

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/08/2022.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Carolina Fazio Campos

**Validação Funcional de genes-alvo de microRNAs
em carcinoma hepatocelular.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Drigo Linde

**Botucatu
2020**

Carolina Fazio Campos

Validação funcional de genes-alvo de microRNAs em
carcinoma hepatocelular.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestra em Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis
Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Drigo Linde

Botucatu
2020

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Campos, Carolina Fazio.

Validação funcional de genes-alvo de microRNAs em carcinoma hepatocelular / Carolina Fazio Campos. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Coorientador: Sandra Drigo Linde

Capes: 40100006

1. Carcinoma hepatocelular. 2. MicroRNAs. 3. Câncer.
4. Genes. 5. Estudo de validação.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular; Genes-alvo; Validação funcional; miR-451a; microRNAs.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Patrizia e Ademar, e a minha irmã Juliana, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões e por sempre acreditam que sou capaz de realizar meus sonhos.

Serei eternamente grata por me fazerem quem eu sou hoje e me permitirem chegar até aqui!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por permitir que tudo isso acontecesse e por sempre trazer pessoas tão especiais ao meu lado para fazer com que essa jornada seja mais leve e especial.

A todos do **LABORATÓRIO NEOGENE** (Ana Laura, Iael, Márcio, Mariana, Natália, Tainara e Vanessa, Professoras Patricia e Sandra), sem o apoio de cada um de vocês em cada experimento, dúvidas, angústias profissionais e pessoais, nada disso seria possível. Vou guardar cada um de vocês sempre.

Professora Patricia, meu eterno obrigada por todos os ensinamentos, tanto na área profissional como pessoal. Você é uma profissional maravilhosa, a qual eu tenho muito orgulho de poder falar que é minha orientadora. Além disso, tem um coração enorme e sempre está cuidando de todas as suas “filhas” e nos orientando sobre como resolver os problemas da vida, sempre da melhor maneira possível.

Professora Sandra, obrigada por todos os conselhos e orientações sempre. Você sempre acrescenta muito em nossas discussões.

Ana Laura, você se tornou para mim uma amiga mais que especial. Com certeza um presente que Deus colocou na minha vida para nos apoiarmos e dividirmos tantos momentos maravilhosos juntos. Obrigada por tudo sempre e quero levar isso para o resto da vida.

Tainara, minha mãe como gostamos de brincar! Obrigada por todos os ensinamentos e momentos juntas, tentando aprender a melhor forma de fazermos os experimentos, resolver nossos problemas, dividir marmitas e comprar doces. Espero que nossa parceria no trabalho e na vida sempre continue.

Natália, com certeza umas das pessoas mais finas, elegantes e educadas que já conheci na vida. Obrigada por me ensinar tanto, me mostrar quando eu estava errando e me ajudar a achar o melhor caminho para resolver. Você é uma pessoa maravilhosa, um ajinho que Deus colocou na minha vida para me guiar e mostrar tantas coisas do mundo.

Márcio, muito obrigada por ter me ensinado tanto e ter tanta paciência com cada uma de nós no laboratório. Suas orientações foram essenciais para que as coisas dessem certo.

Minha família (Ademar, Patrícia e Juliana), vocês são a base de tudo que sou hoje e de que vou me transformar um dia. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por sempre estarem aqui e torcerem por mim em cada momento. Por me apoiarem nos momentos felizes e principalmente nos difíceis, amo vocês.

Mãe, você é a pessoa mais especial da minha vida. Apreendi com você tudo que me tornei hoje. Uma pessoa que me mostrou como ser doce e amável, mas ao mesmo tempo sempre tentando ser justa e fazer o correto. Você sempre será à base da minha vida e o meu ponto de paz.

Juliana, obrigada por sempre cuidar de mim, torcer pelas minhas vitórias e me apoiar nos momentos difíceis. Você é meu porto seguro, e é maravilhoso saber que sempre terei você para recorrer para tudo.

Marjorie, obrigada por estar comigo literalmente desde o dia que eu nasci até agora. Você é uma irmã para mim, e é muito bom poder compartilhar minha vida com você. Você trouxe a Grazi e a Bea para a minha vida que são grandes presentes para mim, e tenha certeza que sempre farei o possível para cuidar delas e ajudar no que for possível.

Obrigada a toda a **minha família** (Vó Nena, Fernanda, Marcel, Caio, Leonardo, Marielle, Márcia, Sérgio, Rui, Vando, Norma) por sempre me apoiar e fazer eu me tornar quem eu sou hoje. Aos que já se foram (Nona, Maristela), que eu sei que estão mesmo que de longe, cuidando de mim.

Aos meus todos os meus amigos de São Paulo (**Carlinhos, Lucas, Maria Eduarda, Stephanie e Victor**), os quais eu conheci na época da escola e até hoje estão comigo, passando tantos momentos especiais, dividindo alegrias, conquistas e dificuldades. Cada um de vocês é muito especial para mim, e foram essências para eu me tornar a pessoa que sou hoje.

Minhas amigas da graduação (**Alessandra, Aline, Ana Carolina, Isabela, Júlia, Juliana, Natália, Virgínia**), vocês tornaram Botucatu uma segunda casa para mim. Sem cada uma de vocês, eu não conseguiria ter chegado até aqui. Compartilharmos inseguranças de morar fora, os primeiros problemas sérios a serem resolvidos sozinhos, ficar doente longe de casa e dos pais. Ao mesmo tempo compartilhamos tantos momentos inesquecíveis juntas, festas, conversas inacabáveis, cachoeiras, jantares, aniversários, e o simples fato de estarmos perto. Obrigada por tudo, vocês sempre serão minha segunda família.

Isabela, você é um presente de Deus na minha vida. Desde o primeiro dia da faculdade, eu sabia que você entraria na minha vida para ficar. Obrigada por cada conselho, cada momento de riso, choro, brincadeira e de resolver os problemas mais difíceis da vida. Tenho muito orgulho de poder te chamar de melhor amiga e de saber que sempre teremos uma a outra para viver os momentos mais especiais e difíceis da vida. É um dos sentimentos mais lindos da vida, saber que alguém sempre estará lá para te apoiar, torcer pela sua felicidade, e ter orgulho de você.

