137 na linhagem de células PC-3. A) Eficácia da transfecção do miR-137. B) Níveis de RNAm de SRC-1 pós-transfecção. C) Níveis de RNAm de SRC-2 pós-transfecção. D) Níveis de RNAm de SRC-3 pós-transfecção. E) Níveis de RNAm de AR pós-transfecção. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. .... 64

**Figura 10.** Efeito da superexpressão do miR-137 sobre os coativadores p160. A) Representação gráfica da imunofluorescência pós-transfecção com miR-137. B) Níveis de proteína de SRC-1 e AR. C) Níveis de proteína de SRC-2 e AR. D) Níveis de proteína de SRC-3 e AR. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. .... 65

**Figura 11.** Efeito do miR-137 nos ensaios de migração, invasão, formação de colônias e citometria de fluxo. A) Representação do ensaio de migração celular em 0, 24 e 48 horas. B) As taxas de migração celular de 24h e 48h foram calculadas a partir do tempo 0h. O gráfico representa análises individuais sobre seus respectivos controles entre os tempos de 24h e 48h. C) Representação do ensaio de invasão celular de miR-137 e Scramble. D) Diferença estatística entre o número de células na invasão. E) Representação do ensaio de formação de colônias. F) Análise gráfica da proporção de áreas de colônia após o tratamento com miR-137. G) Índice de apoptose após a transfecção das células. H) Ensaio de ciclo celular, fases G0/G1, S e G2/M. I) Porcentagem de células em proliferação calculada a partir das fases S e G2 / M do ciclo celular. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. .... 67

**Figura 12.** Efeito do colesterol sobre volume do tumor e perfil lipídico sérico e intratumoral nos modelos animais. A) O gráfico mostra o volume médio do tumor (mm<sup>3</sup>) ao longo do tempo, Teste de Mann-Whitney. Imagens representativas dos tumores nos grupos DP e HCOL no final do período experimental. B) Peso médio do tumor nos grupos DP e HCOL, Teste T. C) Níveis médios de colesterol sérico dos grupos DP e HCOL, Teste de Mann-Whitney. D) Níveis médios de LDL sérico dos grupos DP e HCOL, Teste T. E) Níveis de colesterol intratumoral dos grupos DP e HCOL, Teste T. F) Níveis médios de triglicerídeos intratumorais dos grupos DP e HCOL, teste de Mann-Whitney. G) Níveis médios de testosterona intratumoral, teste de Mann-Whitney. H) Níveis médios intratumorais de DHT, teste T. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são exibidos acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. .... 71

**Figura 13.** Efeito in vivo do colesterol sobre a expressão gênica dos coativadores p160 e do AR. A) Níveis de expressão do gene SRC-1. B) Níveis de expressão do gene SRC-2.

C) Níveis de expressão do gene SCR-3. D) Níveis de expressão do gene AR. O Teste de Mann-Whitney foi empregado em todas as análises. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras..... 73

**Figura 14.** Efeito in vivo do colesterol sobre as proteínas p160 e AR por Western blot (WB). A) Imagens representativas de WB dos grupos DP e HCOL. Observamos um aumento da proteína nos tumores dos animais que receberam a dieta HCOL. B) Níveis de expressão da proteína SCR-1. C) Níveis de expressão da proteína SCR-2. D) Níveis de expressão da proteína SRC-3. E) Níveis de expressão da proteína AR. O teste T foi aplicado em todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras..... 75

**Figura 15.** Efeito da restauração intratumoral do miR-137 no modelo de CaP com hipercolesterolemia induzida por dieta. A) Perfil do colesterol, DP. B) Perfil do colesterol, HCOL. C) Níveis de HDL, DP. D) Níveis de HDL, HCOL. E) Bioluminescência (IVIS), grupo DP (Scramble vs. miR-137). F) Diferença entre a intensidade de bioluminescência dos subgrupos Scramble e miR-137, DP). G) Diferença entre o volume tumoral dos subgrupos Scramble e miR-137, paquímetro digital (DP). H) Bioluminescência (IVIS), grupo HCOL (Scramble vs. miR-137). I) Diferença entre a intensidade de bioluminescência dos subgrupos Scramble e miR-137 (HCOL). J) Diferença entre o volume tumoral dos subgrupos Scramble e miR-137, paquímetro digital (HCOL). O teste t foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras..... 77

**Figura 16.** Expressão do miR-137 e de seus RNAm-alvo pós-tratamento. A) Níveis de expressão do miR-137 no grupo DP, Teste de Mann Whitney. B) Níveis de expressão do miR-137 no grupo HCOL, Teste de Mann Whitney. C) Níveis de expressão SRC-1 nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. D) Níveis de expressão SRC-2 nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. E) Níveis de expressão SRC-3 nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. F) Níveis de expressão AR nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. As análises estatísticas para os genes p160 e AR foram feitas individualmente, com seu controle e miR dentro de seu grupo de dados, DP (Scramble x miR) e HCOL (Scramble x miR). ..... 80

**Figura 17.** Efeito in vivo da restauração do miR-137 sobre a expressão das proteínas p160 e AR. A) Representação de IF em tecidos imunomarcados com anti-SRC-1, SRC-2, SRC-3 e AR tratados com miR-137 e seu respectivo controle. B) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-1 e AR. C) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-2 e AR. D) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-3 e AR. O teste T foi usado em todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. .... 82

**Figura 18.** Efeito in vivo da restauração do miR-137 no modelo HCOL sobre expressão das proteínas p160 e AR. A) Representação de IF em tecidos imunomarcados com anti-SRC-1, SRC-2, SRC-3 e AR tratados com miR-137 e seu respectivo controle. B) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-1 e AR. C) Níveis de intensidade de fluorescência

de SRC-2 e AR. D) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-3 e AR, teste Mann Whitney. O teste T foi usado em todas as análises, exceto AR/SRC-3. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras..... 83

**Figura 19.** Índice de proliferação do tecido por Ki-67. Os níveis de proliferação celular foram medidos pela reação de imuno-histoquímica Ki-67 (Clone Mib-1). A) Imagens representativas do grupo DP após o tratamento com miR-137 e Scramble. B) Análise estatística da proliferação de tecidos no grupo DP. C) Imagens representativas do grupo HCOL após o tratamento com miR-137 e controle. D) Análise estatística da proliferação de tecidos no grupo HCOL. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras..... 84



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ensaio TaqMans utilizados no estudo .....	43
<b>Tabela 2.</b> Volumes tumorais do modelo HCOL e Controle. ....	69
<b>Tabela 3.</b> Média dos pesos dos animais dos grupos DP e HCOL no decorrer do plano experimental .....	69
<b>Tabela 4.</b> Médias dos volumes tumorais do grupo DP tratados com miR-137. ....	78
<b>Tabela 5.</b> Médias dos volumes tumorais do grupo Dieta HCOL tratados com miR-137. ....	78
<b>Tabela 6.</b> Média dos pesos do animais durante o tratamento com miR-137, DP. ....	78
<b>Tabela 7.</b> Média dos pesos do animais durante o tratamento com miR-137, HCOL. ....	79

## RESUMO

Pimenta RCA. Potencialização do eixo androgênico acionado pelo colesterol e a função supressora do miR-137 sobre os coativadores p160 no câncer de próstata [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**INTRODUÇÃO:** O câncer de próstata (CaP) pode ser influenciado por níveis elevados de colesterol, o que leva a alterações na via de sinalização androgênica intratumoral. O colesterol, além de ser uma molécula precursora para a síntese de hormônios esteroides, pode se acumular e interagir com o receptor de andrógeno (AR) e ainda aumentar a sua atividade. A compreensão destes mecanismos moleculares no CaP, resistente à castração, não é totalmente elucidada. Alguns coativadores do AR, como os pertencentes a família p160, SRC-1, SRC-2 e SRC-3, estão envolvidos na modulação do metabolismo do colesterol nas células cancerígenas da próstata, e podem afetar a atividade de transativação do AR. Além disso, a interação entre coativadores e AR podem ser influenciadas por microRNAs, pequenas moléculas de RNA que regulam a expressão gênica. Estudos recentes têm sugerido que certos microRNAs estão envolvidos na regulação do AR e podem desempenhar um papel na modulação do metabolismo do colesterol nas células cancerígenas. O miR-137 especificamente, apresenta regiões de ligação para os três componentes da família p160 e apresenta atividade antiproliferativa no CaP. Portanto, a investigação do efeito do colesterol e do miR-137 sobre os coativadores p160 e do AR pode fornecer dados importantes para o entendimento e o tratamento do CaP resistente à castração. **OBJETIVOS:** Este estudo objetivou investigar o impacto do colesterol sobre os coativadores do AR e explorar o possível efeito supressor do miR-137 no CaP, incluindo o modelo animal com hipercolesterolemia, induzida por dieta. **MÉTODOS:** O efeito do colesterol sobre os coativadores de AR (SRC-1, 2, 3) foram estudados em células PC-3. A expressão gênica dos coativadores foi analisada, usando qPCR após a exposição a 2 µg/mL de colesterol por 8 horas. A migração celular, a viabilidade, a apoptose e o ciclo celular foram avaliados por meio de ensaios de citometria de fluxo. A expressão proteica dos coativadores de AR foi avaliada por Imunofluorescência e Western Blot. Os experimentos *in vivo* foram realizados com camundongos NOD/SCID machos, alimentados com uma dieta padrão (DP) ou hipercolesterolêmica (HCOL). O crescimento do tumor, o perfil lipídico sérico, o perfil lipídico intratumoral e a expressão dos coativadores p160 e do AR foram averiguados ao final da experimentação, bem como o efeito do miR-137 sobre o modelo de CPRC com HCOL, administrado via intratumoral. **RESULTADOS:** A suplementação com colesterol induziu positivamente a expressão gênica dos coativadores SRC-1, SRC-2 e SRC-3, levando ao aumento da expressão de AR nas células PC-3. As células suplementadas com colesterol apresentaram aumento da migração, fases alteradas do ciclo celular, aumento da proliferação e redução da apoptose. Os dados relacionados ao tratamento das células PC-3 com o miR-137 apontaram que este miR foi capaz de inibir a expressão gênica e proteica dos coativadores p160 e a expressão do AR. Após estas constatações, demonstramos que a indução do miR-137 inibe a migração e invasão celular, apresenta impacto negativo na taxa de proliferação e induz o aumento dos níveis de apoptose. No modelo *in vivo*, o grupo HCOL apresentou níveis mais altos de colesterol sérico e intratumoral, aumento das concentrações de testosterona e Dihidrotestosterona e

expressão aumentada dos coativadores p160 e do AR. O volume tumoral foi significativamente maior no grupo HCOL, quando associado ao grupo DP. Nos modelos tratados com miR, apresentamos que, tanto o grupo DP quanto o grupo HCOL exibiram velocidade de crescimento tumoral reduzida após a restauração intratumoral do miR-137 e níveis reduzidos de proliferação. **CONCLUSÕES:** De forma geral, a suplementação das células PC-3 com colesterol levou ao aumento da expressão gênica e proteica dos coativadores p160 e AR, além de impactar significativamente no aumento da proliferação celular, diminuição dos níveis de apoptose e aumento do volume tumoral no modelo *in vivo*. O tratamento com o miR-137 foi capaz de suprimir a expressão dos coativadores p160 e reduzir os níveis de AR, levando a uma redução da velocidade de crescimento tumoral no modelo *in vivo*. Esses resultados destacam o potencial terapêutico do miR-137 para restaurar a transcrição mediada por AR e a transativação da via androgênica no CaP, potencialmente influenciada pelos níveis de colesterol.

**Palavras-chaves:** Neoplasias da Próstata. Colesterol. Coativadores de Receptor Nuclear. Neoplasias da Próstata Resistente à Castração. MicroRNAs.

## ABSTRACT

Pimenta RCA. Cholesterol-driven enhancement of the androgenic axis and the suppressive role of miR-137 in p160 coactivators on prostate cancer. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

**INTRODUCTION:** Elevated cholesterol levels can influence prostate cancer (PCa), which leads to alterations in the intratumoral androgen signaling pathway. In addition to being a precursor molecule for synthesizing steroid hormones, cholesterol can accumulate and interact with the androgen receptor (AR), further enhancing its activity. Understanding these molecular mechanisms in castration-resistant prostate cancer is not fully elucidated. Some coactivators of AR, such as those belonging to the p160 family, SRC-1, SRC-2, and SRC-3, are involved in modulating cholesterol metabolism in prostate cancer cells and can affect AR transactivation activity. Moreover, the interaction between coactivators and AR can be influenced by microRNAs, small RNA molecules that regulate gene expression. Recent studies have suggested that certain microRNAs are involved in AR regulation and may play a role in modulating cholesterol metabolism in cancer cells. Specifically, miR-137 has binding regions for all three components of the p160 family and exhibits antiproliferative activity in PCa. Therefore, investigating the effect of cholesterol and miR-137 on p160 coactivators and AR may provide essential insights for understanding and treating castration-resistant prostate cancer.

**OBJECTIVES:** This study aimed to investigate the impact of cholesterol on AR coactivators and explore the potential suppressive effect of miR-137 in PCa, including an animal model with diet-induced hypercholesterolemia.

**METHODS:** The effect of cholesterol on AR coactivators (SRC-1, SRC-2, SRC-3) was studied in PC-3 cells. Coactivator gene expression was analyzed using qPCR after exposure to 2 µg/mL of cholesterol for 8 hours. Cell migration, viability, apoptosis, and cell cycle were assessed through flow cytometry assays. Protein expression of AR coactivators was evaluated by immunofluorescence and Western blot. In vivo experiments were conducted using male NOD/SCID mice fed a standard diet (SD) or a hypercholesterolemic diet (HCOL). Tumor growth, serum lipid profile, intratumoral lipid profile, and expression of p160 coactivators and AR were assessed at the end of the experiment, along with the effect of miR-137 on the HCOL-induced CPRC model administered intratumorally.

**RESULTS:** Cholesterol supplementation positively induced gene expression of SRC-1, SRC-2, and SRC-3 coactivators, leading to increased AR expression in PC-3 cells. Cholesterol-supplemented cells showed enhanced migration, altered cell cycle phases, increased proliferation, and reduced apoptosis. Data related to PC-3 cell treatment with miR-137 indicated that this miRNA could inhibit gene and protein expression of p160 coactivators and AR. Following these findings, we demonstrated that miR-137 induction inhibits cell migration and invasion, has a negative impact on proliferation rate, and induces increased levels of apoptosis. In the in vivo model, the HCOL group exhibited higher serum and intratumoral cholesterol levels, increased concentrations of testosterone and dihydrotestosterone, and increased expression of p160 coactivators and AR. Tumor volume was significantly more significant in the HCOL group when compared to the SD group. In the miR-treated models, the SD and HCOL groups displayed reduced tumor growth rates after the

intratumoral restoration of miR-137 and decreased proliferation levels. **CONCLUSIONS:** Overall, cholesterol supplementation of PC-3 cells led to increased gene and protein expression of p160 coactivators and AR, significantly impacting cell proliferation, reducing apoptosis levels, and increasing tumor volume in the in vivo model. Treatment with miR-137 was able to suppress the expression of p160.

**Keywords:** Prostatic Neoplasms. Cholesterol. Nuclear Receptor Coactivators. Castration-Resistant Prostate Cancer. MicroRNAs.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é o segundo câncer mais rotineiramente diagnosticado e é a sexta causa de morte mais comum dentre os homens. Estima-se que até o ano de 2040 sua incidência ultrapasse 2,3 milhões de novos casos em todo o mundo, com previsão de morte de 740 mil (1). Segundo dados do GLOBOCAN (2020), para o Brasil, considerando ambos os sexos, o CaP foi o tipo de tumor mais incidente dentre a população geral (2). Em todo o mundo, considerando apenas homens com idade igual ou superior a 55 anos, notadamente a América do Sul, assim como o Continente Africano se destacam tanto em estimativa de novos casos, quanto em número de mortes (3).

Os testes de dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA), graduação histológica (ISUP), exame de toque retal e biópsia prostática guiada por ultrassonografia, são atualmente utilizados para rastreamento e detecção do CaP (4). No entanto, todos estes exames parecem ser insuficientes na prevenção do comportamento da doença. O CaP é um exemplo paradigmático de neoplasia pela sua heterogeneidade. Sua disparidade morfológica e heterogeneidade molecular de alto nível refletem a complexidade dessa neoplasia, tanto no contexto clínico como na pesquisa (5). Sendo assim, este cenário leva a um aumento no número de pesquisas que buscam caracterizar o CaP por inúmeros aspectos, desde a descoberta de novos biomarcadores até novas abordagens terapêuticas (6).

O receptor androgênico (AR) desempenha um papel primordial no CaP (7, 8). Diversos estudos têm apresentado o papel do AR na progressão da neoplasia, incluindo o fenótipo Câncer de Próstata Resistente à Castração (CPRC), forma avançada do CaP que pode ocorrer após a terapia de privação androgênica (TDA) ou castração. Mesmo na

presença de baixos níveis de andrógenos, as células de CPRC ainda dependem de AR funcional (9-12). Desde que Huggins e Hodges (1941) demonstraram pela primeira vez o papel da sinalização androgênica no CaP (13), os tratamentos têm como objetivo a modulação desta sinalização (14), e apesar de uma excelente resposta inicial em aproximadamente três anos, grande parte destes pacientes sucumbirá à forma resistente à castração (15). O manejo clínico da doença localmente avançada não apresenta um tratamento único, levando em conta a grande variabilidade desses tumores apresentarem riscos. No entanto, a conduta terapêutica para grande parte destes fenótipos neoplásicos é a combinação de radiação e terapia hormonal (16). Como as novas técnicas de tratamento para a doença avançada continuam a evoluir, homens com esse fenótipo neoplásico tendem a viver mais (17). Todavia, o CaP continua sendo uma das maiores causas de morte decorrente de câncer entre os homens (1).

Inúmeros projetos embasaram a genética e biologia molecular do CaP após a era do sequenciamento de diversos tumores. Entre eles, destacam-se o Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) e o Consórcio Internacional do Genoma do Câncer que fornecem um enorme conhecimento, especificamente para a neoplasia prostática (18). Embora estes trabalhos tenham trazido um olhar diferenciado para o CaP, foi verificado que os fundamentos genéticos desse tipo tumoral são mais complexos do que se esperava, em relação a outros tipos de tumores altamente recorrentes. O TCGA traz uma classificação muito bem delineada para outros tipos tumorais; já para o CaP foram encontrados mais de sete subtipos moleculares distintos, e cada um apresenta uma base genética recorrente e distinta das demais (18).

Com biologia peculiar e alta incidência, o CaP apresenta uma grande variabilidade na sua agressividade, podendo se estender desde uma patologia indolente até uma forma



incurável, onde a terapêutica é limitada (19). Muitos estudos já investigaram o papel tanto diagnóstico quanto prognóstico de genes únicos, sobretudo aqueles que são alterados recorrentemente no CaP (20, 21). Alguns estudos abordaram também a heterogeneidade do tumor em sua fase metastática (22-24), especialmente tendo como fato de que aproximadamente 90% dos tumores metastáticos apresentam alterações genéticas (25).

## 1.2 Câncer de Próstata Resistente à Castração

Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado o papel do AR na carcinogênese e progressão do CaP, incluindo o fenótipo CPRC. Esses estudos demonstram que apesar da depleção sistêmica de andrógenos, a via de sinalização do AR permanece ativa (9-12). Com base nesses dados, vários agentes terapêuticos foram desenvolvidos na tentativa de bloquear ao máximo a interação entre o AR e seus ligantes (26-28).

Pesquisas têm demonstrado que o tratamento com antagonistas do AR pode aumentar a incidência de mutações nos sítios de domínios de ligação do ligante do AR no CPRC quando comparado à terapia hormonal isolada, e algumas dessas mutações foram atreladas à maior especificidade de ligação aos ligantes de AR, sensibilizando-o para outros hormônios esteroides (29-31) e, surpreendentemente, para alguns anti-androgênicos que são convertidos em agonistas mais potentes (32).

Embora os avanços direcionados para o AR tenham sido significativos e traduzidos em melhora na taxa de sobrevivência de pacientes com CPRC, esse estado da doença permanece incurável e ainda está associado a uma significativa mortalidade (33).

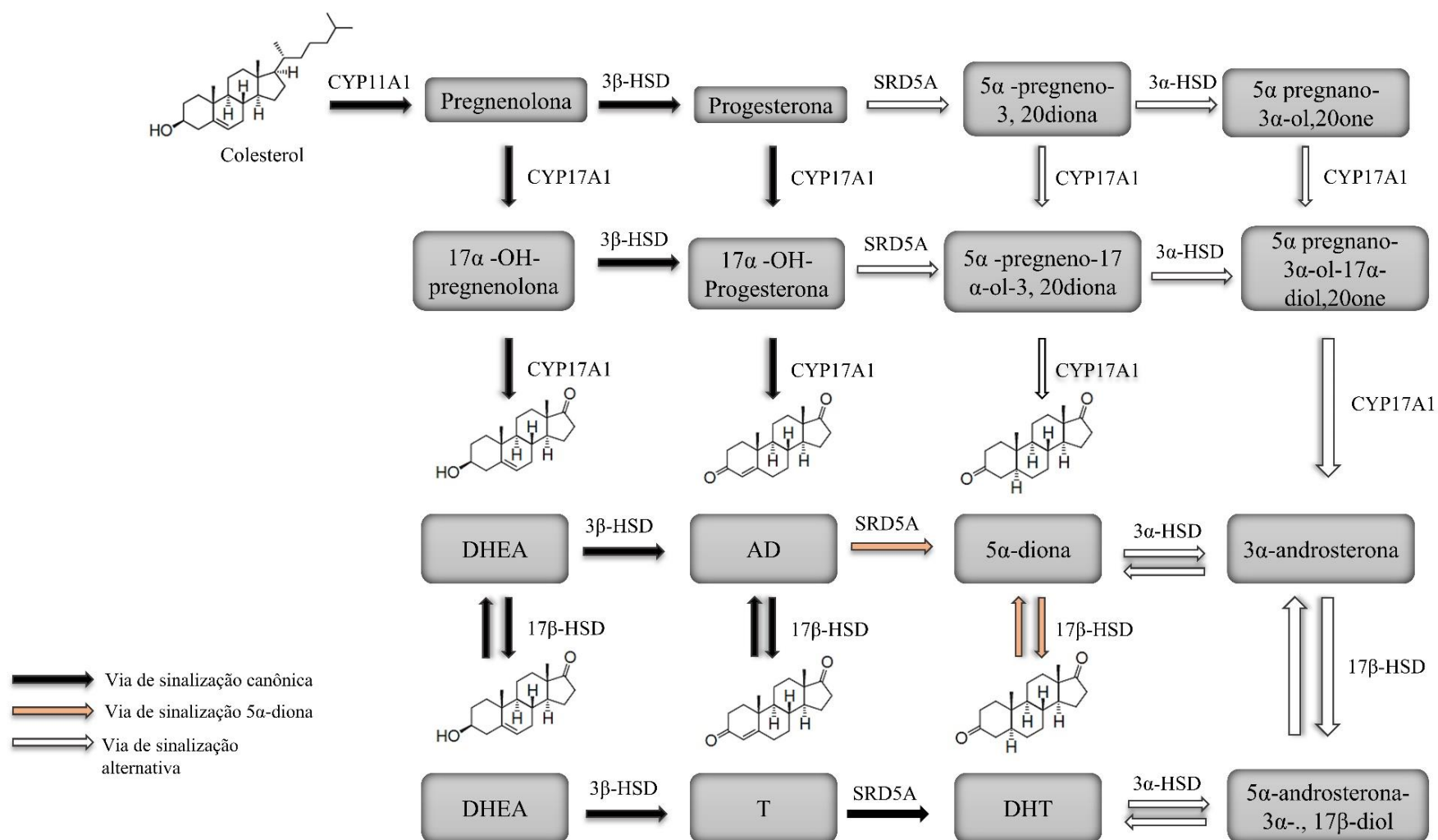
Ao mesmo tempo em que a inserção de novos anti-androgênicos tenha trazido benefícios por meio de inibição do crescimento tumoral (34), esses anti-androgênicos também foram responsáveis pelo surgimento de diversas mutações relacionadas à resistência a hormônio terapia no CaP, além de perda de massa muscular e densidade mineral óssea (35), desregulação do perfil lipídico (hipercolesterolemia) e outros efeitos negativos sobre o metabolismo, principalmente o celular (36).