Sara, mesmo em tão pouco tempo você se tornou uma pessoa muito especial na minha vida. Obrigada por toda a paciência, carinho e atenção sempre. Poder morar com você foi uma experiência maravilhosa de troca e companheirismo.

A todos os **colaboradores** que tornaram a execução desse projeto possível. Ao **Diego Alonso**, obrigada por toda a paciência e apoio sempre, tanto na vida pessoal quanto profissional. **Thiago Medina e Fábio Marchi**, muito obrigado por me acolherem no AC Camargo e me orientarem com todas as análises de Bioinformática. Professor Robson, Paula e Professor Carlos Eduardo, obrigado por todos os conselhos e ajuda em todo esse período.

Professor Luís Mur e todo seu laboratório, muito obrigada por terem me acolhido por três meses na Universidade de Aberystwyth. Esse período de intercâmbio foi a realização de diversos sonhos, e serei externamente grata por cada um que me ajudou e esteve comigo nesse período. Tive a oportunidade de conhecer diversos costumes e crenças e ver o mundo de outra forma.

Denisa, Larissa, Tainá, minhas amigas mais próximas no período de intercâmbio. Mesmo

em tão pouco tempo vocês se tornaram pessoas mais que especiais para mim. Se tornarem grandes amigas que eu levarei para a vida inteira. Obrigada por toda a ajuda e por tornarem esses três meses os melhores da minha vida.

Obrigada a toda a **Equipe da UNIPLEX** (Paulinha, Vick, Pessoal da limpeza e manutenção, Secretária) sem cada um de vocês, não seria possível que cada projeto fosse realizado.

Márcia, secretária da pós-graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, obrigado por toda a ajuda sempre.

Aos **membros da banca** de qualificação (Professor Carlos Eduardo Fonseca Alves e Professora Adriana Camargo Ferrasi) e defesa (Professoras Debora Damasceno e Márcia Chiquitelli Marques Silveira), obrigada por todas as sugestões e conselhos para a dissertação e os artigos.

Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001: Bolsa de mestrado no período de 01/03/2018 até 30/04/2019; **FAPESP**: Bolsa de mestrado: **#2018/06354-2** (01/05/2019 até 31/07/2020); Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior-BEPE: **#2019/17003-9**; Auxílio financeiro: **#2016-03905-2**.

RESUMO

Introdução: miRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas que regulam a expressão gênica associada a diversos mecanismos biológicos. Os miRNAs têm sido indicados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma hepatocelular (CHC). CHC é a quarta causa mais comum de morte por câncer e é frequentemente associado com mau prognóstico, agressividade, resistente a medicamentos e diagnóstico avançado. **Objetivo:** Identificar e validar experimentalmente a interação entre miRNA/genes-alvo relacionados com o processo de tumorigênese do CHC e contribuir para a identificação de vias moleculares relevantes para o desenvolvimento tumoral. Além disso, verificar o efeito da alteração da expressão do miRNA escolhido sobre o potencial de proliferação, migração e invasão celular nas linhagens de CHC. **Material e Métodos:** A seleção do miRNA foi feita a partir de dados anteriores do grupo e análises de bioinformática. A identificação dos genes-alvo foi realizada por meio de ferramentas de predição computacional (mirDIP e miRTarBase). As linhagens celulares de câncer de CHC (Hep 3B e PCL/PRF/5) foram transfectadas com o mimético do miRNA selecionado, ou o seu controle negativo, a fim de avaliarmos a expressão dos genes-alvo (RT-qPCR). Após a transfecção, foi avaliado o potencial de proliferação celular (MTS), migração (*wound healing*) e invasão (ensaio *transwell*) das linhagens. Ensaio da Luciferase foi utilizado para confirmar a ligação do miRNA ao gene-alvo. **Resultados:** O miR-451a foi selecionado para a validação funcional por apresentar consistentemente diminuição de expressão em CHC de três bancos de dados (tumores primários de pacientes, meta-análise e TCGA). Análise *in silico* revelou 12 possíveis genes candidatos regulados pelo miR-451a relevantes na tumorigênese e ainda não validados experimentalmente: *FMNL3*, *BUB1B*, *SPC25*, *KIF2A*, *PLEKHG2*, *BAK1*, *HMGB2*, *MEF2D*, *CDKN2B*, *HELLS*, *RRAGD*, *CSE1L*. Nas duas linhagens celulares, o aumento da expressão do miR-451a após transfecção com miRNA mimético resultou na diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão do gene *SPC25*. O ensaio de luciferase demonstrou a ligação do microRNA ao gene *SPC2*, confirmando que o gene *SPC25* é alvo direto do miR-451a. Além disso, a restauração da expressão do miR-451a levou à diminuição de proliferação, migração e invasão nas linhagens celulares Hep 3B e PCL/PRF/5. **Conclusão:** O gene *SPC25* foi identificado como um novo alvo do miR-451a e associado a CHC. Além disso, nossos achados indicam que o miR-451a está relacionado à tumorigênese e progressão do CHC, sendo sugerido como um potencial alvo para a terapia do CHC.

Palavras chave: carcinoma hepatocelular; microRNAs; miR-451a; genes-alvo; vias moleculares; linhagens tumorais; validação funcional.

ABSTRACT

Introduction: MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate the expression of genes associated with several biological mechanisms. miRNAs have been indicated as potential biomarkers for the diagnosis, prognosis and treatment of several types of cancer, including hepatocellular carcinoma (HCC). HCC is the fourth most common cause of cancer death and is often associated with poor prognosis, aggression, drug resistance and advanced diagnosis. **Aim:** To identify and experimentally validate the interaction between miRNA/target genes related to the HCC tumorigenesis process and contribute to the identification of molecular pathways relevant to tumor development. In addition, to verify the effect of changing the expression of the chosen miRNA in the cell proliferation, migration and invasion of the liver cancer cell lines. **Material and Methods:** The selection of miRNA was performed based on the analysis of previous data of our group and bioinformatic analyses. The identification of the target genes was performed using computational prediction tools (mirDIP and miRTarBase). The HCC cell lines (Hep 3B and PCL/PRF/5) were transfected with the selected miRNA mimic or negative control, in order to evaluate the expression of target genes (RT-qPCR). After transfection, the potential of cell proliferation (MTS), migration (wound healing) and invasion (transwell assay) of the cell lines was evaluated. Luciferase assay was used to confirm miRNA binding to the target gene. **Results:** miR-451a was selected for functional validation by being consistently detected as underexpressed in HCC from three databases (primary patient tumors, meta-analysis and TCGA). *In silico* analysis revealed 12 putative candidate genes regulated by miR-451a, relevant in HCC tumorigenesis and not yet experimentally validated: *FMNL3*, *BUB1B*, *SPC25*, *KIF2A*, *PLEKHG2*, *BAK1*, *HMGB2*, *MEF2D*, *CDKN2B*, *HELLS*, *RRAGD* and *CSE1L*. In both cell lines, the increase in miR-451a expression by transfection of the mimic miRNA resulted in a significant decrease ($p < 0.05$) of *SPC25* gene expression. The luciferase assay demonstrated the binding of the microRNA to the *SPC25* gene, confirming that the *SPC25* gene is a direct target of miR-451a. Furthermore, the restoration of miR-451a expression led to decrease in cell proliferation, migration and invasion of the Hep 3B and PCL/PRF/5 cell lines. **Conclusion:** The *SPC25* gene was identified as a new target of miR-451a. Moreover, our findings indicate that miR-451a is related to HCC tumorigenesis and progression, being suggested as a potential target for HCC therapy.

Keywords: hepatocellular carcinoma; microRNAs; miR-451a; target genes; molecular pathways; tumor cell lines; functional validation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AFP: alfa-fetoproteína
AGO1: Argonauta 1
AGO2: Argonauta 2
ATCC: *American Type Culture Collection*
BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro
BRCs: Centros de Recursos Biológicos
cDNA: DNA complementar
CHC: carcinoma hepatocelular
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DSMZ : *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*
dsRNA - RNA de fita dupla
EMT: transição epitélio mesenquimal
FC: *Fold Change*
FDR: *False Discovery Rate*
IDH: índice de desenvolvimento humano
INCA: Instituto Nacional de Câncer
mirDIP: *microRNA Data Integration Portal*
RNAm: RNA mensageiro
NASH: esteato-hepatite não alcoólica
PBS: Tampão fosfato-salino
PCR: Reação em cadeia da polimerase
RISC: Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNAs: Ácido Ribonucleico
RT: Transcrição reversa
RT-qPCR – Transcrição reversa- Reação de Amplificação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SFB: Soro Fetal Bovino
STR: Repetições consecutivas curtas
TCGA: *The Cancer Genome Atlas*
TERT: Transcriptase reversa da telomerase
TLDA: *TaqMan Array Human MicroRNA Cards*
UTR: Regiões não traduzidas
VHB: vírus da hepatite B
VHC: vírus da hepatite C

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem
~ - Aproximadamente
< - Menor que
> - Maior que
≤ - Menor ou igual a
≥ - Maior ou igual a
°C - Graus Celsius
h - Hora (s)
min - Minuto
s - Segundo
mL - Mililitro
μL - Microlitro
mm - Milímetro
cm - Centímetro
μm - micrómetro
ng - Nanograma
fg - fentograma
mM - milimolar
μM - micromolar
nM - nanomolar
pb - pares de base
- negativo
+ positivo
X - Vezes
/ - Dividido
Log - logaritmo
R² - coeficiente de determinação
RPM: rotação por minuto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do processo de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Imagem produzida utilizando o programa Biorender 2019 (https://biorender.com/).....	4
Figura 2. Esquema representativo da regulação da expressão gênica por meio da ligação do miRNA com o RNAm.	7
Figura 3. Desenho experimental do estudo. Linhagens celulares de câncer de fígado (HEPG2, Hep 3B e PCL/PRF/5).	12
Figura 4. Esquema mostrando ensaio de quantificação de miRNA por stem-loop RT-qPCR. A) O primer Stem-loop RT se ligam a região 3' da molécula de miRNA, iniciando a transcrição reversa do miRNA. Em seguida, o produto da RT é amplificado usando um primer forward específico para miRNA e o primer <i>universal reverse</i> . B) Ensaio utilizando o kit <i>SYBR Green PCR Master Mix</i> . Adaptada de Varkonyi-gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). <i>Protocol : a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs</i> . <i>Plant Methods</i> , 12, 1–12. https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12	22
Figura 5. Diagrama de Venn com os microRNAs encontrados em mais de uma fonte de dado.....	30
Figura 6. Morfologia das linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5) em baixa e alta confluência celular.	31
Figura 7. Viabilidade celular das linhagens HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5, por Teste de Exclusão por Azul de Tripan. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem conforme a seguinte formula: viabilidade celular (%) = número de células vivas x 100/ número de células totais (células vivas e mortas).....	32
Figura 8. Resultado do Teste de Micoplasma, visualizado em gel de agarose 1,5%, utilizando o Kit Venor™ GeM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O controle interno de amplificação (191pb) é detectado em todas as reações (seta em vermelho). A ausência da banda em 270pb indica ausência de contaminação. <i>Ladder</i> de 100pb; Controle Negativo (C-) e Controle Positivo (C+).	32
Figura 9. Exemplo representativo de dados de sequenciamento obtidos do GeneMarker para o marcador D7S820. Painel superior é a amostra de controle positivo com picos contendo 8 e 11 repetições. O segundo painel mostra 10 e 10 repetições do mesmo marcador na linhagem celular HEP G2, o terceiro painel mostra 8 e 10 repetições na linhagem celular Hep 3B e o quarto painel mostra 9 e 11 repetições na linha celular PCL/PRF/5.	33
Figura 10. Resultados de autenticação das linhagens celulares para todos os marcadores testados, mostrando que duas linhagens (HEP G2 e Hep 3B) têm 100% de correspondência com os perfis de DNA STR depositados nas bases de dados ATCC e DSMZ e a linhagem possui 89% de correspondência. O número de repetições, para cada marcador é mostrado nos painéis correspondentes.	35

Figura 11. Curva de Crescimento das células HEP G2 (A), Hep 3B (B) e PCL/PRF/5 (C), expressa em porcentagem de confluência da monocamada (porcentagem de área ocupada pela monocamada em relação à área da superfície livre total do poço de 1,9 cm² da placa de cultura), nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após o plaqueamento. 36

Figura 12. Análise da expressão do miR-451a por RT-qPCR, 24 e 48h após transfecção da molécula de miR-451a mimic. (A) HEP G2; (B) Hep 3B; (C) PCL/PRF/5. Todas as amostras foram normalizadas com o controle endógeno U6. Os dados estão representados em Log₁₀. Os dados estão representados por quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). 38