### 1.3 Câncer de Próstata *versus* Colesterol

Alguns estudos sugerem que a hipercolesterolemia pode aumentar a sinalização androgênica intratumoral no CaP. Entretanto não ficou clara a existência de uma via de mecanismos independentes de andrógeno (37). Como a hipercolesterolemia parece estar associada ao CPRC, é importante determinar como isto afeta a via de progressão do CaP na ausência de sinalização androgênica (37). Embora o mecanismo não seja completamente conhecido, foi visto que a hipercolesterolemia induzida por dieta promoveu metástases de células xenoenxertadas, PC-3, em modelo ortotópico. Já em estudos *in vitro*, a suplementação com colesterol nas células PC-3 estimulou a migração celular. Sendo assim, estes dados apresentam que a hipercolesterolemia pode promover metástase de CaP independente da via androgênica (37). Contudo, este fenômeno necessita de maiores esclarecimentos.

Diversas teorias surgem em relação à formação dos andrógenos intratumorais (38). A principal via descrita e mais bem compreendida até o momento é a via da lipogênese de novo, que se inicia a partir de uma molécula de colesterol e envolve várias

etapas para a síntese final de dihidrotestosterona (DHT). Esse evento pode ocorrer por uma via canônica, conforme já apresentado por Sharifi e Auchus, (2012) ou por uma via alternativa ("*backdoor*"), a qual envolve a atividade intratumoral da CYP17A1 (39) (Figura 1).



**Figura 1.** Via de sinalização da biossíntese de andrógenos na fisiologia normal e no câncer de próstata (8). Androstenediona (AD), Testosterona (T), Di-hidrotestosterona (DHT).

A regulação positiva da síntese de ácido graxos no CaP já foi correlacionada como consequência final de uma cascata de eventos, visto que este evento pode alterar desde a expressão gênica até a perda de proteínas essenciais para supressão da tumorigênese prostática (40-42). Globalmente, todos estes eventos apresentam que a via *de novo* lipogênese é uma característica única do câncer, sendo assim um alvo terapêutico atraente para o CaP.

Dada a associação da hipercolesterolemia com o CPRC (43-45), é importante determinar se os altos níveis de colesterol circulante podem afetar diretamente a progressão avançada do CaP na ausência de sinalização androgênica, por ativação de outras moléculas que podem ter efeito direto sobre o AR.

Sendo a sinalização androgênica de suma importância para a transição do Câncer de Próstata Hormônio Sensível (CPHS) para o CPRC, existe uma necessidade de identificar novos componentes que poderão futuramente servir como biomarcadores, e também para fins terapêuticos no CaP. Neste sentido, ressaltamos os cofatores do AR que podem representar novos alvos terapêuticos atraentes para esta patologia, pois o AR pode recrutar inúmeros cofatores enzimáticos transcricionais para sua ativação (46).

#### **1.4 Cofatores do Receptor de Andrógeno**

Por definição, os cofatores são proteínas que interagem com o AR e aumentam (coativadores) ou reduzem (correpressores) sua transativação. Ao contrário disso, os cofatores influenciam a transcrição mediada pelo AR, promovendo a estabilidade, a formação do homodímero, a translocação nuclear, a ligação do AR a elementos responsivos a andrógenos, a remodelação da cromatina, o recrutamento de fatores gerais

de transcrição, incluindo RNA polimerase II, e ou a capacidade de AR para aumentar a expressão gênica diretamente (47, 48). Nos últimos 15 anos, grande número de proteínas foram identificadas como cofatores de AR, e esses cofatores parecem estar intimamente implicados no desenvolvimento de CaP e na progressão da neoplasia. Portanto, cofatores de AR podem representar uma nova geração de alvos terapêuticos moleculares tanto em CaP primário quanto no CPRC (49).

Dentre os cofatores de AR, a formação de um complexo de pré-iniciação ativo ocorre através do recrutamento sequencial de cofatores do AR ativo. Os primeiros cofatores descritos e mais amplamente compreendidos são os coativadores p160 que formam uma pequena família constituída por três proteínas de 160 kDa, designadas como SRC-1, SRC-2 (TIF2/GRIP1) e SRC-3 (AIB1/NC0A3) (50-52). Já foi postulado que a família p160 influencia na capacidade de transativação diretamente do AR via atividade intrínseca da histona acetiltransferase (HAT) (53). Alterações nos níveis da família p160 já foram relatadas no fenótipo CPCR (54).

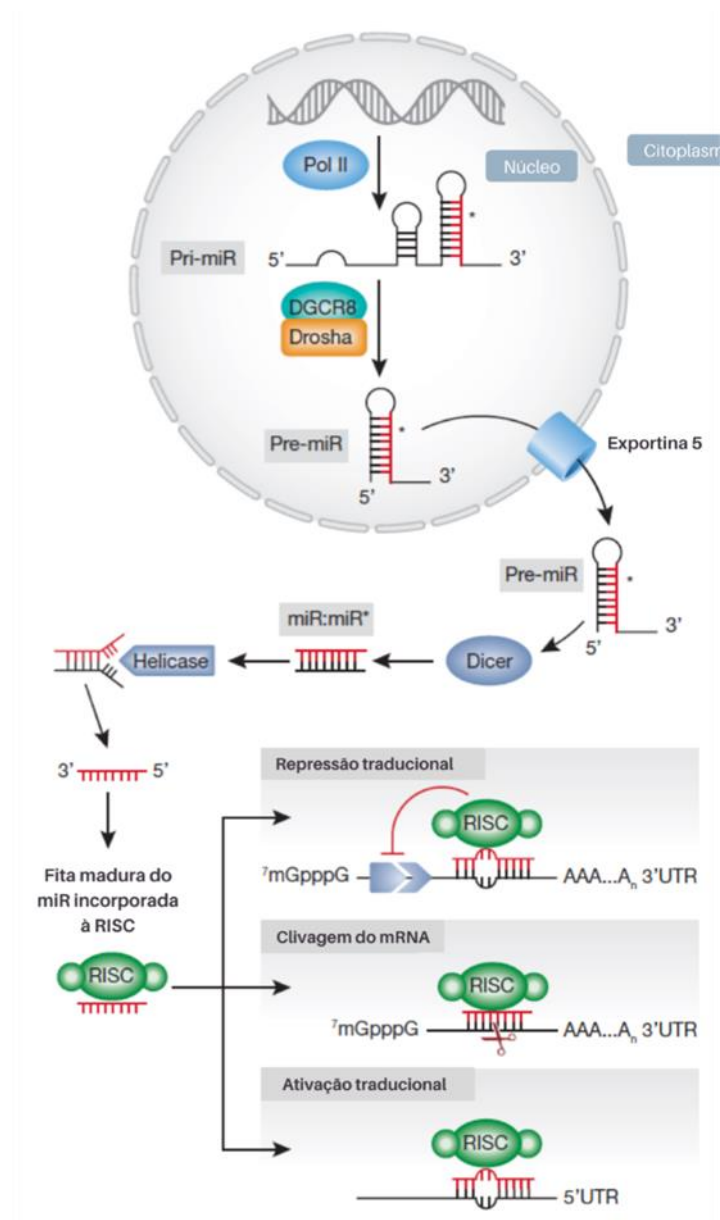
Uma investigação profunda acerca dos mecanismos de resistência, bem como sobre possíveis mecanismos proporcionados por moléculas reguladoras, como os microRNAs (miRs), podem auxiliar na compreensão da biologia molecular do CPCR e nos estudos das moléculas coativadoras do AR (55-58).

## 1.5 MicroRNAs

Múltiplas formas de pequenas moléculas de RNAs estão relacionadas à supressão da tradução em eucariotos, como estimuladores de atividade celular, indução de apoptose, diferenciação, proliferação e até mesmo degradação de RNA mensageiro (RNAm) (59).

Essas pequenas moléculas, conhecidas como microRNAs (miRs), quando maduras, são constituídas de 19 a 25 nucleotídeos e são capazes de regular a expressão gênica através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvos de RNAm (59, 60).

Após um pré-processamento no núcleo, os miRs (fita dupla) são levados para o citoplasma através da exportina-5, onde sofrem o processamento pela enzima Dicer e o transformam em um miR maduro de fita simples. Após esta clivagem, esta fita madura de miR é incorporada ao complexo efetor RISC, o qual é encarregado de levar o miR maduro até seu RNAm alvo (60, 61). Ao reconhecer sítios específicos na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene alvo, os miRs regulam então a expressão gênica através de um mecanismo pós-transcricional, o qual dependerá do grau de complementariedade de ligação miR-RNAm do gene alvo (62) (Figura 2). Os miRs podem atuar tanto de forma individual como em conjuntos/clusters, coordenando diversos processos celulares, e além disso, os miRs podem ser considerados como protetores (supressores tumorais) ou como oncomiRs, evidenciando grande interesse na terapêutica para inúmeros tipos de câncer, incluindo o CaP (63).



**Figura 2.** Representação esquemática da biogênese do microRNA, adaptada (62).

O miR-137 já foi postulado tendo como alvo direto os fatores de coativação do AR (SRC1, 2 e 3) em linhagens de CaP, LNCaP e 22Rv1. O miR-137 apresentou ação supressora sobre a transcrição tanto dependente quanto independente dos receptores de esteroides, mediada pela família p160 e pode exercer atividade antiproliferativa significativa em células de câncer de bexiga e próstata. Estes achados sugerem fortemente



que mais pesquisas, envolvendo este miR devam ser realizadas para achados que possam embasar ainda mais o uso do miR-137 como tratamento alvo no CaP (58). É sabido que o miR-137 é metilado no CaP (64) e sendo assim, restaurar sua expressão se torna uma alternativa ainda mais atraente.

### 1.6 Justificativa e hipótese

Perante a necessidade de melhor compreensão da via de sinalização do AR e seus cofatores, alguns estudos têm investigado a transativação do AR via ativação de seus cofatores (Ativadores e Repressores) na progressão do CPRC. De fato, muitos destes cofatores estão implicados no CPRC, através de uma ampla gama de mecanismos moleculares (26). Recentemente, várias linhas de pesquisas têm evidenciado que células de CaP sintetizam seus próprios andrógenos, principalmente no ambiente resistente à castração (65, 66).

Já foi demonstrado que dietas hipercolesterolêmicas promovem o crescimento de células tumorais de próstata, enquanto as dietas com baixo teor de colesterol, ou ausência deste, retardam-nas. O nível de colesterol circulante já foi associado ao crescimento tumoral e aos níveis de andrógenos intratumorais, especialmente a testosterona. Desta forma, observa-se que os níveis de colesterol circulante influenciam os níveis de andrógenos tumorais e, por isso, hipotetizamos que altos níveis de colesterol possam influenciar nas expressões, sejam elas gênicas ou proteicas dos cofatores do AR, o que pode impactar na coativação deste receptor e na reativação do eixo androgênico no CPRC.

Este trabalho buscou avaliar o perfil de expressão dos cofatores do AR em modelo hipercolesterolêmico e dieta padrão *in vitro* e *in vivo*, na tentativa de compreender como estes cofatores se comportam nestes tipos de ambiente e buscar dados que possam auxiliar

na criação de ferramentas que permitam a identificação de marcadores alvos moleculares, como os coativadores do AR, e até mesmo a utilização de possíveis moléculas terapêuticas para o CPRC, como o miR-137.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do colesterol sobre os coativadores p160 do AR em modelo *in vitro* e *in vivo* de CPRC.

Estudar o efeito da administração do miR-137 em modelo hipercolesterolêmico *in vivo* de CPRC.

## 2.2 Objetivos específicos

Estabelecer o modelo *in vivo* hipercolesterolêmico de CPRC, utilizando a linhagem celular PC-3.

Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica dos coativadores do AR, p160 (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) e AR, em linhagem celular PC-3 suplementada com colesterol.

Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica dos coativadores do AR, p160 (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) e AR em linhagem celular PC-3 tratada com miR-137.

Avaliar o papel do colesterol nos ensaios de apoptose, ciclo celular e proliferação em linhagem celular PC-3.

Avaliar o papel do miR-137 nos ensaios de apoptose, ciclo celular e proliferação em linhagem celular PC-3.

Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica dos coativadores do AR, p160 (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) e AR no modelo *in vivo* hipercolesterolêmico de CPRC e tratado com o miR-137.

### **3. METODOLOGIAS**

### 3.1 Estudos *in vitro*

#### 3.1.1 Suplementação das células PC-3 com colesterol

A linhagem celular PC-3 foi semeada em uma placa de cultura de 24 poços, contendo  $8 \times 10^4$  células/poço em meio MEM (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) conforme protocolo de cultivo padrão. O Colesterol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foi utilizado na concentração de  $2\mu\text{g/mL}$  ( $5\mu\text{M}$ ) conforme Moon et al (2015) (37), em água ultrapura (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), e como controle do experimento, foram utilizadas células com as mesmas condições de cultura. As células controles receberam água ultrapura (veículo de diluição do colesterol). Os experimentos foram realizados em quadruplicata. As células PC-3 foram incubadas por 8 horas para as análises gênicas e proteicas, e para os outros ensaios celulares os tempos variaram entre 0-72h. Para maior veracidade dos dados, realizamos a autenticação celular da linhagem PC-3 por ensaio de *Short Tandem Repeat* (STR), através do serviço disponível pela Rede Premium da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- FMUSP (Anexo 1).

#### 3.1.2 Ensaio de eficácia de suplementação com colesterol

Utilizamos o Kit de Coloração Lipídica (Oil Red O, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) o qual é adequado para coloração seletiva e detecção de lipídios neutros em células cultivadas. Para fixação das células, foram acrescentados  $500\mu\text{L}$  de paraformaldeído (4%

em PBS 1X) por poço. Em seguida, as placas foram lavadas por duas vezes com 500 µL de Isopropanol a 60%. Posteriormente, o Isopropanol foi descartado e adicionado o Oil Red, até cobrir o fundo da placa por completo. Permaneceram em incubação por 20 minutos, e incubadas por mais 20 minutos. Após incubação, as placas foram lavadas com água ultrapura até que nenhum excesso fosse observado. Em seguida as lâminas foram contra coradas com hematoxilina, conforme recomendações. As placas foram lavadas até que não houvesse mais excesso de reagentes e as lâminas foram montadas e digitalizadas, usando o Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH, Budapeste, Öv u, Hungria).

### **3.1.3 Transfecção celular com o miR-137**

A linhagem celular PC-3 foi semeada em uma placa de cultura de 24 poços na quantidade de  $8 \times 10^4$  células/poço e posteriormente foram transfectadas com 50 pmol de mimic-137 (MC10513, AMBION, Austion, TX, USA), assim como o controle negativo precursor de miRs (Scramble) (17110, AMBION). De modo geral, os mimics são pequenos miRs produzidos quimicamente, os quais se assemelham com os miRs biológicos maduros que ocorrem naturalmente no organismo. O miR-137 e o Scramble foram diluídos em 50µL de meio OPTI-MEM I em diferentes tubos carregados pelo agente de transfecção Lipofectamina RNAiMax (INVITROGEN, Calrsbad, CA, USA) conforme recomendações do fabricante. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.1.4 Extração do RNA total

Para extração de RNA e miR foi utilizado o kit de isolamento miRVana®miRNA (Ambion, Austin, Tx), de acordo com as recomendações do fabricante. As preparações das amostras de células foram realizadas em gelo e da maneira mais rápida possível para prevenir a degradação por proteases. Foram adicionados 500µL do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tecidual, ou densidade celular [cultura]), e 10% do volume total de aditivo para homogeneização na linhagem celular. Logo após, os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 500µL de fenol clorofórmio, e as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas na velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos, em temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo, onde foi adicionado um terço do volume de etanol 64% em temperatura ambiente. A solução então foi passada para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Após o descarte do filtrado, foram centrifugadas por mais 1 minuto a 10.000g para secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e adicionados 100µL de água livre de RNase pré-aquecida a 95°C, no centro da coluna. Após 1 minuto em temperatura ambiente, o RNA total foi centrifugado e armazenado a -20°C até sua utilização. A pureza e concentração do RNA total foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop ® (260/280nM) (ND1000, Wilmington, EUA).



### 3.1.5 Transcrição reversa

O DNA complementar (cDNA) do miR foi obtido usando TaqMan® miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 200ng/ $\mu$ L de miR foi eluída em 50 $\mu$ L de água. Deste volume, 3 $\mu$ L foram submetidos à transcrição reversa, onde foram adicionados 7 $\mu$ L de mix, contendo os reagentes do kit: 0,15 $\mu$ L de dNTP mix, 0,5 $\mu$ L da enzima transcriptase reversa, 1,5 $\mu$ L do tampão da enzima, 0,19 $\mu$ L de inibidor de RNase, 3,66 $\mu$ L de água livre de nucleasse e 1 $\mu$ L de primer stem-loop, com sequência específica para o miR, totalizando 10 $\mu$ L de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Veriti® (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C.

A síntese de cDNA do RNA foi realizada, utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (AppliedBiosystems) que utiliza a Transcriptase reversa Multiscribe™ e primers randômicos. O RNA total foi diluído em H<sub>2</sub>O livre de nucleases em um volume final de 20 $\mu$ L e concentração de 500ng/  $\mu$ L. A este volume foram acrescentados 4 $\mu$ L de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 $\mu$ L do mix de dNTPs (25x), 4 $\mu$ L do tampão da enzima (10x), 2 $\mu$ L da enzima transcriptase reversa e 8,4 $\mu$ L de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos) no termociclador Vertiti® (Applied Biosystems). Ao final das reações ambos os cDNA foram armazenados a -20 °C até o uso.

### 3.1.6 Análise de expressão de gênica e do miR por qPCR

As expressões dos RNAs e miR estudadas foram avaliadas a partir do cDNA, utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa, em tempo real, (qPCR) no sistema ABI 7500 Fast RT-PCR, no modo standard, utilizando Master Mix PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA). As expressões dos RNA individuais foram analisadas, usando sondas TaqMan de sequência específicas, tabela 1. Para amplificação dos fragmentos desejados, as reações foram feitas com 0,5µL de uma solução contendo a sonda (com a marcação desejada), 2µL de HOT FIREPol Probe Universal q PCR Mix (Solis BioDyne), 6,5µL de água nuclease free e 1µL de cDNA, somando um total de 10µL para cada reação. As condições das reações foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os dados foram analisados, utilizando Software DataAssist (Applied Biosystems, USA). Todas as reações foram realizadas em duplicata. O GAPDH e o RNU48 foram utilizados como controles endógenos para as reações com os genes e miR, respectivamente.

**Tabela 1.** Ensaios TaqMans utilizados no estudo

<b>Genes e miR</b>	<b>Ensaios</b>	<b>Marca</b>
SRC-1	Hs00186661_m1	Applied Biosystems
SRC-2	Hs00896109_m1	Applied Biosystems
SRC-3	Hs00180722_m1	Applied Biosystems
AR	Hs00171172-m1	Applied Biosystems
GAPDH	Hs99999905	Applied Biosystems
miR-137	001129	Applied Biosystems
RNU 48	001006	Applied Biosystems

### 3.1.7 Análise de viabilidade, apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados no analisador de células Muse (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA). Os ensaios foram realizados utilizando os grupos de células com as diferentes condições. Foram avaliados os grupos de células PC-3 suplementadas com colesterol e também o grupo de células PC-3 que foram tratadas com miR-137. Após 24 horas, os diferentes grupos de células foram marcados com os kits de viabilidade (MCH100102, Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA), Apoptose (MCH100105, Luminex Corporation) e Ciclo celular (MCH100106, Luminex Corporation), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.1.8 Imunofluorescência *in vitro*

Para detecção da imunofluorescência das proteínas coativadoras do AR, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro. Após a adesão das células sobre a lamínula, um grupo de células foi suplementado com colesterol (2 µg durante 8 horas) e outro grupo de células foi tratado com miR-137 por 24h. As células foram então fixadas com paraformaldeído 4% em 1X PBS, por 10 minutos e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em 1X PBS por mais cinco minutos. As lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários das proteínas SRC-1 (128E7, Cell Signaling, Massachusetts, EUA), SRC-2 (D2X4M, Cell Signaling), SRC-3 (5E11, Cell Signaling) e AR (MA5-13426, Invitrogen,) diluídos 1:100 soro de cavalo (2,5%) *overnight*. Após a incubação primária, seguimos com a incubação com anticorpo secundário por 1:30h (VectaFluor™ Duet Immunofluorescence Double Labeling Kit, DyLight® 488 Anti-Rabbit (green), DyLight® 594 Anti-Mouse (red)). As lamínulas foram lavadas três vezes em 1X PBS após cada incubação de anticorpos. As lamínulas foram contra coradas com DAPI (Cell Signaling), e montadas, usando ProLong Diamond (Invitrogen). As células foram fotografadas, usando um microscópio fluorescente (Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica. O sinal de fluorescência foi quantificado, usando o software Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA) e os dados foram apresentados como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias).

### 3.1.9 Ensaio de migração celular

Para avaliar a migração celular no grupo de células de suplementação com colesterol (0, 8, 24, 48 e 72 horas) e no grupo de células transfectadas com miR-137 (0, 8, 24 e 48 horas), as células PC-3 foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de  $8 \times 10^4$  células / poço. Após atingir a confluência, foi realizado um risco com auxílio de uma ponteira de 200 $\mu$ L e uma régua. As imagens foram analisadas com auxílio do software NIS Elements D 3.1 (Nikon). A porcentagem de migração foi calculada com base na área de risco e usando a seguinte fórmula:  $(A \text{ inicial} - A \text{ final}) / (A \text{ inicial}) \times 100$  = % de fechamento da ferida.

### 3.1.10 Ensaio de invasão celular

Para determinar a capacidade de invasão das células tratadas com miR-137 e seus respectivos controles, foi realizado o ensaio de invasão celular em câmaras bioCoat Matrigel Invasion Chamber (Becton Dickinson, Bedford, MA), constituídas por poros de 8 $\mu$ m, revestidas com Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). As células foram plaqueadas ( $12 \times 10^3$  células/câmara) com meio de cultura livre de soro, no compartimento superior da câmara. O compartimento inferior foi composto por meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10%, o qual foi usado como quimioatrativo. As células foram incubadas por 48h a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células que não invadiram o matrigel, foram removidas da parte superior e descartadas. As células que invadiram o matrigel foram fixadas com paraformoldeído e

coradas com cristal violeta 0,1%. Essas células que migraram foram contadas (10 campos) sob microscopia, com uma ampliação de 200x. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 3.2 Estudos *in vivo*

### 3.2.1 Padronização do Modelo animal hipercolesterolêmico

Para padronização do modelo hipercolesterolêmico (HCOL), foram utilizados 12 camundongos NOD.CB17-SCID/JUnib, divididos em dois grupos, Controle (Dieta Padrão DP) e HCOL. O grupo de animais HCOL foram alimentados com Dieta HCOL (RH19539E – Rhoster, São Paulo, Brasil, Anexo 2) por 21 dias antes da inoculação do xenoenxerto, e seguiram com a alimentação até o dia final da experimentação. Já os animais do grupo controle foram alimentados com Dieta Controle (AIN-76, Rhoster – São Paulo, Brasil, Anexo 3). Todos os animais foram disponibilizados pelo Biotério central da FMUSP e mantidos em condições de fotoperíodo (12 horas claro, 12 horas escuro) no Biotério do LIM08. A temperatura do biotério foi mantida entre 21 e 23°C. O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FMUSP, sob os números 1119/2018 e 1360/2019. Antes da realização de todos os procedimentos, os animais foram colocados em decúbito ventral em uma mesa cirúrgica após pesagem, e então foram anestesiados com sedação inalatória (Isoflurano 2-3%).