Figura 13. Análise da expressão do genes-alvo do miR-451a por RT-qPCR, 24h após transfecção da molécula de miR-451a mimic quando comparado ao controle. (A) *SPC25* (B) *MEF2D*. Todas as amostras foram normalizadas com o controle endógeno *B2M*. Os dados estão representados por quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *P < 0.05; **P < 0.01. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. miRNAs com expressão significativamente ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) alterada em CHC (18 amostras de CHC comparadas com tecidos hepáticos normais pareados dos mesmos pacientes). 13

Tabela 2. Descrição dos 8 estudos usados na meta-análise. 14

Tabela 3. Sequência de primers para a região 3'UTR da *SPC25*, com sítios de restrição enzimática sublinhados. 26

Tabela 4. Perfil das linhagens celulares de CHC utilizadas nesse estudo, mostrando o número de repetições de STR detectado no genoma de cada linhagem. 34

Tabela 5. Primers utilizados no ensaio de RT-qPCR do miR-451a. 37

Tabela 6. Sequência e concentração dos *primers* (*Foward* e *Reverse*) dos genes-alvo do miRNA avaliados. 39

Tabela 7. Sequência e concentração dos *primers* (*Foward* e *Reverse*) dos endógenos. 39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características das linhagens celulares de câncer de fígado. 17

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Desenvolvimento da Doença	3
1.2. Biomarcador e tratamento da doença	4
1.3. Alterações genéticas no CHC	5
1.4. MicroRNAs como reguladores da expressão gênica.....	6
1.5. microRNAs em CHC.....	8
1.6. Validação funcional de miRNAs	9
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Declaração de Ética	12
4.2. Delineamento Experimental e Resultados	12
4.3. Métodos de Análise Computacional.....	12
4.4. Linhagens Celulares	16
4.5. Expansão das Linhagens Celulares.....	17
4.6. Viabilidade Celular por Teste de Exclusão por Azul de Tripán.....	17
4.7. Teste de Micoplasma.....	18
4.8. Autenticação das linhagens celulares.....	18
4.9. Curva de Crescimento Celular	20
4.10. Transfecção Celular	20
4.11. Extração de RNA	21
4.12. Análise da expressão do miRNA por (RT-QPCR)	21
4.13. Análise da expressão gênica (RT-qPCR)	23
4.14. Ensaio de Proliferação – MTS	24
4.15. Ensaio de Migração – Wound Healing.....	24
4.16. Ensaio de invasão celular – Transwell	25
4.17. Ensaio de Luciferase	26
4.18. Análise estatística dos dados	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Escolha do miR-451a para validação funcional	30
5.2. A análise morfológica das linhagens celulares HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5 mostrou que as células estavam viáveis.....	30
5.3. Teste de Exclusão por Azul de Tripán demonstrou que as linhagens celulares possuem viabilidade celular acima de 90%.	31
5.4. Teste de contaminação por <i>Mycoplasma</i> confirmou ausência de contaminação.	32
5.5. A análise de <i>Short Tandem Repeats (STR)</i> confirmou a autenticidade das linhagens celulares.....	33
5.6. Curva de Crescimento Celular	35
5.7. Confirmação da transfecção do mimic do miR-451a.....	36
5.8. Análise da expressão dos genes-alvo.	38
5.9. Linhagem HEP G2.....	40
6. REFERÊNCIAS.....	41
Anexo 1. Manuscrito: “MiR-451a regulates spindle pole body component 25 expression and inhibits proliferation, migration and invasion in HCC cell lines.”	46

OBJETIVOS ALCANÇADOS E CONCLUSÃO.....	95
CAPÍTULO II.....	96
<i>Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior-BEPE (FAPESP 2019/17003-9).....</i>	96
<i>Anexo 2. Manuscrito: “Restoration of miR-451a expression leads to calcitriol accumulation in the PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cell line.”.....</i>	97
OBJETIVOS ALCANÇADOS E CONCLUSÃO.....	120

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da GLOBOCAN de 2018, exceto pelos tumores de pele não melanoma, o câncer de fígado é a quarta causa mais comum de morte por câncer e o sexto tipo de câncer mais frequente, com aproximadamente 782 mil óbitos a cada ano e 841 mil novos casos. Sua incidência é significativamente maior no sexo masculino, sendo o quinto câncer mais comum em homens (596.600 casos) e o nono em mulheres (244.500 casos). Além disso, o câncer de fígado é a segunda maior causa de morte por câncer no sexo masculino e o sexto no sexo feminino (1). A taxa de sobrevivência relativa em cinco anos para pacientes com câncer de fígado avançado é de 18%, e para pacientes diagnosticados em estágio localizado da doença, é de 31% (2). Sua prevalência é mais elevada nos países com menor índice de desenvolvimento humano (IDH), concentrados principalmente na África Setentrional e Ocidental (Egito, Gâmbia, Guiné) e a Ásia Oriental e do Sudeste (Mongólia, Camboja e Vietnã) (1). Segundo a última atualização do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2015 o câncer de fígado foi associado a 9.711 óbitos, sendo 5.647 homens e 4.063 mulheres (3).

Dentre os tumores primários do fígado, o carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor primário mais frequente, representando 75%-85% dos casos (1). O CHC é um tumor epitelial derivado das principais células do fígado, os hepatócitos. Possui parênquima constituído por células neoplásicas arranjadas em um padrão trabecular ou acinar em meio a pouca quantidade de estroma, fazendo com que sua consistência seja geralmente amolecida. Macroscopicamente, pode ser classificado em relação à forma, ao tamanho ou ao padrão de crescimento (4). O principal fator de risco é a cirrose hepática, cujos fatores predisponentes mais importantes são as infecções crônicas por vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), além do uso crônico de álcool (5–7). Outros fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do CHC incluem exposição à aflatoxina, pesticidas, tabagismo, obesidade, diabetes tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica, hepatite autoimune e cirrose biliar primária (5,6).

1.1.Desenvolvimento da Doença

Acredita-se que o desenvolvimento do CHC ocorra como um processo lento e de múltiplas etapas. A cirrose hepática tem sido fortemente correlacionada à patogênese do CHC, uma vez que, o CHC raramente ocorre em sua ausência. A cirrose é o estágio final da doença hepática crônica difusa, a qual é o resultado da desorganização difusa da arquitetura

hepática normal. Caracteriza-se por nódulos de regeneração cercados por tecido fibrótico denso, sendo as alterações difusas em todo o fígado. As etiologias mais comuns são: infecções por vírus da hepatite (B e C) e o uso crônico de álcool. Além disso, outras causas também podem estar relacionadas como: esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença hepática autoimune e distúrbios metabólicos (8).

A ocorrência de lesões crônicas no fígado inicia um processo inflamatório na tentativa de regeneração hepática. Esse mecanismo proporciona condições favoráveis para ocorrência de alterações moleculares que levam a proliferação celular desenfreada e a inibição da apoptose. Como resultado dessas alterações, começam a surgir nódulos cirróticos pré-neoplásicos apresentando displasia de baixo grau, denominados nódulos displásicos de baixo grau. Estes nódulos posteriormente evoluem para nódulos displásicos de alto grau que podem se transformar em CHC de estadiamento inicial (0 e A) e avançado (B e C). Transformações malignas em CHC podem ser provenientes de vários tipos celulares, incluindo hepatócitos maduros e células progenitoras. Na **Figura 1**, é possível observar uma representação do processo de desenvolvimento do CHC (9,10).

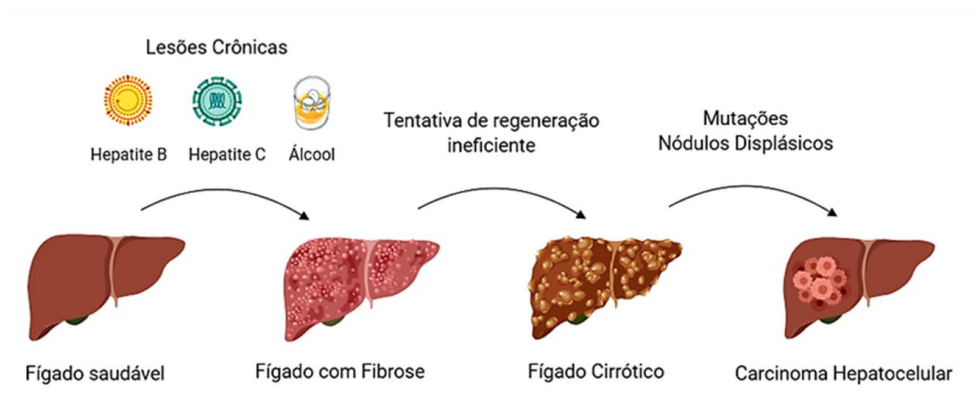


Figura 1. Esquema representativo do processo de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Imagem produzida utilizando o programa Biorender 2019 (<https://biorender.com/>).

1.2. Biomarcador e tratamento da doença

O diagnóstico do CHC pode ser realizado por meio de exames de imagem, marcadores tumorais e anatomopatológicos (11,12). O principal biomarcador para o CHC é a alfa-fetoproteína (AFP), uma alfa-1-gamaglobulina produzida nos hepatócitos fetais e saco vitelino, e que possui uma sensibilidade de 25%-65% dos casos (13). A elevação deste marcador é encontrada na maior parte dos casos de CHC onde os tumores possuem mais de 5 cm de diâmetro. Entretanto, a AFP possui pequena especificidade, podendo estar elevada na

gravidez, nos tumores de origem gonadal e em pacientes com doença hepática crônica sem CHC incluindo hepatites virais crônicas e agudas (14).

A melhor opção para o tratamento do CHC é o transplante do fígado. Entretanto, a pequena quantidade de doação de órgãos e a dificuldade de compatibilidade entre o doador e o paciente, tornam o transplante uma opção para poucos pacientes. Além disso, existe uma série de critérios que os pacientes precisam atender para serem considerados elegíveis para o transplante (15). Os critérios seguidos atualmente no Brasil, Critérios de Milão/Brasil, levam em consideração: pacientes cirróticos com nódulo único de no mínimo 2 cm e de até 5 cm, ou até 3 nódulos, sendo o maior de até 3 cm, sem invasão macrovascular ou metástases detectáveis (16). Tendo em vista esses critérios, apenas 15-30% dos pacientes podem passar pela cirurgia(15).

Nos casos dos pacientes ilegíveis para a cirurgia por causa do tamanho do tumor, é possível executar a técnica de ablação tumoral na tentativa de prolongar a vida e, potencialmente, diminuir o tumor para permitir o transplante ou a ressecção. O tipo de ablação mais utilizada atualmente é a ablação por radiofrequência, na qual por meio de uma sonda é passada uma corrente de alta frequência que aquece o tumor e destrói as células tumorais. Em relação à quimioterapia sistêmica ou regional, o CHC mostra-se minimamente responsivo. Entre os quimioterápicos utilizados, os regimes baseados na Doxorubicina parecem ter a maior eficácia, entretanto as taxas de resposta estão entre 20 a 30% e o impacto na sobrevida é considerado mínimo (15). Atualmente, o Sorafenib (inibidor de tirosina quinase) é usado como terapia sistêmica padrão para o CHC, sendo indicada para pacientes com função hepática preservada, pacientes não operáveis e com neoplasias avançadas sendo para esses, uma terapia de primeira linha caso não possam utilizar terapias que são potencialmente mais eficazes (17). Além disso, o Nivolumab, um inibidor de *checkpoint* imunológico tem sido utilizado em ensaios clínicos para tratamento do CHC (18).

1.3.Alterações genéticas no CHC

Entre as principais alterações genéticas está o aumento da expressão da telomerase, que ocorre em 90% dos casos de CHC. Os mecanismos de reativação da telomerase incluem: mutações do promotor *TERT* (54% -60%), amplificações gênicas em *TERT* (5% -6%), e inserção de VHB no promotor *TERT* (10% -15%). As mutações do promotor *TERT* são frequentemente associadas a mutações no gene *CTNNB1*, sugerindo cooperação entre a manutenção da telomerase e a via da β -catenina na tumorigênese hepática

(19,20). A via *WNT- β -catenina* é essencial na embriogênese fisiológica e controle metabólico no fígado. É a via oncogênica mais frequentemente ativada no CHC pela ativação de mutações no gene *CTNNB1* (11% -37%) (21,22).