### 3.2.2 Perfil lipídico

Os níveis de colesterol (Labtest, MS10009010068), LDL (Labtest, MS10009010070), HDL (Labtest, MS10009010325), triglicerídeos (Labtest, 87-2/100) de ambos os grupos de animais foram aferidos, usando kits Labtest (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, BR). Foram coletados aproximadamente 100 $\mu$ L de sangue total em tubo com gel ativador de coágulo (Vacuplast). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 5 a 8 minutos, a 2500 rpm. Para realização do teste foi usado 10 $\mu$ L de soro, seguindo as recomendações do fabricante. Antes de todo ensaio, foi realizada a calibração do aparelho e mensuração da amostra padrão, como controle de qualidade. O mesmo kit foi usado para aferir os níveis de colesterol intratumoral em homogeneizados de tecidos. A absorção das amostras foi registrada no leitor de microplacas SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.2.3 Inoculação dos Xenoenxertos

Para estabelecimento do CaP nos camundongos, foi utilizada a linhagem celular PC-3M-luc-C6 que é derivada de metástase óssea humana obtida de um paciente no MD Anderson Cancer Center, transfectada com o gene Luciferase do vaga-lume (Firefly) espécie *Photinus pyralis* da América do Norte, utilizando um plasmídeo, no caso o pGL3.

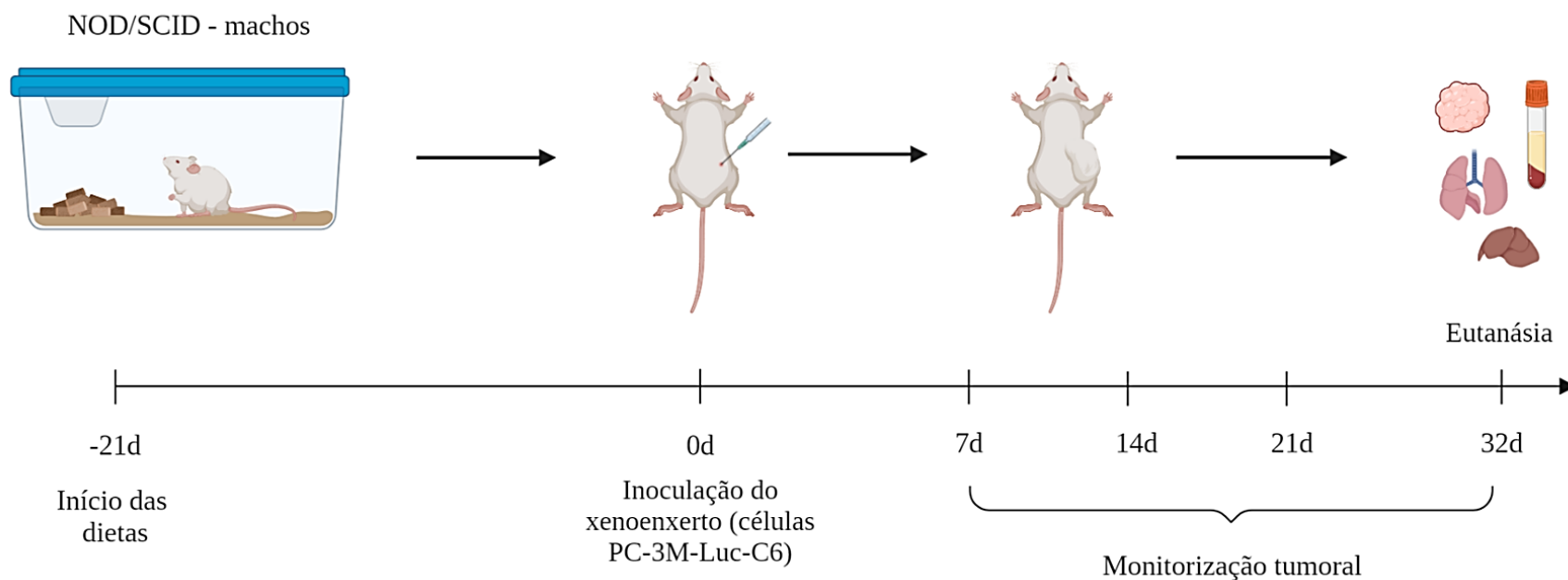
Para a injeção subcutânea das células tumorais, os animais permaneceram sob sedação inalatória (Isoflurano). Após sedação profunda e com respiração espontânea, os animais foram testados para qualquer sensibilidade à dor, e quando abolida foram posicionados em decúbito ventral com as patas imobilizadas. Utilizando paramentação estéril, realizou-se assepsia do dorso do animal com álcool 70%. A injeção foi feita com seringa de 1mL com agulha 30G, 6mm (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) com 80 $\mu$ L de meio de cultura estéril, contendo 1,5 x 10<sup>6</sup> células PC-3M-luc-C6.

Os tumores foram medidos a cada dois dias até o final do estudo (Figura 4). Após a palpação dos tumores, o comprimento (C) e largura (L) tumoral foram medidos com paquímetro digital, e o volume do tumor (V) foi calculado usando a seguinte fórmula:  $V = [L \times C \times (L + C) / 2] \times 0,52$  (67).



### 3.2.4 Desenho Metodológico da padronização do modelo HCOL

O desenho metodológico está apresentado na figura 3.



**Figura 3.** Plano Experimental. 21 dias antes do xenoinxerto, camundongos machos NOD/SCID com 6 semanas foram alocados para dieta hipercolesterolêmica (N = 11) e para dieta controle (N = 11). No dia 0, todos os animais (22) foram inoculados dorsalmente com células PC-3M-luc-C6 ( $1,5 \times 10^6$ ). A monitorização tumoral ocorreu do sétimo ao trigésimo segundo dia. Ao final de 32 dias, os níveis de colesterol foram aferidos e os animais foram eutanasiados para coleta e análises das peças tumorais.

### 3.2.5 Western Blot

Os tecidos tumorais foram homogeneizados em tampão gelado RIPA, enriquecido com um coquetel inibidor de protease e fosfatase (Merck). As amostras foram misturadas com tampão Laemmli e DTT e aquecidas a 95°C por 5 minutos, em um Thermomixer Confort (Thermo Fisher). Alíquotas correspondentes a 20 µg de proteína total foram aplicadas em géis SDS-PAGE 4% - 15% (Mini-Protean TGX, BioRad) e depois transferidas para membranas PVDF (Thermo Fisher). Foram usadas técnicas padrão de western blot para detectar SRC-1, SRC-2, SRC-3, AR, e GAPDH. Os anticorpos primários foram diluídos a 1:500, e o anticorpo secundário (Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L) HRP conjugado, Merck Millipore AP307P) foi aplicado a 1:5000. As intensidades das bandas foram quantificadas, medindo a quimioluminescência em um sistema de documentação Alliance Mini 4 16,15 gel (UVITEC Cambridge, Reino Unido).

### 3.3 Tratamento *in vivo* com miR-137

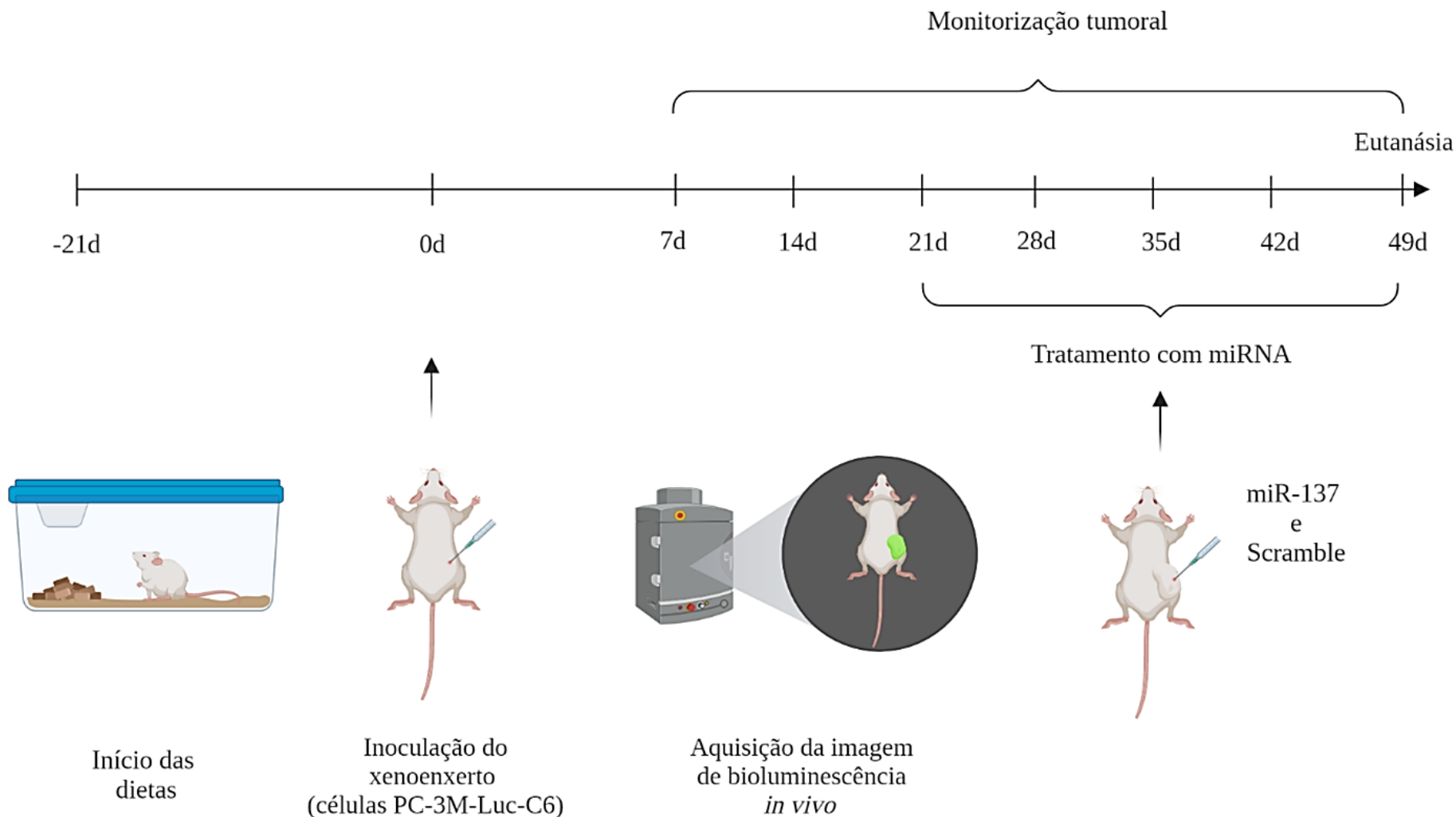
Após o estabelecimento do modelo animal como descrito no item 3.2.1, contido com alteração de 0,5% na concentração do colesterol (PragSoluções Biociências, Jaú, São Paulo, Brasil, Anexo 4) partimos para realização do tratamento intratumoral com miR-137 e seu respectivo controle. Nesta etapa, foram utilizados 16 animais subdivididos em 4 subgrupos:

1. Scramble – DP (N = 4);
2. miR-137 – DP (N = 4);

3. Scramble – HCOL (N = 4);
4. miR-137 – HCOL (N = 4).

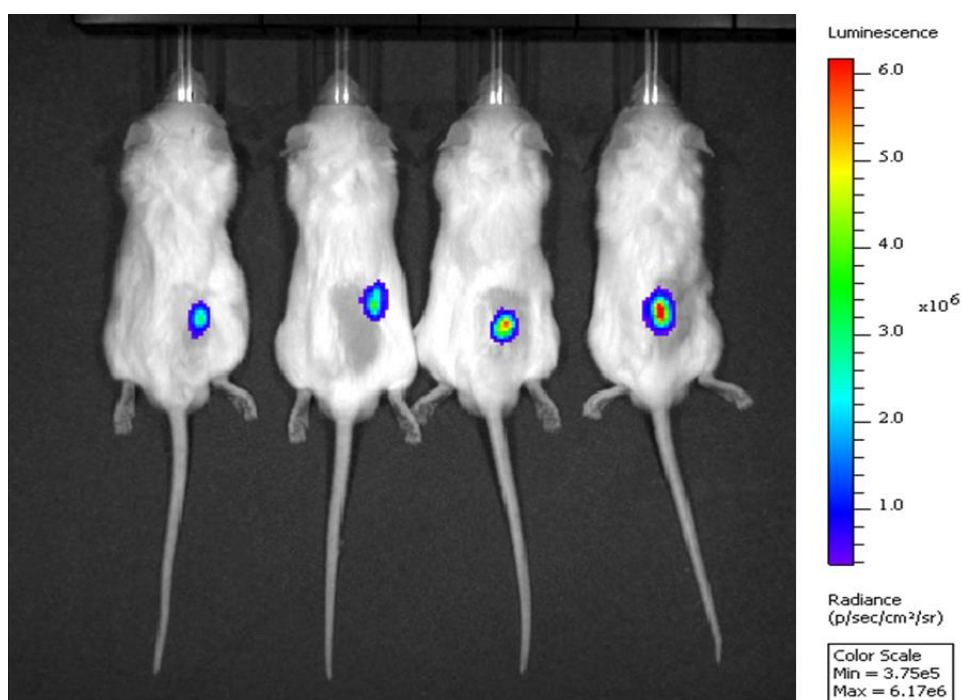
O complexo de transfecção com o miR-137 (MC10513-Ambion) e Scramble (AM17110 -Ambion) foram carregados, utilizando o protocolo de transfecção *in vivo*-jetPEI® (#20110G Polyplus-Transfection, EUA). A solução foi preparada em um volume final de 5% de glicose, em volume final de 30µL na concentração de 6µg, conforme recomendações do fabricante. O tratamento nos animais iniciou-se quando os tumores apresentavam-se com volume tumoral  $\geq 50\text{mm}^3$ . O complexo *in vivo*-jetPEI é um reagente adequado para entrega de ácido nucleico em modelos animais .Este reagente abrange inúmeras formas de aplicações, desde instilação nasal até tratamentos sistêmicos (68).

Assim como nos grupos de padronização do modelo HCOL, os animais do grupo tratado também exibiram tumores palpáveis entres os dias 07 e 14. Além da mensuração tumoral pelo paquímetro, a aquisição da bioluminescência *in vivo* foi adquirida pelo IVIS Spectrum semanalmente até o final do período experimental (Figura 5).



**Figura 4.** Plano experimental do modelo hipercolesterolêmico tratado com miR-137. Vinte e um dias antes do xenoinxertos, camundongos machos NOD / SCID foram aleatoriamente designados para uma Dieta Padrão (DP, N = 8) ou uma dieta hipercolesterolêmica (HCOL, N = 8). No dia 0, as células foram injetadas no subcutâneo (dorso) dos animais. O volume do tumor e a bioluminescência foram medidos semanalmente, e o tratamento ocorreu quando os animais atingiram um volume de tumor  $\geq 50 \text{ mm}^3$ . Posteriormente, os animais foram separados em quatro grupos para tratamento: DP (Scramble N = 4 e miR-137 N = 4) e HCOL (Scramble N = 4 e miR-137 N = 4).

A D-luciferina utilizada (Promega) foi dissolvida em PBS e injetada intraperitonealmente. Os tratamentos deste modelo estão delineados na figura 6. Após eutanásia foram coletados os espécimes teciduais dos animais para a extração do RNA total e miR, cDNA e expressão gênica por qPCR, seguindo as metodologias descritas nos itens 3.1.4, 3.1.5 e 3.1.6, respectivamente.



**Figura 5.** Imagem ilustrativa da aquisição de bioluminescência dos animais xenoenxertados com células PC-3M-Luc-C6.

### 3.4 Ensaio de Imunohistoquímica

Para avaliação da proliferação celular, realizou-se a análise imuno-histoquímica da proteína ki-67. As amostras foram submetidas à recuperação antigênica pelo calor, utilizando tampão citrato (1mM, pH 6,0), e aquecidas por 30 minutos em panela de

pressão elétrica. As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C, com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (Clone mib-1). O sistema LSAB foi utilizado para imunocoloração (LSAB; Dako, CA, EUA). A coloração foi desenvolvida por uma solução substrato-cromógena 3,3'-diaminobenzidina, seguida por contracoloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas com lamínulas, observadas e fotografadas sob um microscópio óptico, e a quantificação foi realizada, utilizando o software Image J.

### 3.5 Imunofluorescência *in vivo*

As lâminas foram desparafinizadas em xilol (Synth, Diadema, SP, BR) (100%, duas vezes por 3 minutos cada), xilol: etanol (Synth) (1: 1, por 3 minutos) e reidratadas em uma série de etanol (Synth) (100, 95, 70 e 50%, por 3 minutos cada), finalizando em água corrente. Foi realizada a recuperação antigênica induzida por calor, usando uma panela de pressão. Para isso, foi preparada uma solução tampão de citrato de sódio desidratado 10 mM (Synth), 0,05% Tween 20 (VWR, Radnor, PA, EUA), pH 6,0. Foi adicionado o tampão de recuperação à panela. As lâminas foram colocadas em rack metálico (Easy Path, Indaiatuba, SP, BR). Assim que a panela entrou em ebulição, foram contados 5 minutos. Em seguida, retirou-se o rack, o qual foi colocado em água corrente por 10 minutos. Logo após, as lâminas foram lavadas, usando TBS 1X (Synth) + Triton 0,025% (Synth) por imersão (duas vezes, 5 minutos cada) com agitação suave. Em seguida, os cortes histológicos foram circulados, utilizando uma caneta hidrofóbica ImmEdge™ (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As lâminas foram transferidas para incubadora úmida (Easy Path) e bloqueadas com TBS 1X + albumina

de soro bovino 1% (BSA) (VWR), por duas horas, em temperatura ambiente. Logo após, a solução de bloqueio foi removida e, em seguida, o anticorpo primário contra as proteínas SRC-1, SRC-2, SRC-3 e AR, foram adicionados e incubados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS 1X + Triton 0,025% por imersão (duas vezes, 5 minutos cada) com agitação suave. Os anticorpos secundários foram aplicados aos cortes, por 1 hora, protegido da luz, em temperatura ambiente. Após as incubações de anticorpos secundários, as lâminas foram lavadas, usando TBS 1X por imersão (três vezes, 5 minutos cada) com agitação suave. As lâminas foram seladas com meio de montagem aquoso Fluoromount™ (Sigma Aldrich) e lamínulas. A fluorescência foi analisada no microscópio Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com objetiva plana de 40x, usando uma excitação de 488 nm (verde) e 543 nm (vermelho) dentro do software NIS-Elements Basic Research (Nikon). O software ImageJ foi utilizado para análise posterior. Os anticorpos primários e secundários, utilizados para imunofluorescência, estão descritos nos item 3.1.8.

### 3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando o software GraphPad Prism 9.0. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados, e o teste T de Student e o teste Mann-Whitney foram utilizados para comparar os dados *in vitro* e *in vivo*. O nível de significância estatística foi fixado em 5% ( $p \leq 0,05$ ).

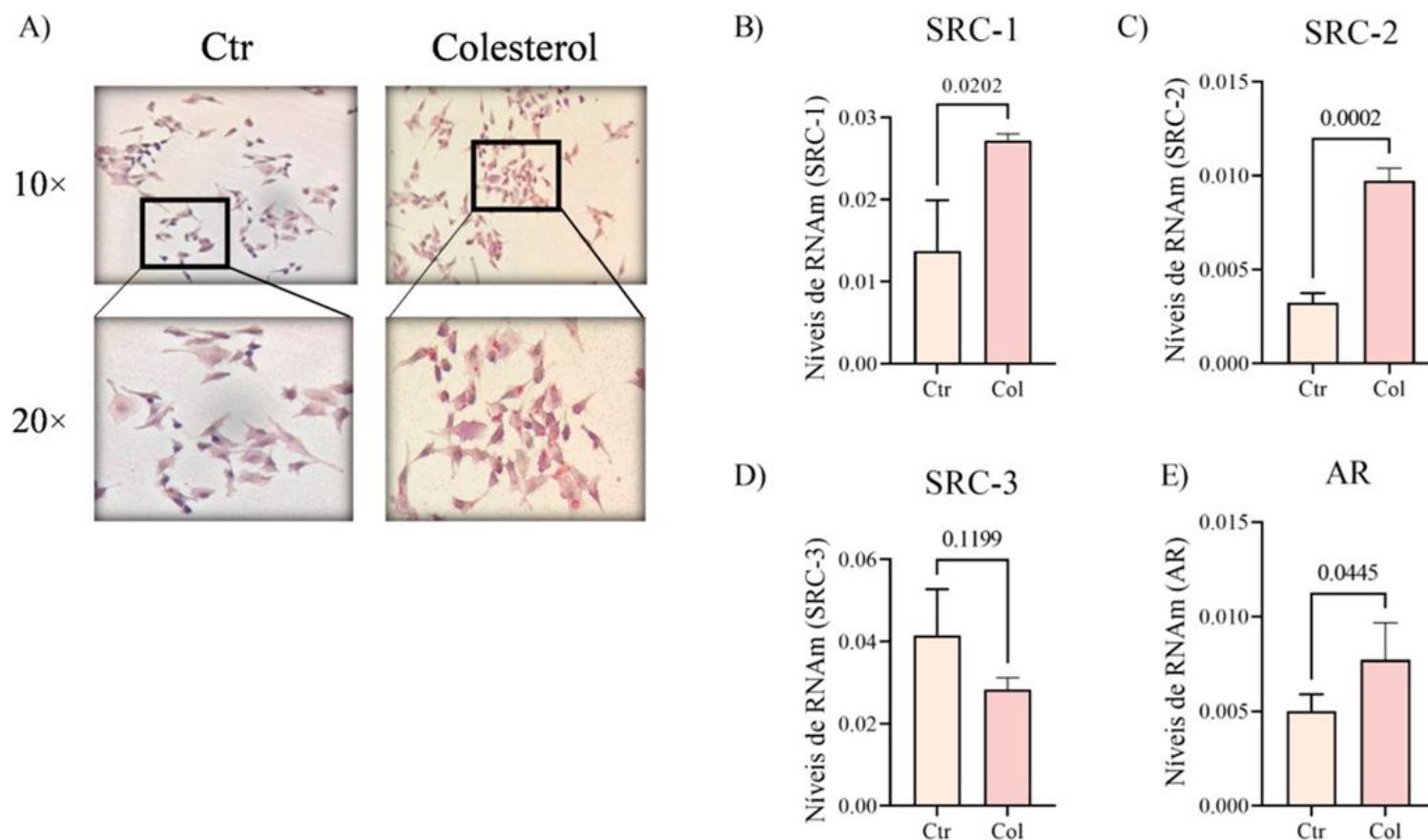
## **4. RESULTADOS**



## 4.1 Resultados *in vitro*

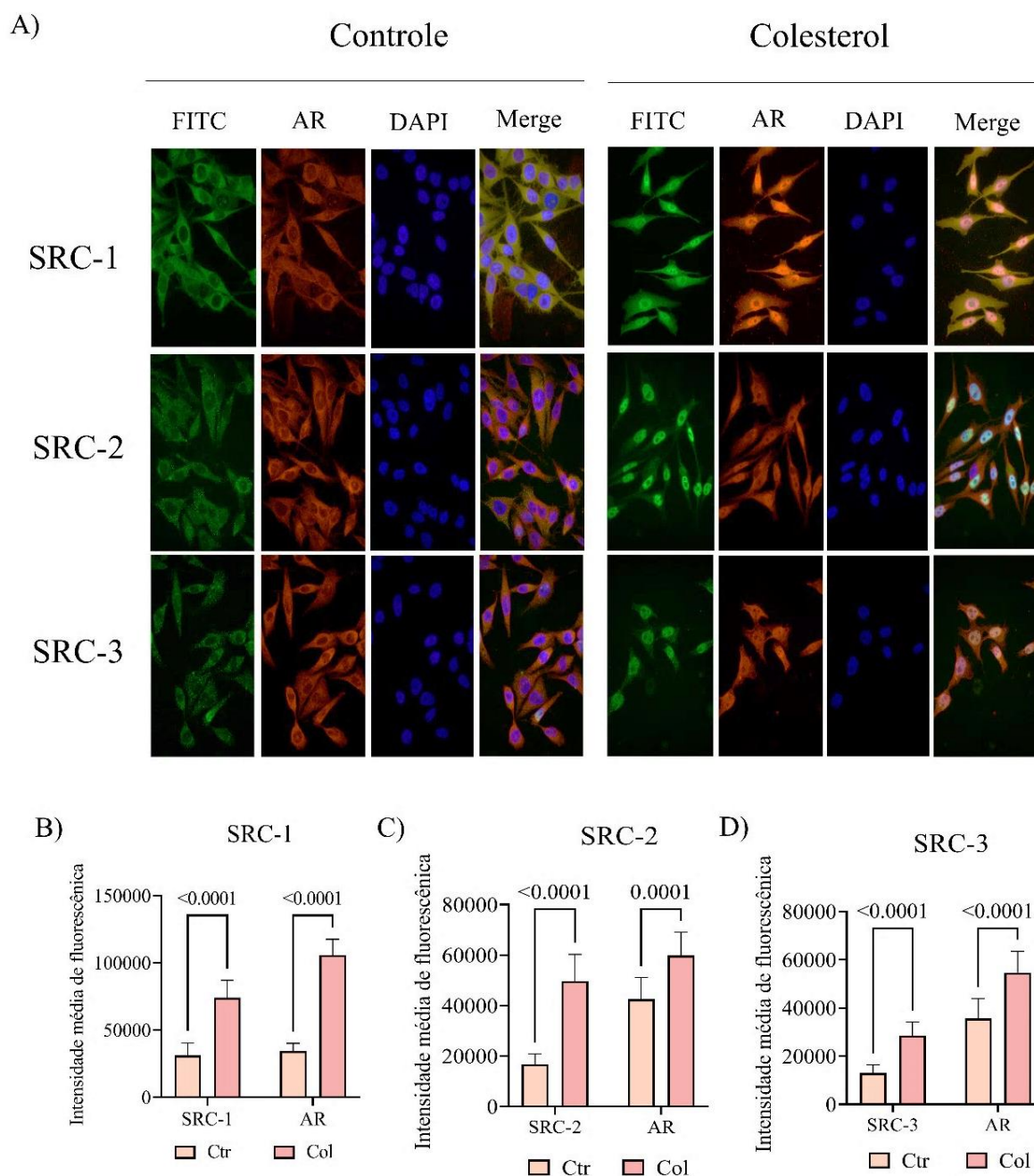
### 4.1.1 O aumento do colesterol associa-se positivamente com a superexpressão dos coativadores p160 no CaP.