Outras vias comumente alteradas são: do ciclo celular, a qual está alterada em pelo menos metade dos pacientes com CHC, com mutações frequentes no gene supressor tumoral *TP53* (19,22,23); a via do retinoblastoma, que controla a progressão da fase G1 para S do ciclo celular e é inativada no CHC principalmente por deleção homozigótica de mutações no gene *retinoblastoma 1 (RB1)*: 3-8% dos casos) ou no *inibidor da quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A)*: 2% -12%) (24); e as vias de sinalização molecular *RAS-RAF-MAPK* e fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*) - *AKT-mTOR*, que estão frequentemente ativadas no CHC devido à ocorrência de ampliações genômicas dos genes *FGF3*, *FGF4* e *FGF19* (25). Além disso, complexos de remodelação da cromatina e reguladores epigenéticos também estão frequentemente alterados em CHC. Mutações somáticas recorrentes que inativam *ARID1A* e *ARID2* foram identificadas em cerca de 10% dos CHCs. *ARID1A* e *ARID2* pertencem à família de genes de remodelação da cromatina, codificando subunidades dos complexos SWI/SNF e são considerados genes supressores tumorais (26).

Além de alterações genéticas, alterações epigenéticas, incluindo os microRNAs, estão envolvidas na carcinogênese hepatocelular.

1.4. MicroRNAs como reguladores da expressão gênica

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs que possuem aproximadamente 17-25 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas, e que estão bem conservados entre diferentes organismos (27). Eles regulam a expressão gênica ligando-se principalmente à região 3'-UTR (não traduzida) do RNA mensageiro (RNAm) por homologia completa ou parcial, podendo, na maioria dos casos, ocasionar a inibição da tradução ou a degradação do RNAm (28). A ligação do miRNA com seu gene-alvo ocorre principalmente em uma região denominada *seed*. A região *seed* do miRNA, localizada na extremidade 5' da molécula, consiste de aproximadamente oito nucleotídeos; esta sequência será emparelhada com o RNAm alvo, para que o miRNA possa atuar em sua regulação pós-transcricional (29). Quando ocorre uma ligação completa entre o miRNA/gene-alvo, o RNAm é degradado; quando essa ligação ocorre de maneira parcial, ocorre uma inibição da tradução (30). Além disso, existem relatos que o miRNA pode se ligar na região 5'UTR do RNAm e levar a uma ativação da tradução (31,32) (**Figura 2**).

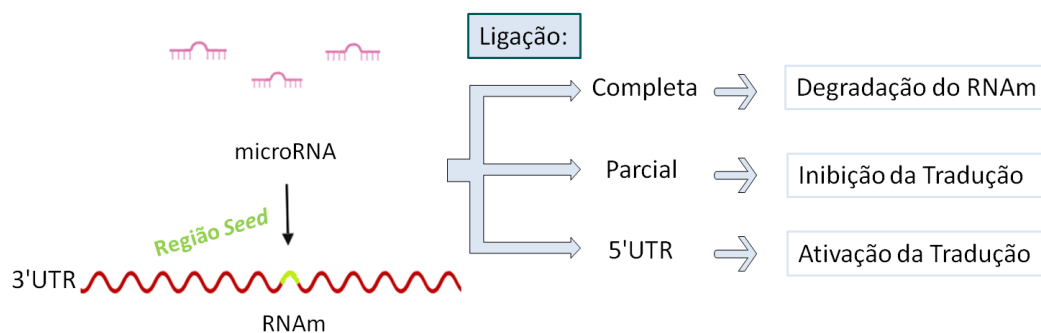


Figura 2. Esquema representativo da regulação da expressão gênica por meio da ligação do miRNA com o RNAm.

As sequências de miRNAs estão distribuídas por todo o genoma, localizando-se em regiões exônicas ou intrônicas, bem como locais intergênicos (33). A biogênese dos miRNAs começa com sua transcrição pela RNA polimerase II, a qual sintetiza uma molécula em forma de grampo (*hairpin*), e tem comprimento de até 1.000 nucleotídeos, denominado pri-miRNA (34). Após a transcrição, o pri-miRNA é clivado por um complexo proteico conhecido como microprocessador, que é constituído pela endonuclease RNase III Drosha e a proteína de ligação dupla ao RNA do gene da região crítica da síndrome DiGeorge 8 (DGCR8). Essa clivagem resulta em um miRNA precursor (pré-miRNA) em forma de *hairpin* de ~70 a 100 nucleotídeos de comprimento. Após a geração do pré-miRNA, a proteína de exportação Exportina-5 transporta os pré-miRNAs do núcleo para o citoplasma em um processo dependente de GTP.

Uma vez no citoplasma, ocorrerá uma nova clivagem pela enzima RNase Dicer, na região do loop, originando um RNA de fita dupla (dsRNA), que tem aproximadamente 18 a 22 nucleotídeos de comprimento. Esse dsRNA se dissocia dando origem ao miRNA maduro, de fita simples, o qual é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC contém uma família de proteínas denominada Argonata (AGO1 e AGO2) e uma proteína de ligação ao RNA (TRBP) (30).

Nos mamíferos, a seleção da fita guia é ditada pela estabilidade termodinâmica, a fita menos estável na extremidade 5' tem maior probabilidade de ser incorporada ao complexo RISC (miRNA maduro guia); o filamento remanescente (fita complementar passageira) geralmente é degradado. No entanto, dados recentes de sequenciamento de miRNA, demonstram que um grande número de fitas complementares passageiras dos miRNAs não são degradados e sim expressos em concentrações semelhantes às suas fitas guias correspondentes (35). Estas observações sugerem que essas fitas complementares passageiras

também podem ser incorporadas ao complexo RISC. Consequentemente, uma sequência de miRNA pode produzir dois miRNAs maduros diferentes, cada um com alvos diferentes e, portanto, com funções biológicas distintas. Finalmente, o complexo RISC funciona como um guia para reconhecer os alvos de RNAm, baseados em regras de complementaridade, para regular o RNAm (36).

Os avanços na descoberta dos miRNAs como reguladores da expressão gênica e o envolvimento destas moléculas na tumorigênese têm evidenciado os miRNAs como biomarcadores úteis no diagnóstico, prognóstico e como potenciais moléculas terapêuticas no câncer humano (37,38). Por constituírem moléculas muito pequenas e estarem associadas ao complexo proteico RISC, os miRNAs são estáveis e podem ser detectados em amostras clinicamente relevantes, tais como fluidos corporais, podendo assim ter grande potencial de utilização como biomarcadores em biópsias líquidas (39).

Como os miRNAs possuem sequências pequenas e agem sem necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular vários RNAs-alvo e vários miRNAs podem atuar de forma cooperativa para o controle de uma mesma molécula de RNAm (40). Análises computacionais sugerem que uma grande proporção (~50%) dos genes humanos pode ser regulada por miRNAs. Além disso, um mesmo miRNA pode regular centenas a milhares de RNAs com funções distintas. Assim, os miRNAs são capazes de regular genes que interagem em uma rede complexa envolvida na regulação de diferentes mecanismos (41). Os miRNAs estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a diferenciação, a apoptose e a proliferação celular (42,43); estes processos estão relacionados com o desenvolvimento e a progressão do câncer (44–49). Na tumorigênese, os miRNAs podem atuar como supressores tumorais e/ou oncogenes (50–54), regulando a expressão de vários genes associados a diversos tipos de tumores (55–58).

1.5. microRNAs em CHC

No processo de desenvolvimento do CHC já foram encontrados diversos miRNAs alterados interferindo em processos biológicos importantes para o estabelecimento e progressão tumoral, tais como: proliferação, apoptose, invasão, metástase, transição epitelial-mesenquimal (EMT), angiogênese, resistência a medicamentos e autofagia. Além disso, diversos estudos têm mostrado as diferenças de expressão dos miRNAs e genes-alvo em CHC comparado com tecido hepático histologicamente normal, tumor vs. metástase, bem como alterações na expressão de miRNAs induzidas por tratamento antineoplásico (59–63).

O miR-122 é sabidamente o miRNA mais abundante no fígado e apresenta-se com expressão diminuída no CHC. Para compreender seu papel na carcinogênese hepática, Wang et al. (2016) utilizaram linhagens de CHC (HEP G2 e Huh7) e investigaram os efeitos do miR-122 (utilizando moléculas miméticas e inibidoras) na modulação de genes envolvidos no processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM), como *Wnt1*, E-caderina, vimentina, β -caderina, e N-caderina. Ensaios com luciferase mostraram que *Wnt1* é um alvo direto do miR-122. Adicionalmente, a indução de expressão do miR-122 nessas células promoveu a diminuição de expressão gênica e proteica de *Wnt1*, e de outros componentes da via como vimentina, β -caderina, e N-caderina. As células transfectadas com miR-122 também mostraram diminuição da proliferação celular, migração e invasão; enquanto que o grupo de células com inibidor de miR-122 mostraram efeito oposto, ou seja, aumento da proliferação, migração e invasão celular. Em conjunto, esses dados mostram que o papel supressor tumoral do miR-122 em CHC pode ser explicado pela modulação de genes da via Wnt/ β -catenina, ativados no processo de TEM (64).

Diversos outros miRNAs têm sido relatados com expressão alterada em CHC. O miR-300, por exemplo, tem expressão diminuída em CHC. Sua superexpressão em linhagens celulares de CHC (HEP G2, Hep 3B and Huh-7 e HEK293T) induzida por transfecção de moléculas mimetizadoras, inibiu a proliferação celular, a formação de colônias e a progressão do ciclo celular das células de CHC. Além disso, o gene *CREPT* foi demonstrado como alvo direto do miR-300, pelo ensaio de luciferase, e pode estar relacionado com o processo de desenvolvimento e progressão do CHC por meio da via Wnt/ β -catenina (65). Outro miRNA com expressão diminuída no CHC é o miR-30b-3p, correlacionado com menor sobrevida global. A superexpressão do miR-30b-3p em linhagens celulares de CHC (Huh7 e HEP G2) diminuiu a viabilidade celular, proliferação, migração e invasão. Além disso, o gene *TRIM27* mostrou-se alvo direto do miR-30b-3p e pode agir na tumorigênese do CHC por meio da via de sinalização TRIM27/PI3K/AKT (66).

1.6. Validação funcional de miRNAs

Na tentativa de obter informações sobre a função dos miRNAs, diversos algoritmos computacionais foram desenvolvidos para predição de genes-alvo potencialmente regulados por miRNAs. Entretanto, os dados fornecidos por esses programas possuem viés em suas análises e uma grande taxa de resultados falsos positivos, pois têm como base poucas interações conhecidas de miRNA/genes-alvo (67). Além disso, algoritmos disponíveis têm

como principal parâmetro a homologia entre a região *seed* do miRNA e as sequências dos genes-alvo, entretanto, não é necessária a complementaridade perfeita entre essas regiões (68). Dados obtidos por imunoprecipitação de miRNA contendo complexos de ribonucleoproteínas mostraram que apenas 30-45% dos miRNAs contêm a região *seed* perfeitamente correspondentes à região 3'UTR de RNAs-alvo (69,70).

A validação funcional de miRNAs é essencial para comprovar que a ligação de um miRNA com um RNA-alvo específico ocorre, efetivamente, levando à regulação da expressão gênica (71). A análise de validação funcional de miRNAs e genes-alvo candidatos envolve algumas etapas. De forma geral, a primeira etapa é a aplicação de métodos de análises computacionais, os quais fornecem dados de predição da ocorrência de interação entre um ou mais miRNAs e genes-alvo. Na etapa seguinte é necessário verificar se o gene é um alvo verdadeiro do miRNA; para tal, a indução do aumento da expressão do miRNA levará à diminuição do nível de expressão do gene-alvo, e a inibição ou silenciamento do miRNA levará ao aumento da expressão do gene-alvo (72). Entre as abordagens disponíveis para a validação de interações entre miRNAs e genes-alvo está a utilização de moléculas miméticas (miRNA *mimics*) para restaurar a expressão de miRNAs ou moléculas inibidoras (miRNA *inhibitors*) para silenciar a expressão de miRNAs, seguida da aplicação de ensaios com o uso de fluorescência, tal como o ensaio da luciferase. Tais ensaios permitem verificar a ocorrência ou não de ligação direta entre um miRNA e um gene-alvo específico (71).