Conforme apresentado na Figura 6A, os resultados qualitativos do Oil Red O demonstraram que a suplementação das células PC-3 com 2 µg de colesterol, por 8 horas, aumenta o colesterol intracelular. As análises de expressão gênica por qPCR, demonstraram que a suplementação com colesterol desencadeou uma superexpressão dos genes SRC-1 ( $p = 0,020$ , Figura 6B) e SRC-2 ( $p = 0,0002$ , Figura 6C). Para o SRC-3 não foram conferidas diferenças entre os grupos ( $p = 0,1199$ , Figura 6D). O tratamento com colesterol induziu também um aumento significativo nos níveis de expressão de AR ( $p = 0,044$ , Figura 6E).



**Figura 6.** Exposição da linha celular PC-3 ao colesterol (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 8h. A) Representação gráfica dos grupos Ctr e Colesterol corados com Oil Red O. As imagens superiores foram obtidas com uma ampliação de 10x e as inferiores com 20x. B) Níveis de expressão dos genes SRC-1 na ausência e na presença de Col. C) Níveis de expressão do gene SRC-2 na ausência e na presença de Col. D) Níveis de expressão do gene SRC-3 na ausência e na presença de Col. E) Níveis de expressão do gene AR na ausência e na presença de colesterol. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. O teste T foi usado em todas as análises.

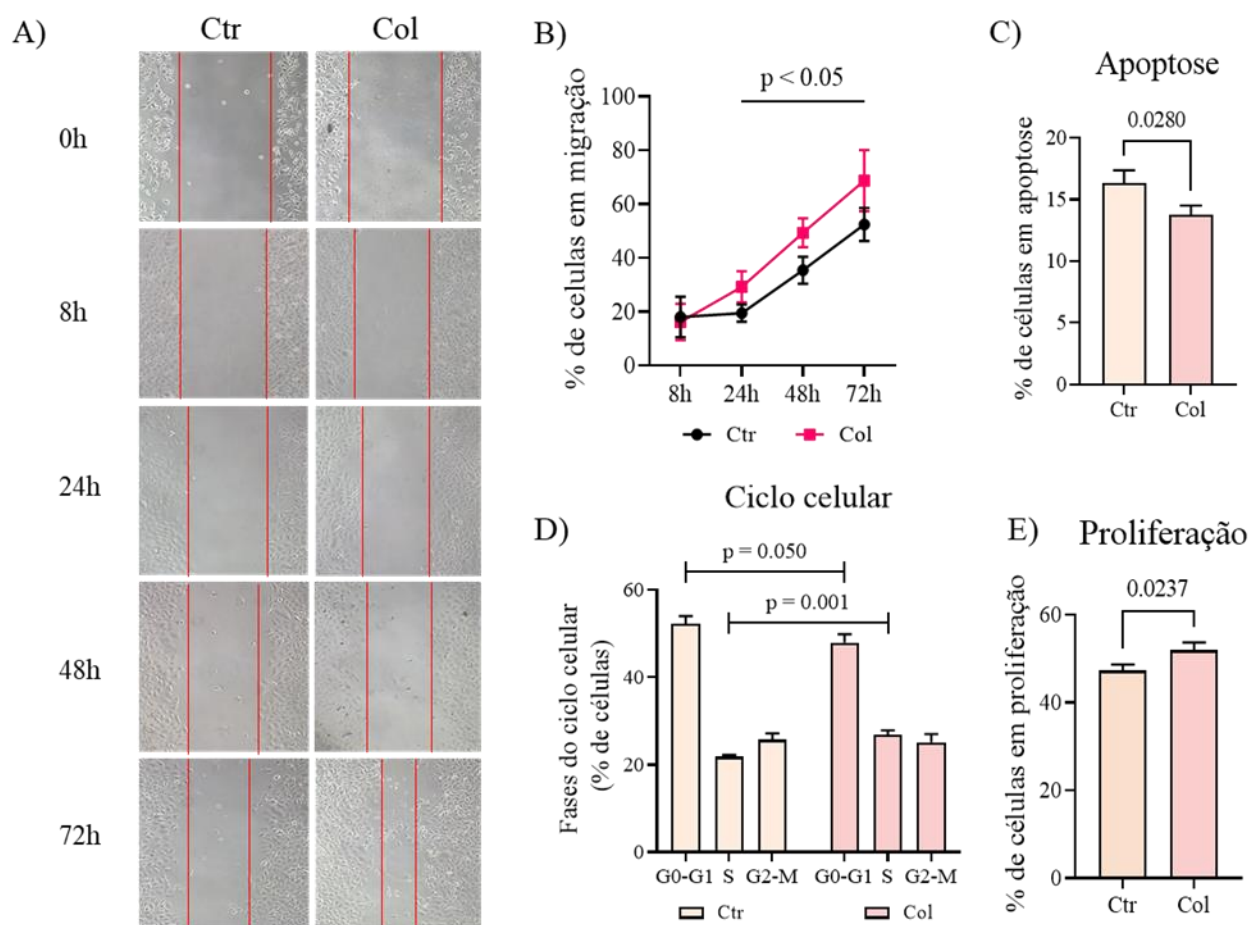
Assim como os genes, após a suplementação das células PC-3, as proteínas p160 (Figura 7A) apresentaram aumento significativo, quando associadas ao controle, SRC-1 ( $p < 0,0001$ , figura. 7B), SRC-2 ( $p < 0,0001$ , figura. 7C) e SRC-3 ( $p < 0,0001$ , figura. 7D). Concomitante ao aumento da expressão dos coativadores, observamos o aumento dos níveis proteicos do AR ( $p < 0,0001$ , figuras 7 B-D), seguido da sua translocação do citoplasma para o núcleo.



**Figura 7.** Efeito da suplementação de células PC-3 com colesterol (2  $\mu\text{g/mL}$ ) por 8h, na expressão de proteínas coativadoras de AR por imunofluorescência (IF). A) Imagens representativas de IF dos grupos de controle e colesterol. Observamos uma maior concentração das proteínas no citoplasma, no grupo de controle. Após a suplementação com colesterol, observa-se uma migração das proteínas coativadoras para o núcleo da célula, aumentando, conseqüentemente, a expressão de AR. B) Níveis de expressão das proteínas SRC-1 e AR na ausência e na presença de colesterol. C) Níveis de expressão da proteína SRC-2 e AR na ausência e na presença de colesterol. D) Níveis de expressão da proteína SRC-3 e AR na ausência e na presença de colesterol. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras. O teste T foi usado em todas as análises.

#### 4.1.2 Suplementação das células PC-3 com colesterol reduz a apoptose, induz a proliferação e promove a migração celular

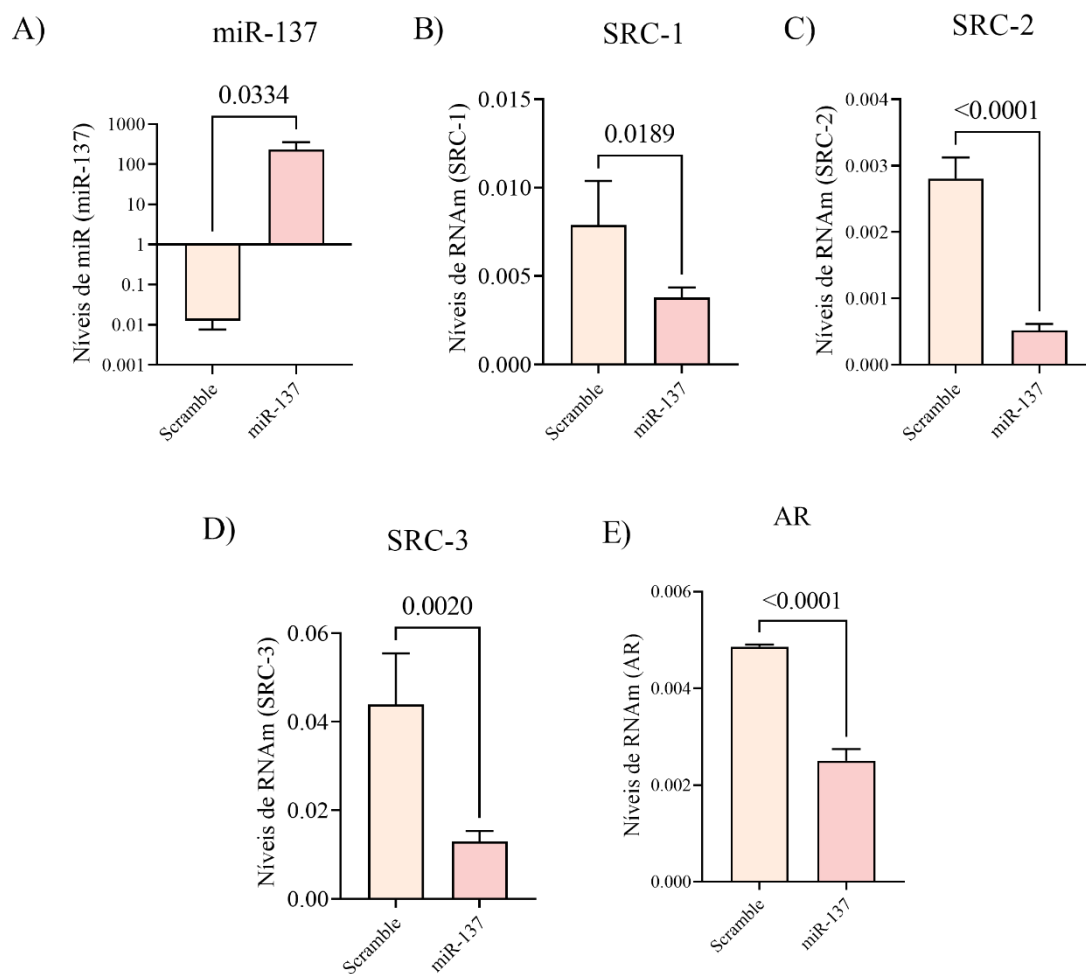
A suplementação das células PC-3 com colesterol por 24h não resultou em nenhuma diferença significativa na taxa de viabilidade celular, ao comparar células controle e suplementadas com colesterol ( $p = 0,3219$ , Anexo 5). Empregando as mesmas condições experimentais no ensaio de migração celular, observamos que o grupo suplementado com colesterol exibiu maiores índices de migração celular, quando comparado ao controle ( $p = 0,007$ , Figuras 8A-B). Conferimos uma menor taxa de apoptose nas células tratadas com colesterol ( $p = 0,027$ , Figura 8C). Já em relação ao ciclo celular, uma maior porcentagem das células controle estavam na fase G0-G1 quando comparada ao grupo tratado com colesterol (52,17% vs. 47,97%, respectivamente) (primeiro conjunto de barras;  $p = 0,050$ , Figura 8D). As células tratadas com colesterol apresentaram maior porcentagem de células na fase S do ciclo celular, quando comparadas ao grupo controle (26,9% vs. 21,8%, respectivamente) (segundo conjunto de barras;  $p = 0,001$ , figura 8D). Além disso, não houve diferença na porcentagem de células na fase G2-M entre os grupos (terceiro conjunto de barras;  $p = 0,685$ , figura 8D). Usando a porcentagem de células nas fases S e G2-M dos dados do ciclo celular, demonstramos que a taxa de proliferação celular das células tratadas com colesterol foi significativamente maior do que o grupo controle ( $p = 0,023$ , figura 8E).



**Figura 8.** Influência do colesterol (Col) na migração celular e nos ensaios de citometria de fluxo com células PC-3. A) Imagens representativas do ensaio de migração celular, usando controle não suplementado (Ctr), e células suplementadas com Col em 0, 8, 24, 48 e 72 horas. B) Representação gráfica entre o aumento da migração celular com a progressão do tempo, teste T. C) Porcentagem de células apoptóticas suplementadas com Ctr e Col, teste T. D) Porcentagem de células suplementadas com Ctr e Col em cada fase do ciclo celular, teste T. E) Porcentagem de células em proliferação suplementadas com Ctr e Col. A proliferação celular é baseada nas porcentagens de células nas fases S e G2-M do ciclo celular, teste T. As células PC-3 foram suplementadas com 2  $\mu\text{g/mL}$  de Col por 24 horas. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são exibidos acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

#### **4.1.3** A restauração da expressão do miR-137 em linhagem celular PC-3 impacta negativamente na expressão dos coativadores p160

O sucesso da transfecção com o precursor mimic miR-137 foi constatado com o aumento de expressão cerca de 1000 vezes maior do que o Scramble ( $p = 0,033$ , figura 9A). Posteriormente, conferimos que os genes-alvos SRC-1 ( $p = 0,018$ , figura 9B), SRC-2 ( $p < 0,0001$ , figura 9C), e SRC-3 ( $p = 0,002$ , figura 9D), exibiram redução significativa em sua expressão. Acreditamos que, indiretamente, o aumento do miR-137 levou à diminuição dos níveis do AR ( $p = 0,0002$ , figura 9E).

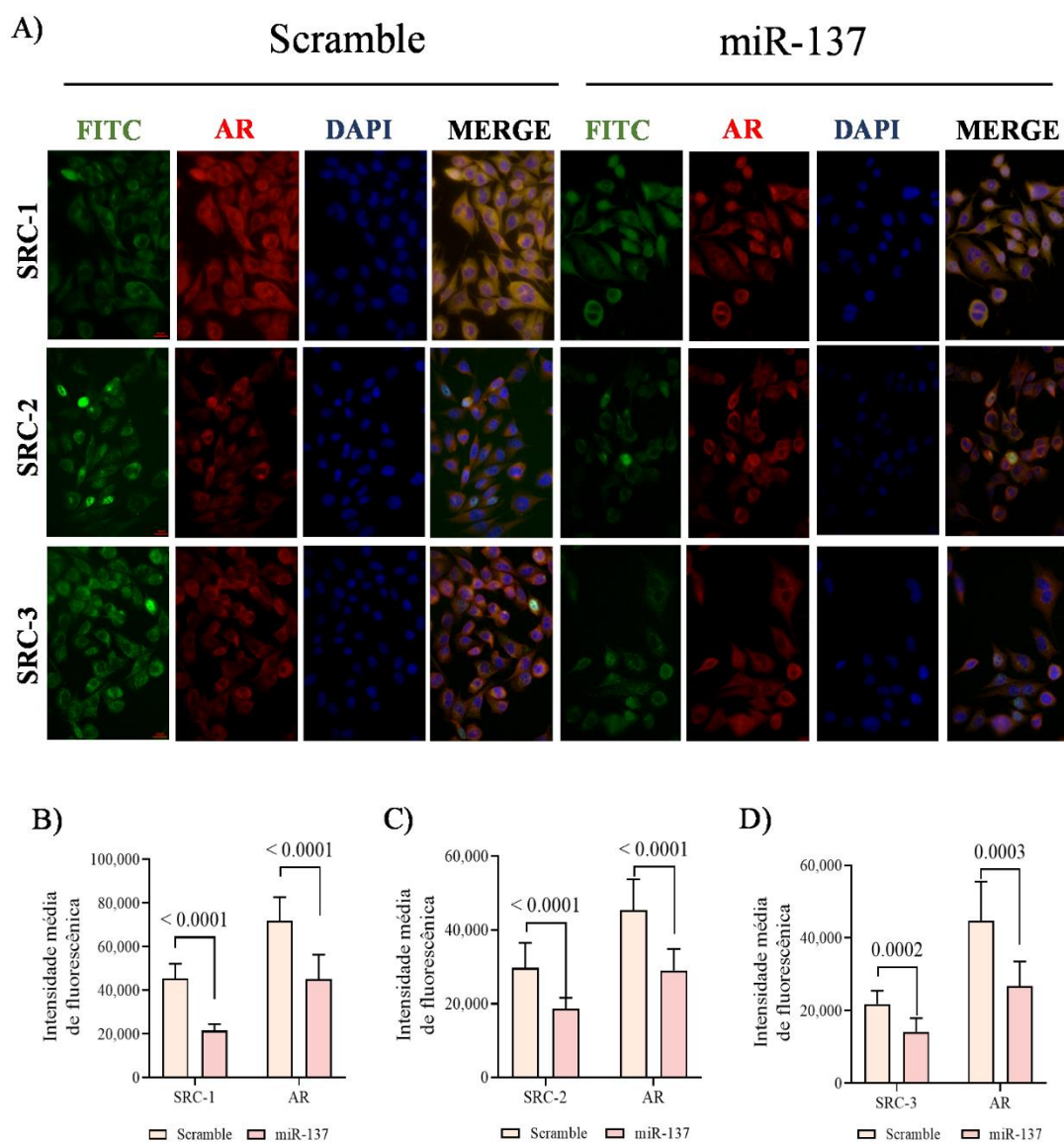


**Figura 9.** Efeito da superexpressão do miR-137 na linhagem de células PC-3. A) Eficácia da transfecção do miR-137. B) Níveis de RNAm de SRC-1 pós-transfecção. C) Níveis de RNAm de SRC-2 pós-transfecção. D) Níveis de RNAm de SRC-3 pós-transfecção. E) Níveis de RNAm de AR pós-transfecção. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

Uma vez aferidos os níveis de RNAm dos genes acima, verificamos também o impacto da restauração do miR-137 a nível proteico (Figura 9A). Observamos redução significativa das proteínas SRC-1 ( $p < 0,0001$ , figura 10B), SRC-2 ( $p < 0,0001$ , figura 10C), e SRC-3 ( $p = 0002$ , figura 10D). Simultaneamente, os níveis de proteína AR foram



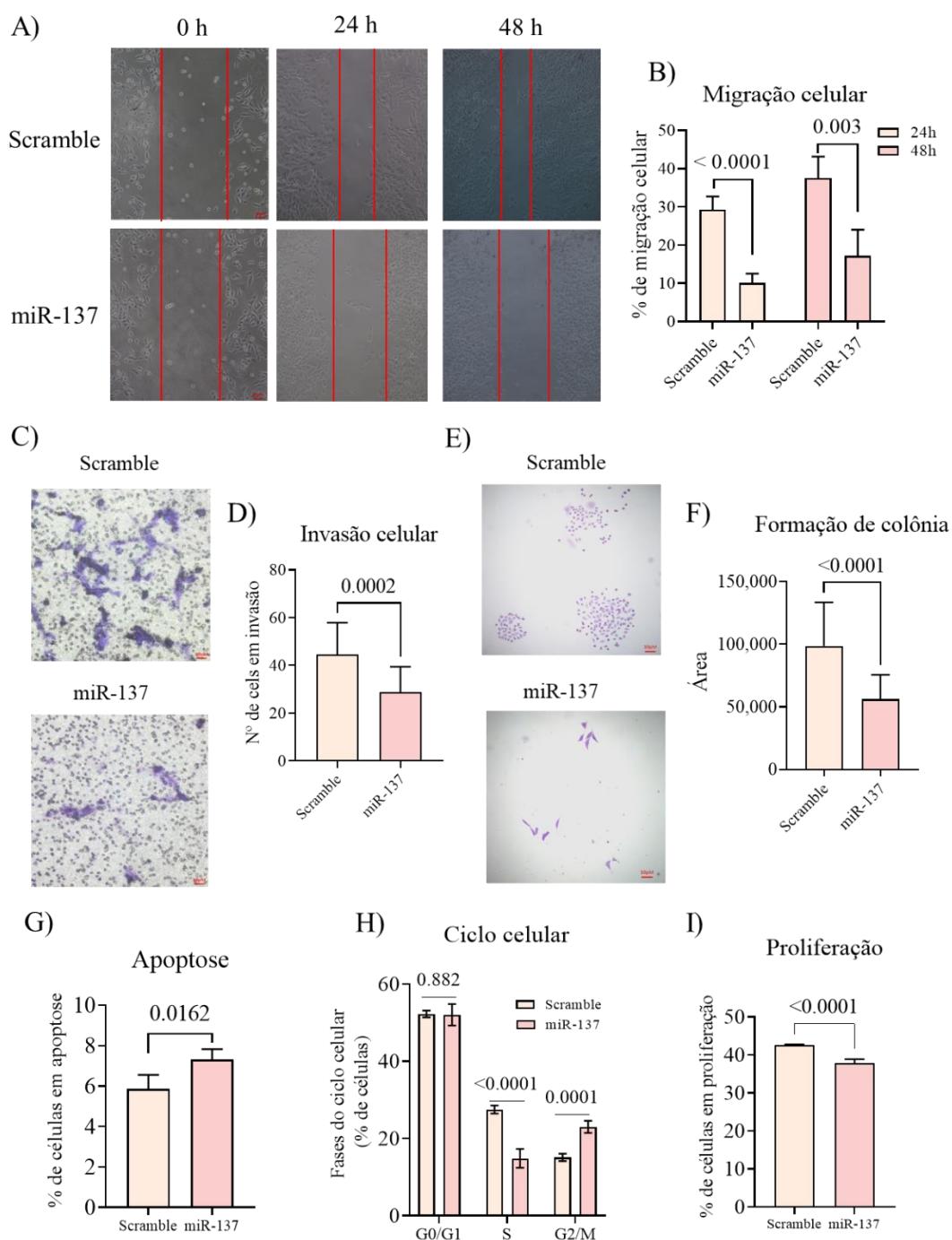
também determinados. Com o aumento de miR-137 e a redução de coativadores, observamos uma redução significativa de proteína AR ( $p < 0,0001$ , figura 10B-D).