2. JUSTIFICATIVA

O carcinoma hepatocelular (CHC) está entre as neoplasias de alta complexidade no diagnóstico, prognóstico e tratamento. Apesar dos avanços do conhecimento sobre a biologia tumoral do CHC, seus mecanismos de desenvolvimento e progressão ainda não estão completamente elucidados. A alteração da expressão de miRNAs pode levar a desregulação de um grande número de genes associados ao processo de tumorigênese. A maioria dos estudos publicados na literatura identifica genes-alvo regulados por miRNAs utilizando estratégias de análise computacional (*in silico*). Embora tais análises sejam válidas para a identificação de genes-alvo envolvidos na tumorigênese, não são suficientes para demonstrar a ocorrência efetiva dessa regulação. Portanto, frente à escassez de dados experimentais, faz-se necessária a realização de estudos de validação experimental que comprovem a ligação específica de miRNAs com genes-alvo identificados. Além disso, a análise do efeito da superexpressão ou diminuição de um miRNA nos processos de migração e invasão celular é

essencial para demonstrar o efeito dos miRNAs na progressão do câncer. Portanto, estudos como o aqui proposto constituem um componente importante para compreensão da ocorrência de interação entre miRNAs e genes-alvo específicos, uma vez que fornecem evidências funcionais de regulação gênica.

REFERENCES

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal A. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*. 2018;68:394–424.
2. London WT, Petrick JL MK, Liver cancer. In: Thun MJ LM, Cerhan JR, Haiman CA SD, Eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. New York Oxford Univ Press. 2018;635–60.
3. Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1(November 2015).
4. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834–8.
5. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017;16(3):203–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
6. Bergamaschi A, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen down-regulation of miR-451 increases 14-3-3 ζ and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance. *Oncogene*. 2012;31(1):39–47.
7. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytsky Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(7):2152–9.
8. Bian HB, Pan X, Yang JS, Wang ZX, De W. Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549). *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):20.
9. MiR-451a suppressed cell migration and invasion in non-small cell lung cancer through targeting ATF2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(17):5554–61.
10. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2281–90.
11. Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran B. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:705–13.
12. Godlewski J, Bronisz A, Nowicki MO, Chiocca EA, Lawler S. microRNA-451: A conditional switch controlling glioma cell proliferation and migration. *Cell Cycle*. 2010;9(14):2742–8.
13. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Nuovo G, Palatini J, Lay M De, et al. MicroRNA-451 Regulates LKB1/AMPK Signaling and Allows Adaptation to Metabolic Stress in Glioma Cells. *Mol Cell*. 2010;37(5):620–32.
14. Huang J-Y, Zhang K, Chen D-Q, Chen J, Feng B, Song H, et al. MicroRNA-451: epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(21).
15. Lv G, Hu Z, Tie YI, Du J, Fu H, Gao XU, et al. MicroRNA-451 regulates activating transcription factor 2 expression and inhibits liver cancer cell migration. 2014;1021–8.
16. Li HP, Zeng XC, Zhang B, Long JT, Zhou B, Tan GS, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct Suppression of IKK- β . *Carcinogenesis*. 2013;34(11):2443–51.
17. Li HP, Zeng XC, Zhang B, Long JT, Zhou B, Tan GS, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct Suppression of IKK- β . *Carcinogenesis*. 2013;34(11):2443–51.
18. Monireh K, Farinaz A, Hamed E, Roya S, Sanam S, Sahar S, et al. A comprehensive review on miR-451: A promising cancer biomarker with therapeutic potential. *J Cell*

- Physiol. 2019;1:1–16.
19. Broughs LK, DeBerardinis RJ, Cell N, Author B. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2015;17(4):351–9. Available at: www.nature.com/reprints.
 20. Heiden MG Vander, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*. 2017;4(168):657–669.
 21. Overy DP, Enot DP, Taillart K, Jenkins H, Parker D, Beckmann M, et al. Explanatory signal interpretation and metabolite identification strategies for nominal mass FIE-MS metabolite fingerprints. *Nat Protoc*. 2008;3(3):471–85.
 22. Kaushik AK, DeBerardinis RJ. Applications of metabolomics to study cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2018;1870(1):2–14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.009>
 23. Park J, Shin Y, Kim TH, Kim D, Id AL. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer. *PLoS One*. 2019;1–12.
 24. Matteis S De, Ragusa A, Marisi G, Domenico S De, Gardini AC, Bonafè M, et al. Aberrant Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Provides Diagnostic and Therapeutic Opportunities. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;13.
 25. Guo W, Tan HY, Wang N, Wang X, Feng Y. Deciphering hepatocellular carcinoma through metabolomics: From biomarker discovery to therapy evaluation. *Cancer Manag Res*. 2018;10:715–34.
 26. Kong W, Zuo X, Liang H, Hu J, Zhang H, Wang X, et al. Prognostic Value of Lactate Dehydrogenase in Patients with Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
 27. Varkonyi-gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 2007;12:1–12.
 28. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(20):1–9.
 29. Baptista R, Fazakerley DM, Beckmann M, Baillie L, Mur LAJ. Untargeted metabolomics reveals a new mode of action of pretomanid (PA-824). *Sci Rep* [Internet]. 2018;(March):1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23110-1>
 30. Dieterle F, Ross A, Senn H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures . Application in ¹ H NMR Metabonomics. *Anal Chem*. 2006;78(13):4281–90.
 31. Li S, Park Y, Duraisingham S, Strobel FH, Khan N, Soltow QA, et al. Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(7).
 32. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0 : towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(May):486–94.
 33. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild A, Tsay M, et al. mirDIP 4 . 1 — integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(November 2017):360–70.
 34. Zhou G, Xia J. Using OmicsNet for Network Integration and 3D Visualization. *Curr Protoc*. 2018;65:1–26.
 35. Bai H, Wu S. Mir-451: A novel biomarker and potential therapeutic target for cancer. *Onco Targets Ther*. 2019;12:11069–82.
 36. Wei GY, Hu M, Zhao L, Guo WS. MiR-451a suppresses cell proliferation, metastasis

- and EMT via targeting YWHAZ in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(12):5158–67.
37. Zhao S, Li J, Zhang G, Wang Q, Wu C, Zhang Q, et al. Exosomal MIR-451a functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by targeting LPIN1. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(1):19–35.
 38. Liesenfeld DB, Habermann N, Owen RW, Scalbert A, Ulrich CM. Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(12):2182–201.
 