**Figura 10.** Efeito da superexpressão do miR-137 sobre os coativadores p160. A) Representação gráfica da imunofluorescência pós-transfecção com miR-137. B) Níveis de proteína de SRC-1 e AR. C) Níveis de proteína de SRC-2 e AR. D) Níveis de proteína de SRC-3 e AR. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de  $p$  obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

**4.1.4** A superexpressão do miR-137 nas células PC-3 regula negativamente a migração e invasão celular, alterando o ciclo celular e induzindo a apoptose

A superexpressão do miR-137 impactou negativamente o potencial de migração celular nos de tempo 24h e 48h ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,003$ , respectivamente, figura 11A e B), na habilidade de invasão celular ( $p = 0,0002$ , figura 11C e D) e na capacidade de formação de colônia ( $p < 0,0001$ , figura 11E e F). Também foi conferido que a elevação do miR-137 desencadeou o aumento da apoptose ( $p = 0,016$ , figura 11G) e diminuiu a fase S do ciclo celular ( $p < 0,0001$ , figura 11H). A porcentagem de células nas fases S e G2/M do ciclo celular indicou que a taxa de proliferação das células tratadas com miR-137 foi significativamente reduzida em comparação com o Scramble ( $p < 0,0001$ , figura 11I).



**Figura 11.** Efeito do miR-137 nos ensaios de migração, invasão, formação de colônias e citometria de fluxo. A) Representação do ensaio de migração celular em 0, 24 e 48 horas. B) As taxas de migração celular de 24h e 48h foram calculadas a partir do tempo 0h. O gráfico representa análises individuais sobre seus respectivos controles entre os tempos de 24h e 48h. C) Representação do ensaio de invasão celular de miR-137 e Scramble. D) Diferença estatística entre o número de células na invasão. E) Representação do ensaio de formação de colônias. F) Análise gráfica da proporção de áreas de colônia após o tratamento com miR-137. G) Índice de apoptose após a transfecção das células. H) Ensaio de ciclo celular, fases G0/G1, S e G2/M. I) Porcentagem de células em proliferação calculada a partir das fases S e G2 / M do ciclo celular. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

## 4.2 Resultados *in vivo*

### 4.2.1 Modelo experimental de CPRC com hipercolesterolemia induzida por dieta

Para determinar o efeito da hipercolesterolemia induzida por dieta no CaP, empregamos um modelo experimental subcutâneo de CPRC em camundongos NOD / SCID machos. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo experimental recebendo dieta hipercolesterolêmica (HCOL) e o grupo controle recebendo dieta padrão (DP). Os pesos dos animais foram medidos de dois em dois dias, e não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 3;  $p > 0,05$ ). Os tumores se mostraram palpáveis 7-14 dias após a inoculação das células PC-3, e o volume do tumor foi medido de dois em dois dias, até ao fim do período experimental. O grupo HCOL apresentou volumes tumorais significativamente maiores, durante todo o período experimental (Tabela 2;  $p < 0,01$ ). No final do período experimental, o volume tumoral do grupo HCOL era 231,82% mais elevado do que o dos animais do DP.

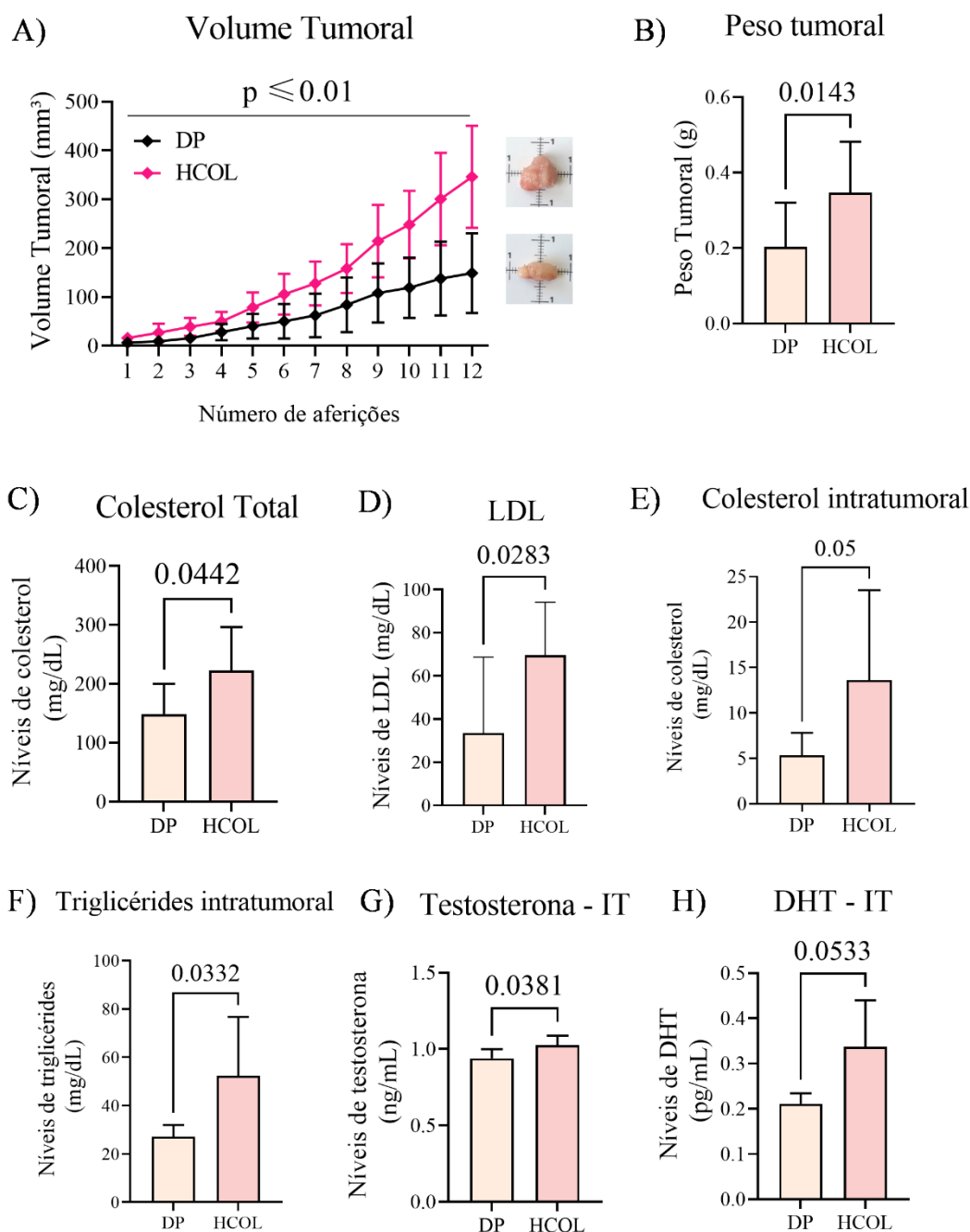
**Tabela 2.** Volumes tumorais do modelo HCOL e Controle.

Aferições	DP	HCOL	P
	Média	Média	
1	6,28	16	<b>0,015</b>
2	9,34	27	<b>0,001</b>
3	15,8	39	<b>0,0005</b>
4	27,9	49,7	<b>0,023</b>
5	40,4	78,6	<b>0,005</b>
6	50,1	105	<b>0,004</b>
7	62,5	128	<b>0,004</b>
8	83,9	158	<b>0,005</b>
9	108	214	<b>0,004</b>
10	119	248	<b>0,0005</b>
11	138	300	<b>0,001</b>
12	149	346	<b>0.0001</b>

**Tabela 3.** Média dos pesos dos animais dos grupos DP e HCOL no decorrer do plano experimental

Aferições	DP	HCOL	P
	Média (peso g)	Média (peso g)	
1	23.98	23.82	>0.999
2	25.04	24.53	0.594
3	25.46	24.9	>0.999
4	25.68	25.16	0.410
5	25.78	25.46	0.761
6	25.17	25.45	0.860
7	25.12	25.67	0.561
8	25.11	26.43	0.137
9	24.92	26.15	0.270
10	25.04	26	0.323
11	25.3	26.02	0.299
12	25.13	25.79	0.488

Entre 24 e 30 dias após as células PC-3 serem xenoenxertadas, os animais HCOL e DP foram eutanasiados. Foram realizados perfis lipídicos séricos, e os tumores foram removidos e pesados. Imagens representativas dos tumores de cada grupo demonstram que os tumores dos animais HCOL eram mais extensos do que os do grupo DP (Figura 12A). Além disso, os tumores do grupo HCOL eram 171,78% mais pesados do que os do grupo DP ( $p = 0,0143$ , Figura 12B). Os níveis de colesterol sistêmico ( $p = 0,044$ , figura 12C) e LDL ( $p = 0,027$ , figura 12D) do grupo HCOL eram significativamente mais elevados do que os do grupo DP. Os níveis de colesterol intratumoral e triglicérides também foram mensurados após a homogeneização dos tecidos. Equivalente aos níveis séricos, os níveis de colesterol intratumoral ( $p = 0,05$ , figura 12E) e triglicérides ( $p = 0,033$ , figura 12F;) foram elevados no grupo HCOL. O ensaio ELISA demonstrou que os níveis de testosterona no grupo HCOL foi significativamente mais elevado do que no grupo DP ( $p = 0,038$ , figura. 12G). Houve uma tendência para que as concentrações de DHT fossem elevadas no grupo HCOL em comparação com o grupo DP ( $p = 0,053$ , figura 12H).

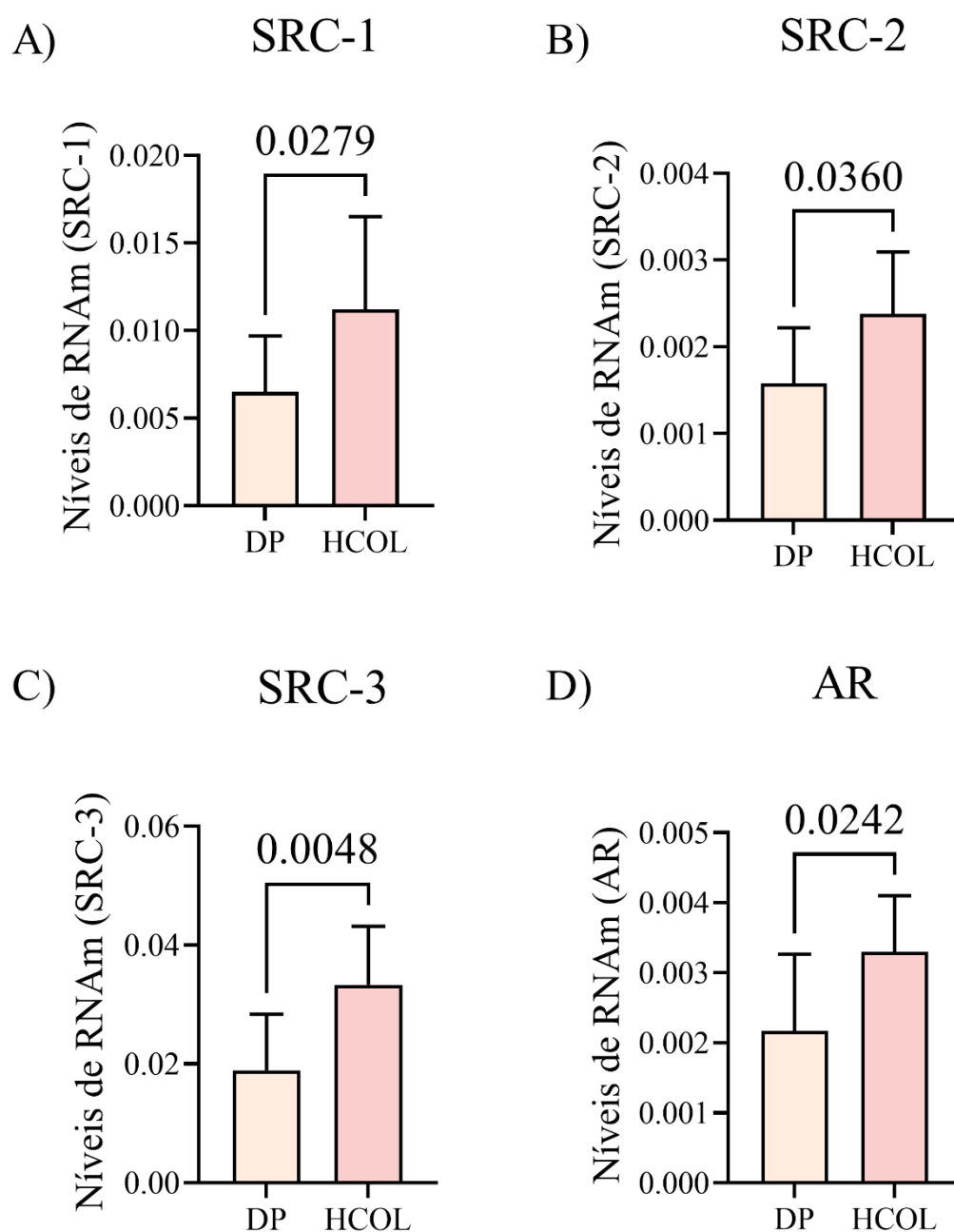


**Figura 12.** Efeito do colesterol sobre volume do tumor e perfil lipídico sérico e intratumoral nos modelos animais. A) O gráfico mostra o volume médio do tumor ( $\text{mm}^3$ ) ao longo do tempo, Teste de Mann-Whitney. Imagens representativas dos tumores nos grupos DP e HCOL no final do período experimental. B) Peso médio do tumor nos grupos DP e HCOL, Teste T. C) Níveis médios de colesterol sérico dos grupos DP e HCOL, Teste de Mann-Whitney. D) Níveis médios de LDL sérico dos grupos DP e HCOL, Teste T. E) Níveis de colesterol intratumoral dos grupos DP e HCOL, Teste T. F) Níveis médios de triglicérides intratumorais dos grupos DP e HCOL, teste de Mann-Whitney. G) Níveis médios de testosterona intratumoral, teste de Mann-Whitney. H) Níveis médios intratumorais de DHT, teste T. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são exibidos acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

#### 4.2.2 Relação entre aumento do perfil lipídico e expressão de cofatores AR no CPRC

Avaliamos a expressão dos coativadores p160 e AR nos tumores dos animais HCOL e DP. Como mostrado na Figura 13 A-C, a expressão dos genes da família p160 foi superexpressa no grupo HCOL, em comparação ao grupo DP (SRC-1  $p = 0,027$ , SRC-2  $p = 0,036$  e SRC-3  $p = 0,004$ , respectivamente). O nível de expressão de AR foi mais elevado no grupo HCOL em relação ao DP ( $p = 0,024$ , figura 13D).

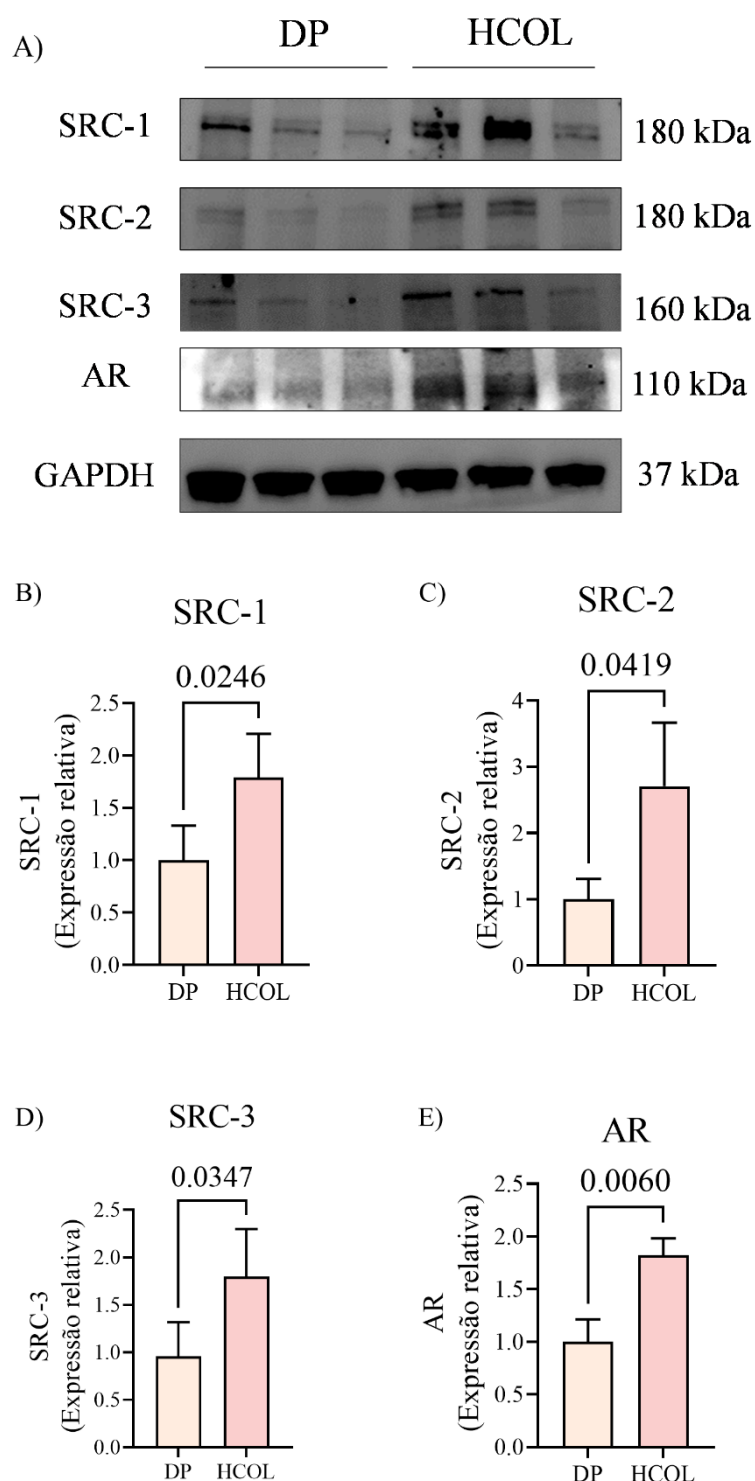




**Figura 13.** Efeito *in vivo* do colesterol sobre a expressão gênica dos coativadores p160 e do AR. A) Níveis de expressão do gene SCR-1. B) Níveis de expressão do gene SCR-2. C) Níveis de expressão do gene SCR-3. D) Níveis de expressão do gene AR. O Teste de Mann-Whitney foi empregado em todas as análises. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

O ensaio Western blot foi utilizado para determinar o impacto do colesterol na expressão proteica dos coativadores do AR. As imagens representativas estão dispostas

na Figura 14A. Como observado na Figura 14B-D, a expressão proteica de SRC-1, SRC-2 e SRC-3, foi maior no grupo HCOL ( $p = 0,024$ ,  $p = 0,041$  e  $p = 0,034$ , respectivamente). Verificamos também aumento significativo dos níveis de proteína AR no grupo HCOL ( $p = 0,006$ , figura. 14E).

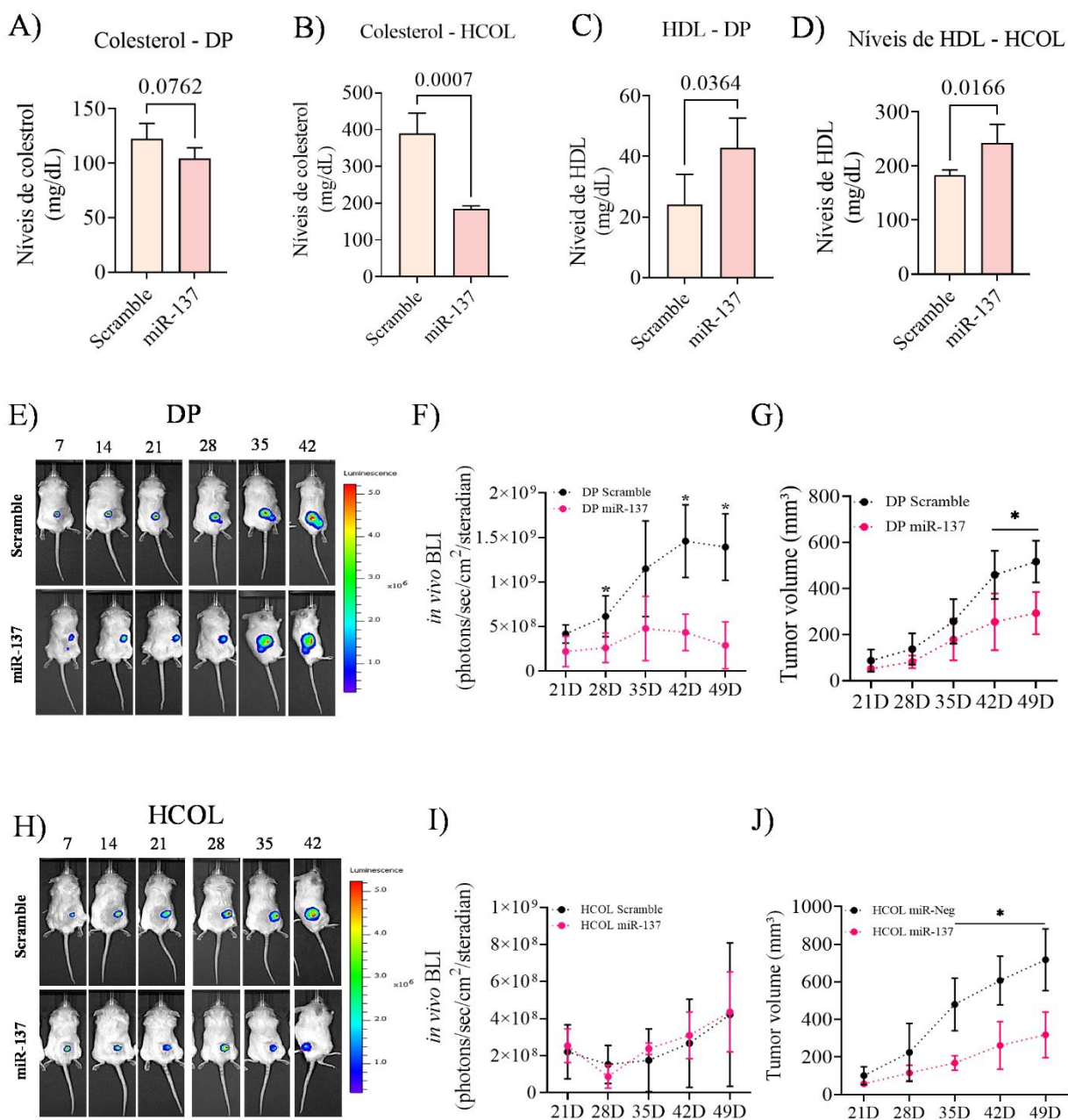


**Figura 14.** Efeito *in vivo* do colesterol sobre as proteínas p160 e AR por Western blot (WB). A) Imagens representativas de WB dos grupos DP e HCOL. Observamos um aumento da proteína nos tumores dos animais que receberam a dieta HCOL. B) Níveis de expressão da proteína SRC-1. C) Níveis de expressão da proteína SRC-2. D) Níveis de expressão da proteína SRC-3. E) Níveis de expressão da proteína AR. O teste T foi aplicado em todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

#### 4.2.3 Tratamento intratumoral com miR-137 no modelo experimental de CPRC com hipercolesterolemia induzida por dieta.

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e o soro foi coletado para análises bioquímicas. Curiosamente, quando subdivididos entre os grupos miR-137 e Scramble, observamos que os animais submetidos a DP e tratados com miR-137 tendiam a apresentar níveis de colesterol reduzidos ( $p = 0,076$ , figura 15A). No grupo HCOL, similarmente, os animais que receberam miR-137 também exibiram níveis reduzidos de colesterol sérico ( $p = 0,0007$ , figura 15B). Por outro lado, observamos que, tanto para o grupo DP como para o HCOL, houve um aumento dos níveis séricos HDL nos subgrupos tratados com miR-137 ( $p = 0,036$  e  $p = 0,016$ , figuras 15C e D, respectivamente).

A análise de bioluminescência revelou que o grupo DP, que recebeu miR-137 como forma de tratamento, demonstrou uma diminuição na atividade celular captada pelo dispositivo IVIS ( $p < 0,05$ , figura 15E e F). Além disso, estes mesmos animais também mostraram uma redução na velocidade de crescimento tumoral, analisada pelo paquímetro digital ( $p < 0,05$ , figura 15G, tabela 3). Ao contrário do grupo DP, o grupo HCOL não mostrou diferença na bioluminescência capturada pelo dispositivo IVIS ( $p > 0,05$ , figura 15H e I). Contudo, após a medição do tumor, os animais que receberam miR-137 mostraram volumes tumorais menores ( $p < 0,05$ , figura 15J, tabela 4). O peso corporal de ambos os grupos e subgrupos não mostrou diferenças consideráveis ao longo do tratamento (Tabelas 6 e 7).



**Figura 15.** Efeito da restauração intratumoral do miR-137 no modelo de CaP com hipercolesterolemia induzida por dieta. A) Perfil do colesterol, DP. B) Perfil do colesterol, HCOL. C) Níveis de HDL, DP. D) Níveis de HDL, HCOL. E) Bioluminescência (IVIS), grupo DP (Scramble vs. miR-137). F) Diferença entre a intensidade de bioluminescência dos subgrupos Scramble e miR-137, DP. G) Diferença entre o volume tumoral dos subgrupos Scramble e miR-137, paquímetro digital (DP). H) Bioluminescência (IVIS), grupo HCOL (Scramble vs. miR-137). I) Diferença entre a intensidade de bioluminescência dos subgrupos Scramble e miR-137 (HCOL). J) Diferença entre o volume tumoral dos subgrupos Scramble e miR-137, paquímetro digital (HCOL). O teste t foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos das análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

**Tabela 4.** Médias dos volumes tumorais do grupo DP tratados com miR-137.

Aferições	Dieta Controle		P
	Média Scramble	Média miR-137	
21D	87,95	52,58	0,20269
28D	137,6	82,43	0,17651
35D	257,9	179	0,25191
42D	459,8	255,4	<b>0,03091</b>
49D	517,2	293,7	<b>0,00801</b>

**Tabela 5.** Médias dos volumes tumorais do grupo Dieta HCOL tratados com miR-137.

Aferições	Dieta HCOL		P
	Média Scramble	Média miR-137	
21D	101,1	57,74	0,12313
28D	224,3	115,6	0,22196
35D	480,1	168,5	<b>0,00519</b>
42D	606,8	262	<b>0,00889</b>
49D	717,2	317,8	<b>0,00791</b>

**Tabela 6.** Média dos pesos do animais durante o tratamento com miR-137, DP.

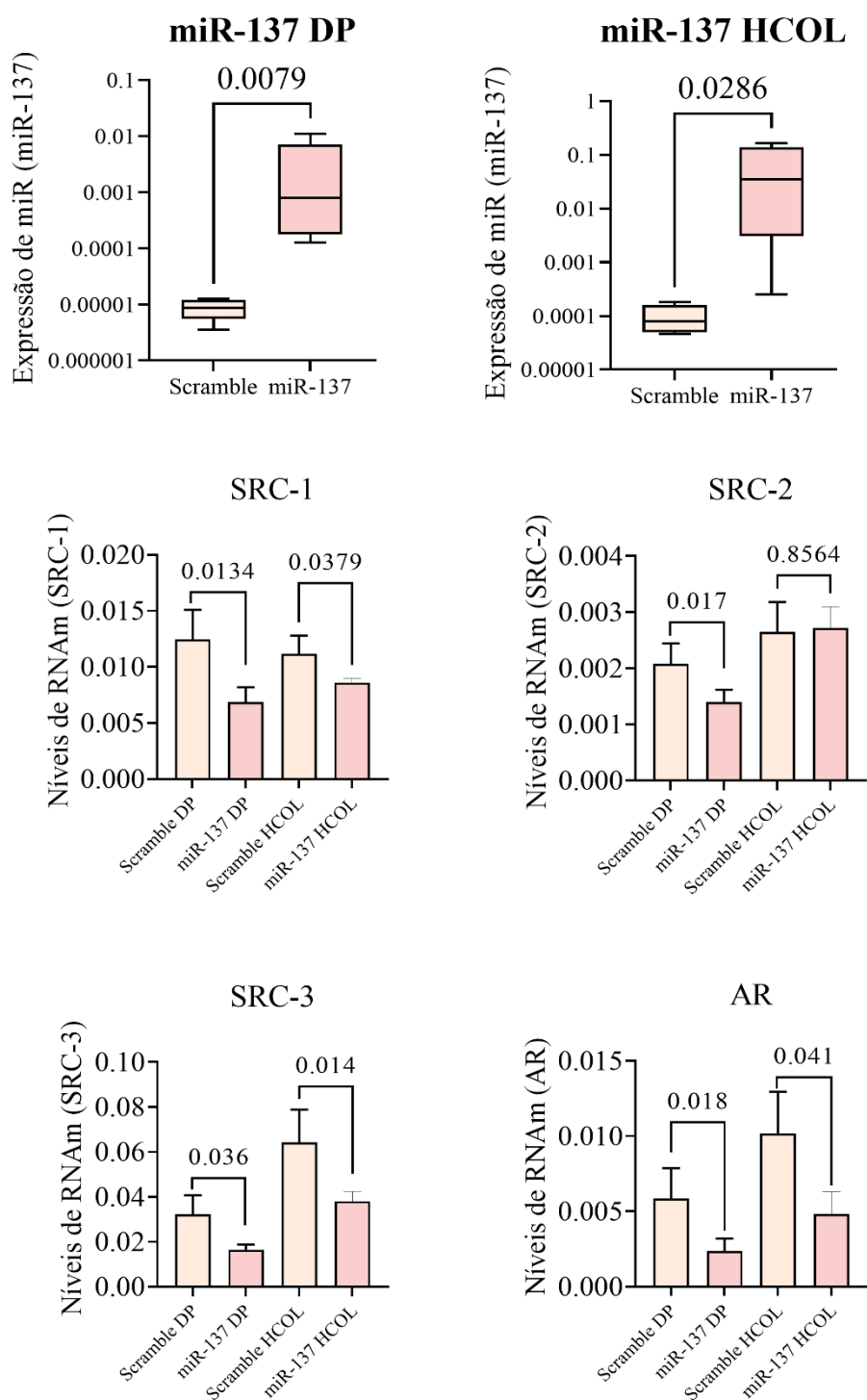
Aferições	Dieta DP		P
	Média Scramble	Média miR-137	
21D	22,15	24,86	<b>0,014166</b>
28D	21,22	23,76	<b>0,017847</b>
35D	21,82	23,18	0,129033
42D	21,73	22,74	0,240917
49D	21,81	22,97	0,100863

**Tabela 7.** Média dos pesos do animais durante o tratamento com miR-137, HCOL.

Aferições	Dieta HCOL		P
	Média Scramble	Média miR-137	
21D	25,58	23,32	0,07458
28D	25,05	23,38	0,153793
35D	24,99	22,54	0,050316
42D	24,82	22,57	0,089825
49D	25,04	22,67	0,101461

**4.2.4** A restauração intratumoral do miR-137 leva à redução da expressão da família p160 em xenoenxertos CaP avançados, levando à redução da proliferação

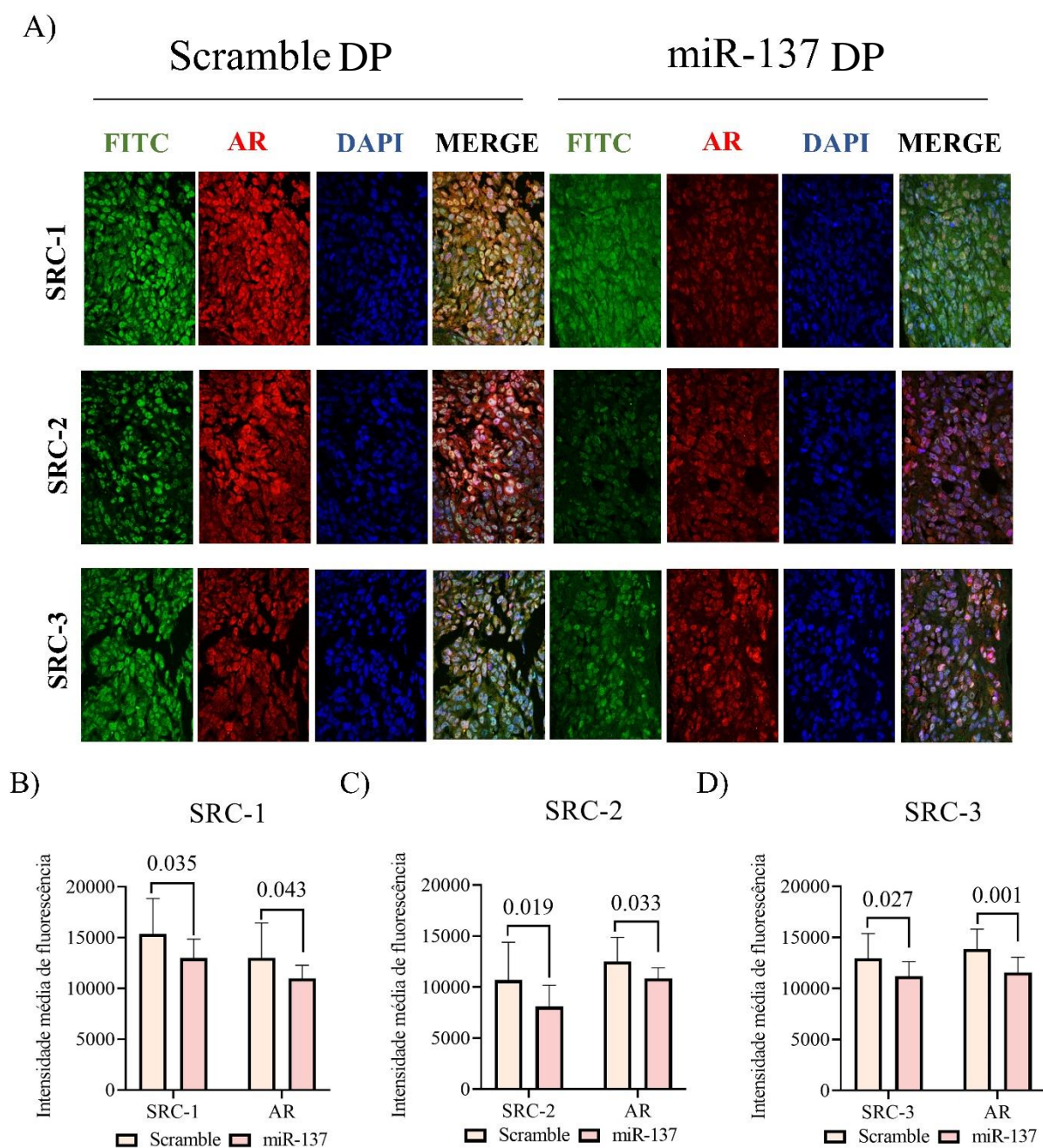
A expressão de miR-137 foi examinada por qPCR nos tumores dos animais dos grupos DP e HCOL. Observou-se um aumento significativo da regulação de miR-137 no tumor experimental grupo DP, em comparação com os tumores do grupo Scramble ( $p = 0,007$ , figura 16A e  $p = 0,028$ , figura 16B, respectivamente). Ao analisar a expressão dos genes da família p160 e AR, conferimos que, no grupo DP, houve uma redução significativa para todos os genes quando comparados com os Scrambles, SRC-1 ( $p = 0,013$ , figura 16C), SRC-2 ( $p = 0,017$ , figura 16D), SRC-3 ( $p = 0,036$ , figura 16E) e AR ( $p = 0,018$ , figura 16F). Para o grupo HCOL, conferimos reduções para os genes SRC-1 ( $p = 0,018$ , figura 16F), SRC-3 ( $p = 0,014$ , figura 16D), e AR ( $p = 0,041$ , figura 16F) após tratamento com miR-137.



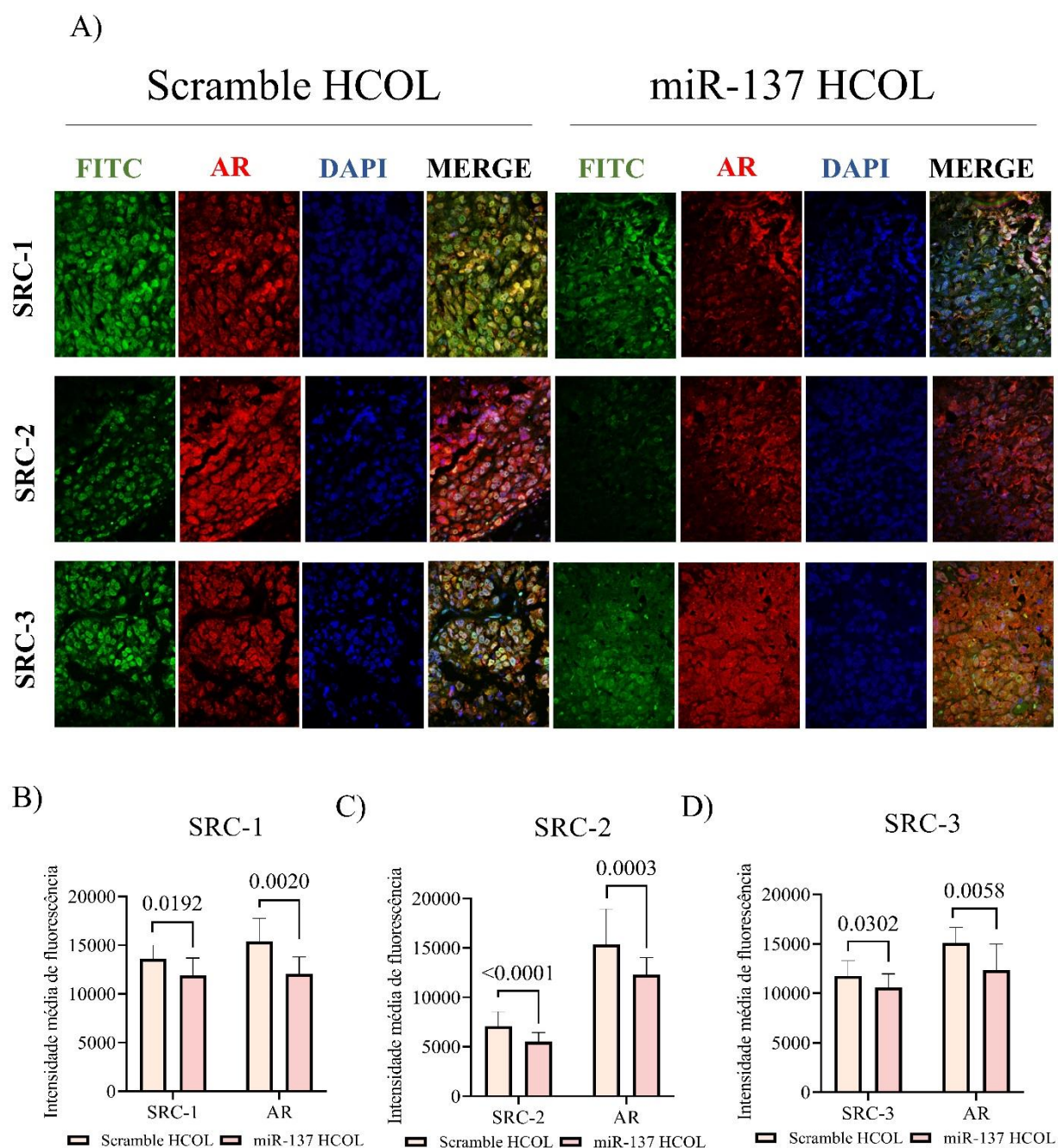
**Figura 16.** Expressão do miR-137 e de seus RNAm-alvo pós-tratamento. A) Níveis de expressão do miR-137 no grupo DP, Teste de Mann Whitney. B) Níveis de expressão do miR-137 no grupo HCOL, Teste de Mann Whitney. C) Níveis de expressão SRC-1 nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. D) Níveis de expressão SRC-2 nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. E) Níveis de expressão SRC-3 nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. F) Níveis de expressão AR nos grupos DP e HCOL após o tratamento com miR-137, teste T. As análises estatísticas para os genes p160 e AR foram feitas individualmente, com seu controle e miR dentro de seu grupo de dados, DP (Scramble x miR) e HCOL (Scramble x miR).



Em relação aos níveis de proteínas no grupo DP, conferimos que as proteínas da família p160 foram significativamente reduzidas (Figura 17A), SRC-1 ( $p = 0,035$ , figura 17B), SRC-2 ( $p = 0,019$ , figura 17C), e SRC-3 ( $p = 0,027$ , figura 17D). Após a redução das proteínas alvo, mais uma vez hipotetizamos que indiretamente, houve uma redução da proteína AR após dupla marcação com anticorpos SRC-1, 2, e 3 ( $p < 0,05$ , figuras 17 B-D).

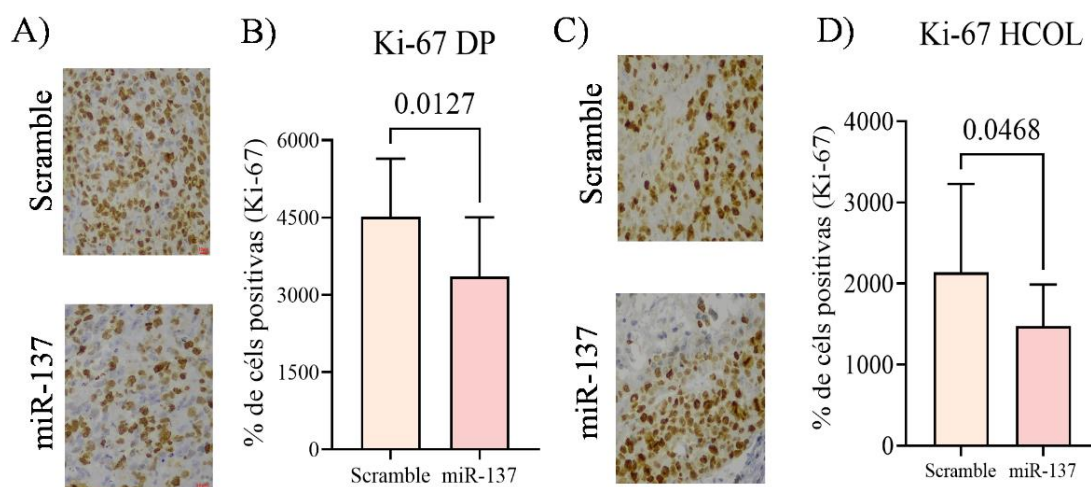


**Figura 17.** Efeito *in vivo* da restauração do miR-137 sobre a expressão das proteínas p160 e AR. A) Representação de IF em tecidos imunomarcados com anti-SRC-1, SRC-2, SRC-3 e AR tratados com miR-137 e seu respectivo controle. B) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-1 e AR. C) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-2 e AR. D) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-3 e AR. O teste T foi usado em todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.



**Figura 18.** Efeito *in vivo* da restauração do miR-137 no modelo HCOL sobre expressão das proteínas p160 e AR. A) Representação de IF em tecidos imunomarcados com anti-SRC-1, SRC-2, SRC-3 e AR tratados com miR-137 e seu respectivo controle. B) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-1 e AR. C) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-2 e AR. D) Níveis de intensidade de fluorescência de SRC-3 e AR, teste Mann Whitney. O teste T foi usado em todas as análises, exceto AR/SRC-3. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

Conferimos que, após a diminuição da expressão da família p160 e AR, a proliferação de células tumorais do grupo de xenoinxertos da DP, tratados com miR-137 foi reduzida, quando comparada com Scramble ( $p = 0,012$ , figuras 19 A-B). O mesmo pôde ser observado para o grupo HCOL tratado com miR-137 ( $p = 0,046$ , figuras 19 C-D).



**Figura 19.** Índice de proliferação do tecido por Ki-67. Os níveis de proliferação celular foram medidos pela reação de imuno-histoquímica Ki-67 (Clone Mib-1). A) Imagens representativas do grupo DP após o tratamento com miR-137 e Scramble. B) Análise estatística da proliferação de tecidos no grupo DP. C) Imagens representativas do grupo HCOL após o tratamento com miR-137 e controle. D) Análise estatística da proliferação de tecidos no grupo HCOL. O teste T foi usado para todas as análises. Os valores de p obtidos nas análises estatísticas são mostrados acima das barras em cada painel, e a barra de erro corresponde ao desvio padrão das amostras.

## **5. DISCUSSÃO**

O colesterol desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e agressividade do CaP (37). Dados epidemiológicos sugerem que drogas destinadas a regular os níveis de colesterol podem prevenir sua progressão, mas não a incidência da doença (69). Ademais, altos níveis de colesterol circulante têm sido associados ao aumento nos níveis de andrógenos intratumorais (70), o que pode estar atrelado à progressão tumoral, uma vez que o CaP é uma neoplasia responsiva a andrógenos.

Nas últimas décadas os miRs têm se apresentado como moléculas interessantes para cunho terapêutico e com potencial valor clínico (71). O miR-137 já foi descrito, tendo como alvo direto inúmeros genes que estão associados à progressão do CaP, dentre eles os coativadores do AR (58, 64). Uma vez que nossos resultados demonstraram que o colesterol pode desencadear o aumento da expressão da família de coativadores nucleares p160, a intervenção alvo-molecular com miR-137, sabidamente metilado no CaP, foi capaz de regular negativamente a progressão tumoral, tanto em modelo experimental DP quanto no modelo com HCOL induzida por dieta.

Consistente com os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* do nosso estudo, outro trabalho também demonstrou que as dietas com alto colesterol estimulam o crescimento das células do CaP, enquanto que dietas com baixos níveis de colesterol parecem retardá-lo (37).

No presente trabalho, demonstramos que o colesterol desencadeia o aumento da migração celular, diminuição da apoptose e aumento da proliferação em células PC-3. Embora esses resultados sejam consistentes com outros estudos (37, 72), nossos resultados foram obtidos usando um menor tempo de exposição ao colesterol (73).

Demonstramos também que o miR-137 pode atenuar a transcrição e tradução de seus alvos, SRC-1, SRC-2 e SRC-3. A restauração do miR-137 na linhagem PC-3 diminuiu a migração e invasão celular, impactando negativamente a fase S do ciclo

celular, levando à redução da proliferação e aumento das taxas de apoptose, o que corrobora com os dados disponíveis na literatura (58, 64, 74). Indiretamente, o miR-137 também reduziu os níveis de AR na mesma linhagem celular. É plausível que este evento esteja associado à redução da expressão de seus coativadores, uma vez que a literatura não demonstra dados que este miR tenha regiões de ligação alvo com este gene.

Usando modelo ortotópico, Moon et al. também observaram uma relação entre níveis aumentados de colesterol sistêmico e maiores volumes tumorais em camundongos NOD / SCID (37). A esse respeito, é importante ressaltar que, apesar de empregarmos um xenoinxerto subcutâneo, os resultados são semelhantes. Acreditamos que mecanismos moleculares similares estão envolvidos no crescimento do tumor (ou seja, expressão de AR).

Para investigar essa possibilidade, monitoramos os níveis de expressão gênica de coativadores do AR. O gene SRC-1 é essencial para a coativação de AR e tem sido associado ao crescimento normal da próstata, dependente de hormônio em camundongos geneticamente modificados (75). Além de sua importância no tecido prostático benigno, a desregulação do SRC-1 foi correlacionada à agressividade do tumor e recorrência do CaP, com sua expressão sendo mais elevada em tumores agressivos (76). De fato, nossos experimentos *in vitro* e *in vivo* indicaram que o aumento da expressão de SRC-1 foi associado à tumorigênese da próstata. No entanto, embora o aumento da expressão de SRC-1 possa estar implicado na progressão do tumor, a perda do gene SRC-1 pode não suprimir a tumorigênese prostática (77).

O gene SRC-2, outro coativador do AR, demonstrou estimular o crescimento celular em ambientes sensíveis e resistentes a andrógenos (78). Além disso, o *knockout* do gene SRC-2 atenua os níveis de lipídios citoplasmáticos em células LNCaP e PC-3 (79). Corroborando com dados existentes na literatura, em nossos resultados *in vitro*, após



as células serem expostas ao colesterol, evidenciamos níveis elevados de colesterol intracitoplasmático, maiores níveis de expressão do gene SRC-2, e maiores taxas de proliferação celular.

O outro coativador do AR, analisado no presente estudo, foi o SRC-3. Tien et al. demonstraram que o *knockout* do gene SRC-3 nas células prostáticas não teve influência na morfogênese da próstata, porém, pode inibir o crescimento do tumor (80). Além disso, foi demonstrado que SRC-3 desempenha um papel fundamental na adipogênese (81), além do que, o aumento na expressão do SRC-3 já foi correlacionado à redução da apoptose (82), o que corrobora com nossos resultados das células suplementadas com colesterol. Em células dependentes de andrógeno, o SRC-3 é conhecido por desempenhar um papel importante na proliferação (83). Embora nossa linhagem celular seja conhecida como resistente a andrógenos, é plausível que a regulação positiva, observada na expressão do gene SRC-3 em camundongos HCOL, esteja associada ao aumento do perfil lipídico intratumoral, o que também pode ser responsável pelos maiores volumes tumorais detectados nesse grupo.

Curiosamente, a suplementação *in vitro* de células PC-3 com colesterol resultou em um aumento significativo nos níveis de expressão de AR. Este resultado é consistente com outro estudo que sugeriu que níveis elevados de colesterol podem aumentar a sinalização androgênica intratumoral (28). O que também foi confirmado por nossos dados, uma vez que os animais do grupo HCOL exibiram maiores níveis de testosterona e DHT intratumoral.

Dados demonstram que os coativadores p160 estão implicados em uma variedade de doenças, bem como no metabolismo lipídico e resistência às drogas (78, 84). Como a SRC-1, SRC-2 e SRC-3 estão envolvidas em vários processos associados a neoplasias



diferentes, entende-se que estratégias terapêuticas direcionadas a essas proteínas podem apresentar alto potencial terapêutico. Contudo, alguns desafios estão à frente desta finalidade. Dentre eles, encontrar uma janela terapêutica de modo que os níveis dos coativadores p160 sejam baixos o suficiente para inibir a progressão de doenças, e ainda apresentarem níveis que possam exercer sua finalidade sem impactar em efeitos tóxicos (83).

Nossos dados em conjunto apresentam que o colesterol desencadeia o aumento dos três membros da família p160 e, conseqüentemente, o AR. Contudo, após a restauração da expressão do miR-137, demonstramos também que estes três membros exibem uma redução significativa, o que acreditamos ter impactado na redução do crescimento tumoral. A literatura traz que a inibição destes membros, isoladamente, pode não impactar na progressão tumoral (77). Contudo, em nosso estudo, demonstramos que o miR-137 foi capaz de impactar negativamente na expressão dos três componentes da família p160. Surpreendentemente, observamos que os níveis séricos de colesterol de ambos os grupos experimentais foram significativamente reduzidos e, em contrapartida, os níveis de HDL apresentaram-se maiores nestes mesmos grupos. Embora dados apontem o papel de vários miRs nas vias colesterogênicas e lipogênicas (85), não encontramos dados na literatura que possam explicar o papel do miR-137 neste contexto. Como os xenoinxertos eram vascularizados, acreditamos que porções significativas deste miR adentraram para os vasos e, possivelmente, alteraram algum fator de metabolismo lipídico e vias colesterogênicas. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para entender melhor o papel da miR-137 neste contexto.

É interessante observar que no grupo HCOL, o miR-137 reduziu a velocidade de crescimento mais efetivamente do que no grupo Dieta Padrão entre os dias 35, 42, e 49.

Inferimos que o colesterol pode ter melhorado a resposta de restauração deste miR. Corroborando com nossas descobertas, Nilsson E. M. et al. (2015) relatou que o miR-137 responde à indução androgênica e é epigeneticamente silenciado no CaP, hemimetilado em células andrógeno-responsivas (por exemplo, a LNCaP), e metilado em células não-responsivas (por exemplo, a PC-3) (64). Apresentamos que o tratamento com o miR-137 no modelo experimental HCOL, foi capaz de impactar negativamente a expressão dos coativadores p160 e retardar a progressão do tumor. Acreditamos que andrógenos, produzidos diretamente ou indiretamente por precursores (por exemplo, o colesterol), e a restauração da expressão do miR-137, influenciam a homeostase do eixo miR-137/coativadores/AR. Entretanto, a ausência ou diminuição deste miR pode levar à hiperativação e sinalização do AR.

Sugerimos que células PC-3 utilizam seus coativadores e as vias *de novo* lipogênese para sua progressão. Assim, embora com baixos níveis de AR, isto é suficiente para desencadear a progressão tumoral, o que acreditamos que aconteça através de um *loop* autócrino. Além disso, postulamos que o colesterol desencadeia um efeito inicial de uma cascata de eventos que levam à progressão do tumor, e que o DHT, como metabólito final, seja através de vias canônicas ou alternativas (39), pode contribuir para o avanço bem sucedido do fenótipo de CPRC. Estes eventos parecem estar ligados a mecanismos que regulam positivamente os cofatores do AR. Entretanto, estudos mecanicistas devem ser realizados para entender profundamente esta associação.

Sabe-se que muitos mecanismos de resistência no CaP surgem pelo restabelecimento de uma fração do eixo de sinalização do AR, como por exemplo: o aumento da expressão do AR, mutações nos domínios de ligação, variantes alternativas do AR, ou uso de receptores esteroides. Grande parte destes mecanismos de resistência

tem participação dos coativadores p160 (83). Sendo assim, acreditamos que inibir efetivamente o eixo dos coativadores forneceria um bloqueio abrangente da maioria dos mecanismos de resistência. Neste contexto, nossos dados demonstram que, mesmo na presença de altos níveis de colesterol, um indutor de expressão dos coativadores p160 e efeito adverso das terapias anti-androgênicas, a restauração do miR-137 se mostra como uma alternativa eficaz, uma vez que este desencadeia apenas a diminuição e não a eliminação dos níveis dos coativadores p160, os quais são essenciais para outros sistemas do organismo humano. Da mesma forma que Jin et al, (2017), acreditamos que o uso de moléculas que previnam ou bloqueiem o aumento da expressão de moléculas coativadoras do AR, possa ser uma ferramenta extremamente útil no manejo clínico para possíveis tratamentos alvos-moleculares do fenótipo CPRC.

Em conjunto, nossos dados demonstram que o aumento dos níveis de colesterol mimetiza um cenário favorável à progressão do CaP, e que o miR-137 se apresenta como uma potencial ferramenta alvo-terapêutica para esta neoplasia.

### **Limitações do estudo**

Nosso estudo apresentou algumas limitações, dentre elas destacamos o tempo (horas) de suplementação das células com colesterol. Embora os trabalhos presentes na literatura embasassem o tempo e a concentração adequada para suplementação das células PC-3 (Anexo 6), nossos genes e proteínas de interesse não seguiam uma elevação em conjunto. Assim, levamos um tempo considerável para chegar ao estimado de 8 horas de suplementação, tempo que consideramos ideal para nosso estudo e também onde todos os genes e proteínas de interesse aumentavam, em conjunto.

Outra limitação envolve a ração utilizada, especificamente em relação à porcentagem ideal de colesterol fornecida aos animais. Determinar a concentração ideal de colesterol na ração é desafiador, pois é necessário encontrar um equilíbrio entre condições fisiológicas relevantes e a minimização de possíveis efeitos adversos.

A transfecção celular com o miR-137, concomitante às células PC-3 suplementadas com colesterol, enfrentou algumas dificuldades e trouxe vários desafios para a realização do experimento. Uma vez que ambas as técnicas utilizam métodos lipídicos, foi visto que a eficiência da transfecção neste ambiente apresentava alterações importantes, e até mesmo falhas. Desta forma, para não haver vieses de interpretação de nossos resultados, o tratamento com miR-137, em ambiente suplementado com colesterol, foi realizado apenas no modelo animal.

## **6. CONCLUSÃO**

*In vitro*, o colesterol regulou positivamente a expressão dos coativadores SRC-1 e SRC-2. A expressão do AR neste grupo, do mesmo modo, foi regulada positivamente. Nos ensaios celulares, observamos que o colesterol induz a migração e proliferação celular, levando a uma diminuição das taxas de apoptose.

O miR-137 foi capaz de diminuir a expressão de seus alvos, SRC-1, SRC-2, SRC-3, bem como do AR. Em relação aos ensaios celulares, a superexpressão do miR-137 levou à diminuição das taxas de invasão e migração celular, além de reduzir a proliferação e aumentar os índices de apoptose.

O modelo HCOL foi estabelecido com sucesso em camundongos NOD.CB17-SCID/JUnib, pós indução da dieta hipercolesterolêmica; observou-se aumento de níveis séricos de colesterol total e LDL. Do mesmo modo, a nível intratumoral, foi conferido aumento dos níveis de colesterol total e LDL.

*In vivo*, apresentamos que a hipercolesterolemia, induzida por dieta, desencadeou a superexpressão dos coativadores SRC-1, SRC-2, SRC-3 e AR, ocasionando aumento do volume tumoral deste grupo.

A restauração intratumoral do miR-137 afetou a expressão dos coativadores da família p160 e AR de forma negativa, e atenuou a velocidade de crescimento tumoral nos animais submetidos em ambas as dietas, Padrão e HCOL.

## **7. ANEXOS**

## Anexo – 1. Autenticação da linhagem celular PC-3LUC2.



DTAPEP  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



## AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS

Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

## INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	IRAN AMORIM DA SILVA
Instituição / Institution	HCFMUSP
Departamento / Department	CIRURGIA
Telefone / Phone	1130617183
E-mail	iransilva@gmail.com

Nome da Linhagem / Cell line name PC3LUC2 (ATCC CRL1435LUC2)

Amostra recebida em / Samples received in 00-00-0000 Data do laudo / Report date: 16-12-2019

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile			
	Perfil da Amostra / Query Profile PC3LUC2				Perfil da referência / Database Profile PC-3 (ATCC:CRL-1435)			
TH01	6	7			6	7		
TPOX	8	9			8	9		
vWA	17				17			
CSF1PO	11				11			
D16S539	11				11			
D7S820	8	11			8	11		
D13S317	11				11			
D5S818	13				13			
D21S11								
Amelogenin	x				x			
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:								12
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:								12
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:								100

## RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência  $\geq 80\%$  são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with  $\geq 80\%$  match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

## METODOLOGIA / METHODOLOGY

10 STR's, correspondendo aos loci TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin e D21S11 (GenePrint 10 / Promega), foram amplificados e submetidos à eletroforese capilar para separação dos fragmentos (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). Os dados foram analisados através do software XXX GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados na validação de cada amostra. / 10 STR's (TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin and D21S11 - GenePrint 10 / Promega) are co-amplified and submitted to capillary electrophoresis (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). An internal lane standard (ILS) and allelic ladder are provided for sizing and genotyping of amplified fragments, and the 2800M Control DNA is supplied as a positive control (GenePrint 10 / Promega). Data is analyzed using software GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC).

## INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde a nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados analisados / The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database
- A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / The submitted profile is an exact match for the following human cell line(s):  
PC-3 Prostate Adenocarcinoma Human (ATCC:CRL-1435)
- O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) / The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s):

## OBSERVAÇÕES / Additional Comments

[https://www.atcc.org/en/STR\\_Database.aspx](https://www.atcc.org/en/STR_Database.aspx) Obs: A linhagem parece ter sido geneticamente modificada

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel

Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP  
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903  
Fone 11 55 3061-7412  
[www.bioterio.fm.usp.br](http://www.bioterio.fm.usp.br)



## Anexo – 2. Ficha técnica da ração hipercolesterolêmica.

# RHOSTER


**DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**
**RH19539E**

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	23,49	20,96
Carboidrato	43,93	39,19
Gordura	19,85	39,85
Colesterol 14.987mg/kg (1,5% colesterol)	***	***
Dieta 4,5kcal/g	***	***

\*Dieta Purificada para Indução de Aterosclerose em Roedores.

\*Produzida em Pellet macio - pacotes de 1kg

\*Quantidade mínima 3kg

\*Prazo de Entrega: 15 dias úteis

### Ingredientes

Caseína Láctea, Amido de Milho, Amido Dextrinizado, Sacarose, Celulose, Colesterol Sigma, Mix Mineral RH9504A\*, Manteiga de Cacau, L-Cistina, Mix Vitamínico RH9505A\*\*, Bitartarato de Colina, Óleo de Milho, Citrato de Potássio mono, Fosfato de Cálcio dib., Carbonato de Cálcio, Cloreto de Sódio, TertButilhidroquinona Sigma.

### Mais Informações

\*Mix Mineral AIN-76 isento de Cálcio Fósforo Potássio e Cloreto.

\*\*Mix Vitamínico AIN-76 10x mais concentrado.

\*\*\*Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

Modo de Usar: fornecer com livre acesso

Prazo de Validade: após 3 meses da data de fabricação

Modo de Conservação: ao receber manter à temperatura de 4°C (geladeira)

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

Av. Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd.Salete - Araçoiaba da Serra/SP - CEP: 18190-000

Fones: (15) 3281-3037 / (15) 3281-4748 - CNPJ 00.984.204/0001-04 - Inscr.Estadual 178.070.220.114

Anexo – 3. Ficha técnica da ração controle.

# RHOSTER



DIETA PADRÃO AIN-76

RH19522

## INGREDIENTES

Amido de Milho, Caseína Láctea, Sacarose, Celulose (Fibra), Mix Mineral AIN-76 (RH9504), Mix Vitamínico AIN-76 (RH9505), Óleo de Milho, DL-Metionina, Bitartarato de Colina (41,1% Colina).

## PERFIL NUTRICIONAL

Proteína	20,30%	20,08 kcal%
Carboidrato	66,00%	67,70 kcal%
Lipídios	5,0%	11,50 kcal%
Dieta	3,9 kcal/g	



Referência Bibliográfica: J. Nutr.107: 1340-1348, 1977

## Utilizada em pesquisas de:

Obesidade  
Diabetes  
Hipertensão  
Aterosclerose  
Osteoporose  
Síndrome Metabólica

## FÓRMULA RH19522

Caseína Láctea	200g
DL-Metionina	3g
Amido de Milho	150g
Sacarose	500g
Celulose	50g
Óleo de Milho	50g
Mix Mineral RH9504	35g
Mix Vitamínico RH9505	10g
Bitartarato de Colina	2g
TOTAL	1000g

Produto sob encomenda

Pedido mínimo de 3kg em pacotes de 1kg

Manter em temperatura de 4°C ou inferior

Validade de 3 meses após data de fabricação ou 5 meses em freezer

Fórmulas especiais para autoclavagem

Av. Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd. Saleté  
Araçoiaba da Serra - SP - CEP: 18190-000

(15) 3281.3037 / (15) 3281.4748 / e-mail: contato@rhoster.com.br / site: www.rhoster.com.br

## Anexo 4 - Ficha técnica da ração hipercolesterolêmica PragSoluções.



## Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido  
 Cliente Ruan Pimenta USP - SP  
 Data 06/09/2021  
 Validade 05/03/2022 Manter **CONGELADO** após retirar da caixa  
 Manipulador  
 Formula Dieta 20-40-40% Manteiga Cacau + 2% Colesterol (COD 410)  
 Dose (g ou ml) 3.200 1 vezes  
 Dose (Kg ou L) 3,20

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	22,88000%	Ingredion	1	1800132	21/04/23	732,160	732,160	
	CASEINA	22,29000%	AL	1	49166	11/08/22	713,280	713,280	
	AMIDO DEXTRINIZADO	7,91000%	Indemil	1	AJ1331	13/10/22	253,120	253,120	
	SACAROSE	13,87000%	GA	1	210611	11/06/23	443,840	443,840	
	MANTEIGA DE CACAU	17,28000%	Gobeche	1		02/02/23	552,960	552,960	
	OLEO DE MILHO	2,79000%	Cargil	1	L03	05/03/2022	89,280	89,280	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,57000%	Inlab	1	858073	30/12/22	178,240	178,240	
	L CISTINA	0,33000%	Inlab	1	854895	30/07/2024	10,560	10,560	
	BITARTARATO DE COLINA	0,22000%	Inlab	1	853567	30/03/22	7,040	7,040	
	CITRATO DE POTÁSSIO	1,84000%	Chemistry	1	ALL136545	23/10/22	58,880	58,880	
	FOSFATO DE CALCIO BIBASICO	1,45000%	Inlab	1	856653	30/06/23	46,400	46,400	
	CARBONATO DE CALCIO	0,61000%	Inlab	1	857165	30/07/2023	19,520	19,520	
	CLORETO DE SODIO	0,29000%	Inlab	1	857108	28/02/23	9,280	9,280	
	MIX MINERAL AIN 76 A Mod	0,56000%	PragSoluções	1	070621	07/06/22	17,920	17,920	
	MIX VIT 76 A C 10 X	0,11000%	PragSoluções	1	7621	07/06/22	3,520	3,520	
	COLESTEROL	2,00000%	Inlab	1	858341	30/06/26	64,000	64,000	
		100,000%					3.200	3.200	

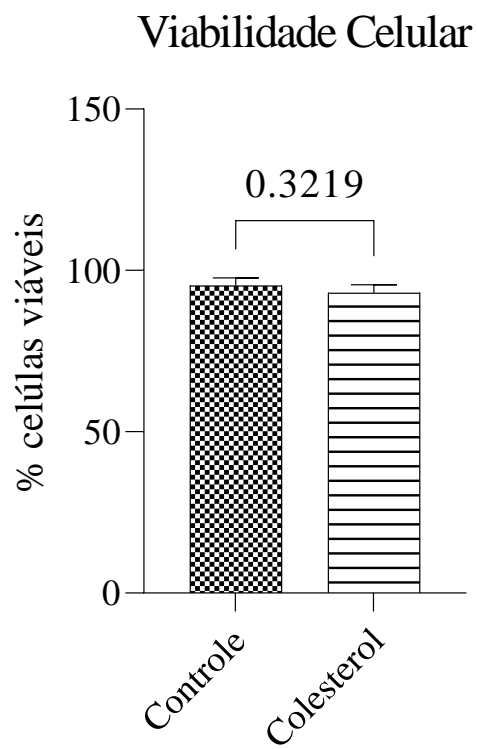
diluições: 1/0000 em sacarose

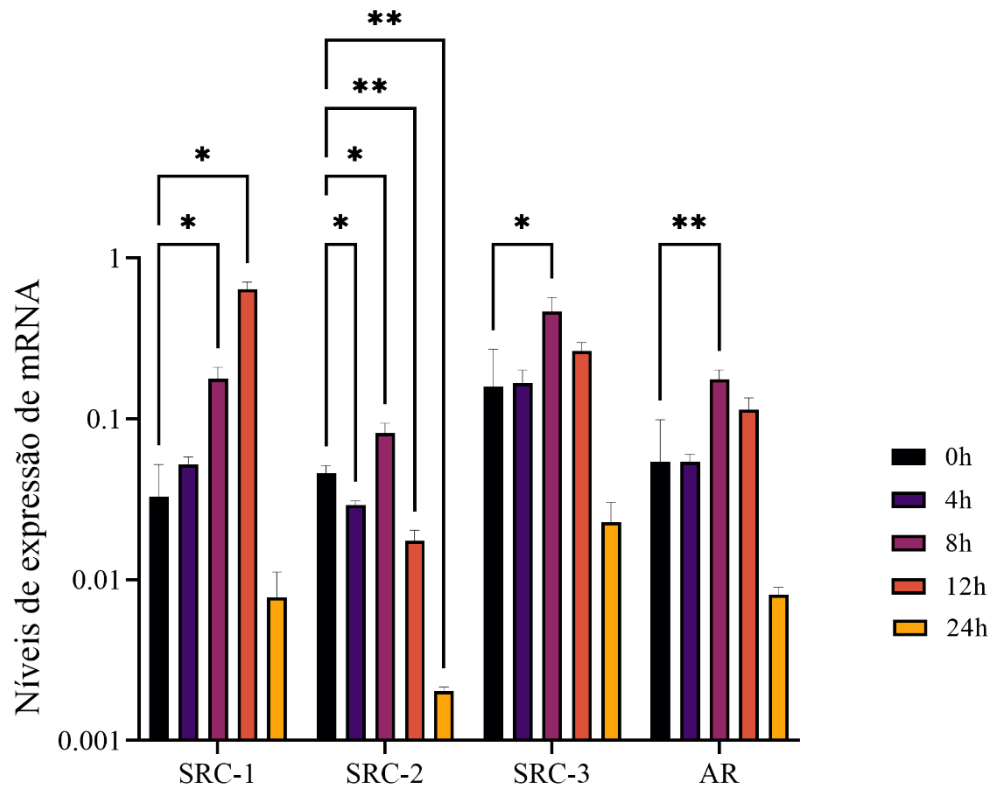
Manipulado:

Aprovado:

Obs Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

**Anexo 5** – Ensaio de viabilidade celular após suplementação das células PC-3 com colesterol.



**Anexo 6** – Tempo de suplementação da célula PC-3 com colesterol 2 $\mu$ g/mL.Linhagem celular PC-3 suplementada com colesterol (2 $\mu$ g)

## **REFERÊNCIAS**

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: international agency for research on cancer. 2018:1-6.
2. Organization WH. Brazil Source: Globocan 2020 2021 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>].
3. Organization WH. Data source: GLOBOCAN 2020 2020 [Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=ranking&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=1&cancer=27&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=11&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&show\\_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=ranking&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=1&cancer=27&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=11&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D)].
4. Barron N, Keenan J, Gammell P, Martinez VG, Freeman A, Masters JR, et al. Biochemical relapse following radical prostatectomy and miR-200a levels in prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(11):1193-9.
5. Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):108-16.
6. Nevo A, Navaratnam A, Andrews P. Prostate cancer and the role of biomarkers. *Abdom Radiol (NY)*. 2020;45(7):2120-32.
7. Gulley J, Dahut W. Novel clinical trials in androgen-independent prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2002;1(1):51-7.
8. Assikis VJ, Simons JW. Novel therapeutic strategies for androgen-independent prostate cancer: an update. *Semin Oncol*. 2004;31(2 Suppl 4):26-32.
9. Sharifi N. Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology*. 2013;154(11):4010-7.
10. Ferraldeschi R, Welti J, Luo J, Attard G, de Bono JS. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene*. 2015;34(14):1745-57.
11. Zhang A, Zhang J, Plymate S, Mostaghel EA. Classical and Non-Classical Roles for Pre-Receptor Control of DHT Metabolism in Prostate Cancer Progression. *Horm Cancer*. 2016;7(2):104-13.
12. Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E, Smith A, Satagopan J, Zhang L, et al. Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol*. 2004;164(1):217-27.
13. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*. 1972;22(4):232-40.
14. Dai C, Heemers H, Sharifi N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(9).
15. Attar RM, Takimoto CH, Gottardis MM. Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res*. 2009;15(10):3251-5.
16. Stratton KL, Chang SS. Locally advanced prostate cancer: the role of surgical management. *BJU Int*. 2009;104(4):449-54.
17. Melloni C, Roe MT. Androgen deprivation therapy and cardiovascular disease. *Urol Oncol*. 2020;38(2):45-52.
18. Network CGAR. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011-25.

19. Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol.* 2012;30(2):195-200.
20. Kluth M, Runte F, Barow P, Omari J, Abdelaziz ZM, Paustian L, et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2015;137(10):2354-63.
21. Mellinger N, Thomsen E, Tsourlakis MC, Kluth M, Hube-Magg C, Minner S, et al. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis.* 2015;36(11):1333-40.
22. Hong MK, Macintyre G, Wedge DC, Van Loo P, Patel K, Lunke S, et al. Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Commun.* 2015;6:6605.
23. da Silva FC, Oliveira P. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Eur Urol.* 2017;71(1):142-3.
24. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature.* 2015;520(7547):353-7.
25. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell.* 2015;162(2):454.
26. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science.* 2009;324(5928):787-90.
27. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(21):1995-2005.
28. Clegg NJ, Wongvipat J, Joseph JD, Tran C, Ouk S, Dilhas A, et al. ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Res.* 2012;72(6):1494-503.
29. Taplin ME, Bubley GJ, Ko YJ, Small EJ, Upton M, Rajeshkumar B, et al. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res.* 1999;59(11):2511-5.
30. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, et al. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol.* 1993;7(12):1541-50.
31. Steketee K, Timmerman L, Ziel-van der Made AC, Doesburg P, Brinkmann AO, Trapman J. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2002;100(3):309-17.
32. Culig Z, Hoffmann J, Erdel M, Eder IE, Hobisch A, Hittmair A, et al. Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *Br J Cancer.* 1999;81(2):242-51.
33. Toren PJ, Gleave ME. Evolving landscape and novel treatments in metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Asian J Androl.* 2013;15(3):342-9.
34. Karantanos T, Evans CP, Tombal B, Thompson TC, Montironi R, Isaacs WB. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level. *Eur Urol.* 2015;67(3):470-9.
35. Yannucci J, Manola J, Garnick MB, Bhat G, Bubley GJ. The effect of androgen deprivation therapy on fasting serum lipid and glucose parameters. *J Urol.* 2006;176(2):520-5.



36. Nishiyama T, Ishizaki F, Anraku T, Shimura H, Takahashi K. The influence of androgen deprivation therapy on metabolism in patients with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):657-60.
37. Moon H, Ruelcke JE, Choi E, Sharpe LJ, Nassar ZD, Bielefeldt-Ohmann H, et al. Diet-induced hypercholesterolemia promotes androgen-independent prostate cancer metastasis via IQGAP1 and caveolin-1. *Oncotarget.* 2015;6(10):7438-53.
38. Sharifi N, Auchus RJ. Steroid biosynthesis and prostate cancer. *Steroids.* 2012;77(7):719-26.
39. Fiandalo MV, Wilton J, Mohler JL. Roles for the backdoor pathway of androgen metabolism in prostate cancer response to castration and drug treatment. *Int J Biol Sci.* 2014;10(6):596-601.
40. Shah US, Dhir R, Gollin SM, Chandran UR, Lewis D, Acquafondata M, et al. Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2006;37(4):401-9.
41. Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene.* 2000;19(45):5173-81.
42. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, et al. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2002;98(1):19-22.
43. Perlmutter MA, Lepor H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev Urol.* 2007;9 Suppl 1:S3-8.
44. Masko EM, Alfaqih MA, Solomon KR, Barry WT, Newgard CB, Muehlbauer MJ, et al. Evidence for Feedback Regulation Following Cholesterol Lowering Therapy in a Prostate Cancer Xenograft Model. *Prostate.* 2017;77(5):446-57.
45. Liss MA, Al-Bayati O, Gelfond J, Goros M, Ullevig S, DiGiovanni J, et al. Higher baseline dietary fat and fatty acid intake is associated with increased risk of incident prostate cancer in the SABOR study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018.
46. Culig Z. Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer. *J Cell Physiol.* 2016;231(2):270-4.
47. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 2002;23(2):175-200.
48. Wang L, Hsu CL, Chang C. Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate.* 2005;63(2):117-30.
49. Shiota M, Yokomizo A, Fujimoto N, Naito S. Androgen receptor cofactors in prostate cancer: potential therapeutic targets of castration-resistant prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(7):870-81.
50. Oñate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1995;270(5240):1354-7.
51. Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen CS, Chin WW. TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem.* 1997;272(44):27629-34.
52. Li H, Gomes PJ, Chen JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8479-84.
53. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, et al. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 1997;389(6647):194-8.

54. Gregory CW HB, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS et al. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Research*; 2001. p. 1;61(11):4315-9.
55. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):34-45.
56. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66.
57. Gong AY, Eischeid AN, Xiao J, Zhao J, Chen D, Wang ZY, et al. miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 2012;12:492.
58. Eedunuri VK, Rajapakshe K, Fiskus W, Geng C, Chew SA, Foley C, et al. miR-137 Targets p160 Steroid Receptor Coactivators SRC1, SRC2, and SRC3 and Inhibits Cell Proliferation. *Mol Endocrinol*. 2015;29(8):1170-83.
59. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
60. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
61. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
62. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005;123(4):621-9.
63. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:287-314.
64. Nilsson EM, Laursen KB, Whitchurch J, McWilliam A, Ødum N, Persson JL, et al. MiR137 is an androgen regulated repressor of an extended network of transcriptional coregulators. *Oncotarget*. 2015;6(34):35710-25.
65. Miyamoto H, Rahman MM, Chang C. Molecular basis for the antiandrogen withdrawal syndrome. *J Cell Biochem*. 2004;91(1):3-12.
66. Yoon HG, Wong J. The corepressors silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor are involved in agonist- and antagonist-regulated transcription by androgen receptor. *Mol Endocrinol*. 2006;20(5):1048-60.
67. Pimenta R, Camargo JA, Candido P, Ghazarian V, Gonçalves GL, Guimarães VR, et al. Cholesterol Triggers Nuclear Co-Association of Androgen Receptor, p160 Steroid Coactivators, and p300/CBP-Associated Factor Leading to Androgenic Axis Transactivation in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2022;56(S4):1-15.
68. Civenni G. Targeting Promoter-Associated Noncoding RNA In Vivo. *Methods Mol Biol*. 2017;1543:259-70.
69. Alfaqih MA, Allott EH, Hamilton RJ, Freeman MR, Freedland SJ. The current evidence on statin use and prostate cancer prevention: are we there yet? *Nat Rev Urol*. 2017;14(2):107-19.
70. Jamnagerwalla J, Howard LE, Allott EH, Vidal AC, Moreira DM, Castro-Santamaria R, et al. Serum cholesterol and risk of high-grade prostate cancer: results from the REDUCE study. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2018;21(2):252-9.
71. Rane JK, Scaravilli M, Ylipää A, Pellacani D, Mann VM, Simms MS, et al. MicroRNA expression profile of primary prostate cancer stem cells as a source of biomarkers and therapeutic targets. *Eur Urol*. 2015;67(1):7-10.

72. Awad AB, Fink CS, Williams H, Kim U. In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev.* 2001;10(6):507-13.
73. Ifere GO, Barr E, Equan A, Gordon K, Singh UP, Chaudhary J, et al. Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 2009;32(4):319-28.
74. Zhou G, Hashimoto Y, Kwak I, Tsai SY, Tsai MJ. Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7742-55.
75. Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science.* 1998;279(5358):1922-5.
76. Agoulnik IU, Vaid A, Bingman WE, Erdeme H, Frolov A, Smith CL, et al. Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res.* 2005;65(17):7959-67.
77. Tien JC, Zhou S, Xu J. The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. *Int J Biol Sci.* 2009;5(3):256-64.
78. Dasgupta S, Lonard DM, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annu Rev Med.* 2014;65:279-92.
79. Dasgupta S, Putluri N, Long W, Zhang B, Wang J, Kaushik AK, et al. Coactivator SRC-2-dependent metabolic reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *J Clin Invest.* 2015;125(3):1174-88.
80. Tien JC, Liu Z, Liao L, Wang F, Xu Y, Wu YL, et al. The steroid receptor coactivator-3 is required for the development of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2013;73(13):3997-4008.
81. Louet JF, Coste A, Amazit L, Tannour-Louet M, Wu RC, Tsai SY, et al. Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(47):17868-73.
82. Zhou HJ, Yan J, Luo W, Ayala G, Lin SH, Erdem H, et al. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res.* 2005;65(17):7976-83.
83. Foley C, Mitsiades N. Moving Beyond the Androgen Receptor (AR): Targeting AR-Interacting Proteins to Treat Prostate Cancer. *Horm Cancer.* 2016;7(2):84-103.
84. Stashi E, York B, O'Malley BW. Steroid receptor coactivators: servants and masters for control of systems metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(7):337-47.
85. Bhattarai A, Likos EM, Weyman CM, Shukla GC. Regulation of cholesterol biosynthesis and lipid metabolism: A microRNA management perspective. *Steroids.* 2021;173:108878.

## **APÊNDICES**

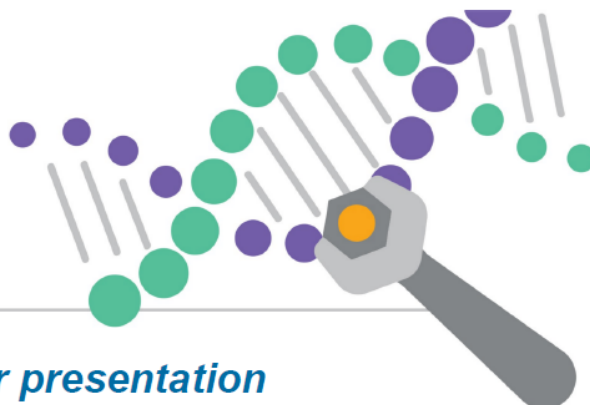
2019

# GENÉTICA 2019

17 a 20 de setembro de 2019  
Hotel Monte Real Resort - Águas de Lindóia - SP

65<sup>th</sup> Brazilian  
Congress of  
Genetics

## CERTIFICADO



### Certificate of poster presentation

This hereby certifies that

**RUAN CÉSAR APARECIDO PIMENTA**

presented the poster:

**MIR 17-5P AND MIR137 MAY BE ASSOCIATED WITH ANDROGEN RECEPTOR REACTIVATION IN CASTRATION RESISTANT PROSTATE CANCER**

Autores: Pimenta, R ; Ghazarian, V. ; Romão, P ; Camargo, J.A. ; Guimarães, V. R. ; Viana, N.I. ; Arantes, G. ; Silva, I. A. ; Leite, K.R.M. ; Srougi, M. ; Reis, S.T.  
during the

**Genética 2019,  
in Hotel Monte Real Resort, Águas de Lindóia, SP**

  
Márcio de Castro Silva Filho  
Presidente da SBG

 **SOCIEDADE  
BRASILEIRA  
DE GENÉTICA**

  
Antonio Mateo Solé Cava  
Primeiro Secretário da SBG

2020

# XI CONGRESSO INTERNACIONAL DE UROONCOLOGIA

## CERTIFICADO CERTIFICATE

Certificamos que o trabalho científico  
na modalidade **Pôster**,

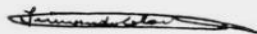
intitulado **LIPID PROFILE ASSOCIATED WITH SRC-3 AND CBP/P300 EXPRESSION IN CASTRATION-RESISTANT PROSTATE  
CANCER ANIMAL MODEL**

dos autores **Ruan Pimenta, Juliana A Camargo, Nayara I Viana, Vanessa R Guimarães, Poliana R Silva, Guilherme L Gonçalves,  
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.

Comissão Organizadora



FERNANDO MALUF



ANTONIO CARLOS DE LIMA POMPEO

Apoio Institucional



A Beneficência  
Portuguesa  
de São Paulo



ALBERT EINSTEIN  
SOCIEDADE BENEFICENTE BRASILEIRA

Apoio



SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA

Gerenciamento e Produção



RV+

2021



# CERTIFICADO CERTIFICATE

Certificamos que o trabalho científico  
na modalidade Apresentação Oral (Pódium),  
intitulado **NOVOS CONHECIMENTOS SOBRE CANCER DE PROSTATA  
RESISTENTE A CASTRAÇÃO: POTENCIAL ENVOLVIMENTO DE MUDANÇAS  
MEDIADAS PELO COLESTEROL NA EXPRESSAO DOS COFATORES DO AR**  
dos autores **RUAN PIMENTA, JULIANA ALVES CAMARGO, PATRÍCIA  
CANDIDO, VITORIA GHAZARIAN, GUILHERME L GONÇALVES, CAROLINE  
CHIOVATTO, MIGUEL SROUGI, KATIA RAMOS MOREIRA LEITE, NAYARA I  
VIANA, SABRINA T REIS**  
foi submetido e aprovado no **XXXVIII Congresso Brasileiro de Urologia**,  
realizado no período de 12 a 15 de dezembro de 2021.



**Antonio Carlos Lima Pompeo**  
Presidente da SBU



**Lucas Mendes Rogério**  
Presidente da Comissão Científica

Brasília, 15 de dezembro de 2021.

INICIATIVA E REALIZAÇÃO



INICIATIVA BRASILEIRA DE UROLOGIA

GERENCIAMENTO E PRODUÇÃO



Para verificar a autenticidade deste certificado, basta acessar o link  
a seguir [validacertificados.iweventos.com.br](http://validacertificados.iweventos.com.br) e usar o código: d92c1e104c

2022

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho

**DIETA RICA EM COLESTEROL PROMOVE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE COATIVADORES DO AR EM MODELO IN VITRO E IN VIVO DE CÂNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE À CASTRAÇÃO**

foi apresentado no formato Pôster durante o 33º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA E 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOPATOLOGIA, realizado no período de 03 a 06 de agosto de 2022 na cidade de FOZ DO IGUAÇU.

Autores:

RUAN PIMENTA , JULIANA ALVES DE CAMARGO , PATRÍCIA RODRIGUES CANDIDO , VITÓRIA GHAZARIAN NUNES , GUILHERME LOPES GONÇALVES , VANESSA RIBEIRO GUIMARÃES , POLIANA ROMÃO , CAROLINE CHIOVATTO , GABRIEL A DOS SANTOS , IRAN AMORIM SILVA , MIGUEL SROUGI , WILLIAN NAHAS , KATIA RAMOS MOREIRA LEITE , NAYARA IZABEL VIANA , SABRINA THALITA DOS REIS

FOZ DO IGUAÇU, 06 de agosto de 2022

Katia Ramos Moreira Leite  
 CRM 51442/SP  
 Presidente da Sociedade  
 Brasileira de Patologia

Isabela Werneck da Cunha  
 CRM 102851/SP  
 Vice-Presidente P/ Assuntos  
 Acadêmicos Sociedade Brasileira  
 de Patologia

Mauro Tadeu Ajaj Saieg  
 CRM 105333/SP  
 Presidente Sociedade Brasileira  
 de Citopatologia

Regina de Paula Xavier Gomes  
 CRM 15071/PR  
 Presidente do 33º Congresso  
 Brasileiro de Patologia

Luiz Martins Collaço  
 CRM 8402/PR  
 Presidente do 26º Congresso  
 Brasileiro de Citopatologia





## Cholesterol Triggers Nuclear Co-Association of Androgen Receptor, p160 Steroid Coactivators, and p300/CBP-Associated Factor Leading to Androgenic Axis Transactivation in Castration-Resistant Prostate Cancer

Ruan Pimenta<sup>ab</sup> Juliana A. Camargo<sup>a</sup> Patrícia Candido<sup>a</sup> Vitória Ghazarian<sup>a</sup>  
Guilherme L. Gonçalves<sup>c</sup> Vanessa R. Guimarães<sup>a</sup> Poliana Romão<sup>a</sup>  
Caroline Chiovatto<sup>ad</sup> Carolina M. Mioshi<sup>ae</sup> Gabriel A. dos Santos<sup>ab</sup>  
Iran A. Silva<sup>a</sup> Alexander Birbrair<sup>gh</sup> Miguel Srougi<sup>ab</sup> William C. Nahas<sup>i</sup>  
Kátia R. Leite<sup>a</sup> Nayara I. Viana<sup>aj</sup> Sabrina T. Reis<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>b</sup>Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino, São Paulo, Brazil, <sup>c</sup>Laboratory of Renal Physiology, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>d</sup>Centro Universitário São Camilo, São Paulo, Brazil, <sup>e</sup>Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil, <sup>f</sup>Department of Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>g</sup>Department of Dermatology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA, <sup>h</sup>Department of Radiology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA, <sup>i</sup>Uro-Oncology Group, Urology Department, University of São Paulo Medical School and Institute of Cancer Estate of São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil, <sup>j</sup>Universidade do Estado de Minas Gerais - UEMG, Passos, Brazil

### Key Words

Prostate cancer • Hypercholesterolemic model • p160

### Abstract

**Background/Aims:** Cholesterol modulates intratumoral androgenic signaling in prostate cancer; however, the molecular mechanisms underlying these changes in castration-resistant prostate cancer (CRPC) are not fully elucidated. Herein, we investigated the effect of cholesterol on androgen receptor (AR) coactivators expression and tumorigenesis *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Herein, we monitored the expression of AR coactivators (SRC-1, 2, 3 and PCAF) genes in PC-3 cells exposed to 2µg/mL of cholesterol for 8 hours by qPCR. We also performed



## Article

# Intratumoral Restoration of miR-137 Plus Cholesterol Favors Homeostasis of the miR-137/Coactivator p160/AR Axis and Negatively Modulates Tumor Progression in Advanced Prostate Cancer

Ruan Pimenta <sup>1,2,\*</sup>, Carolina Mie Mioshi <sup>1,3</sup>, Guilherme L. Gonçalves <sup>4</sup>, Patrícia Candido <sup>1</sup>, Juliana A. Camargo <sup>1</sup>, Vanessa R. Guimarães <sup>1</sup>, Caroline Chiovatto <sup>1,5</sup>, Vitória Ghazarian <sup>1</sup>, Poliana Romão <sup>1</sup>, Karina Serafim da Silva <sup>1,5</sup>, Gabriel A. dos Santos <sup>1</sup>, Iran A. Silva <sup>1</sup>, Miguel Srougi <sup>1,2</sup>, William C. Nahas <sup>6</sup>, Kátia R. Leite <sup>1</sup>, Nayara I. Viana <sup>1,7</sup> and Sabrina T. Reis <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 01246903, SP, Brazil; carolmie96@gmail.com (C.M.M.); patriciacandido11@gmail.com (P.C.); ju.alvcam@gmail.com (J.A.C.); vanessarguima@hotmail.com (V.R.G.); carolinechiovatto@gmail.com (C.C.); vitoriaghaz@gmail.com (V.G.); romaosilva.poliana@gmail.com (P.R.); karinasilva.09@outlook.com (K.S.d.S.); arantes\_gabriel@hotmail.com (G.A.d.S.); iransilva@gmail.com (I.A.S.); srougi@strougi.com.br (M.S.); katiaramos@usp.br (K.R.L.); niviana@usp.br (N.I.V.); sabrinareis@usp.br (S.T.R.)
- <sup>2</sup> D'Or Institute for Research and Education (ID'Or), São Paulo 04501000, SP, Brazil
- <sup>3</sup> Campus Santo André, Universidade Federal do ABC, Santo André 09210580, SP, Brazil
- <sup>4</sup> Laboratory of Renal Physiology, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508000, SP, Brazil; ggoncalves@usp.br
- <sup>5</sup> Campus Ipiranga, Centro Universitário São Camilo, São Paulo 04263200, SP, Brazil
- <sup>6</sup> Uro-Oncology Group, Urology Department, Institute of Cancer Estate of São Paulo (ICESP), São Paulo 01246000, SP, Brazil; william.nahas@hc.fm.usp.br
- <sup>7</sup> Campus Passos, Universidade do Estado de Minas Gerais—UEMG, Passos 37900106, MG, Brazil
- \* Correspondence: Ruan.pimenta@usp.br; Tel.: +55-113061-7183



**Citation:** Pimenta, R.; Mioshi, C.M.; Gonçalves, G.L.; Candido, P.; Camargo, J.A.; Guimarães, V.R.; Chiovatto, C.; Ghazarian, V.; Romão, P.; da Silva, K.S.; et al. Intratumoral Restoration of miR-137 Plus Cholesterol Favors Homeostasis of the miR-137/Coactivator p160/AR Axis and Negatively Modulates Tumor Progression in Advanced Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9633. <https://doi.org/10.3390/ijms24119633>

Academic Editor: Olga Sukocheva

Received: 11 April 2023

Revised: 18 May 2023

Accepted: 21 May 2023

Published: 1 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) have gained a prominent role as biomarkers in prostate cancer (PCa). Our study aimed to evaluate the potential suppressive effect of miR-137 in a model of advanced PCa with and without diet-induced hypercholesterolemia. In vitro, PC-3 cells were treated with 50 pmol of mimic miR-137 for 24 h, and gene and protein expression levels of SRC-1, SRC-2, SRC-3, and AR were evaluated by qPCR and immunofluorescence. We also assessed migration rate, invasion, colony-forming ability, and flow cytometry assays (apoptosis and cell cycle) after 24 h of miRNA treatment. For in vivo experiments, 16 male NOD/SCID mice were used to evaluate the effect of restoring miR-137 expression together with cholesterol. The animals were fed a standard (SD) or hypercholesterolemic (HCOL) diet for 21 days. After this, we xenografted PC-3 LUC-MC6 cells into their subcutaneous tissue. Tumor volume and bioluminescence intensity were measured weekly. After the tumors reached 50 mm<sup>3</sup>, we started intratumoral treatments with a miR-137 mimic, at a dose of 6 µg weekly for four weeks. Ultimately, the animals were killed, and the xenografts were resected and analyzed for gene and protein expression. The animals' serum was collected to evaluate the lipid profile. The in vitro results showed that miR-137 could inhibit the transcription and translation of the p160 family, SRC-1, SRC-2, and SRC-3, and indirectly reduce the expression of AR. After these analyses, it was determined that increased miR-137 inhibits cell migration and invasion and impacts reduced proliferation and increased apoptosis rates. The in vivo results demonstrated that tumor growth was arrested after the intratumoral restoration of miR-137, and proliferation levels were reduced in the SD and HCOL groups. Interestingly, the tumor growth retention response was more significant in the HCOL group. We conclude that miR-137 is a potential therapeutic miRNA that, in association with androgen precursors, can restore and reinstate the AR-mediated axis of transcription and transactivation of androgenic pathway homeostasis. Further studies involving the miR-137/coregulator/AR/cholesterol axis should be conducted to evaluate this miR in a clinical context.

## View Letter

[Close](#)

**Date:** 26 Jun 2023  
**To:** "Ruan Pimenta" ruanpimenta22@gmail.com  
**From:** "Molecular Biology Reports (MOLE)" ranjith.ayyapan@springer.com  
**Subject:** Decision on your manuscript #MOLE-D-23-01655R1

Dear Dr Pimenta:

I am pleased to inform you that your manuscript, "Overexpression of miR-17-5p may negatively impact p300/CBP factor-associated inflammation in a hypercholesterolemic advanced prostate cancer model" has been accepted for publication in Molecular Biology Reports.

Your article will now be handed over to the production department and typeset within the next three to four weeks. Then you will receive the proofs for correction.

When you receive the proofs for your article, please correspond with your co-authors to check very carefully that all names and affiliations are correct, as these cannot be corrected once the article is published.

Please remember to always include your manuscript number, #MOLE-D-23-01655R1, whenever inquiring about your manuscript.

Thank you.

Sincerely yours,  
Nikos K. Karamanos, PhD  
Editor-in-Chief  
Molecular Biology Reports

COMMENTS TO THE AUTHOR: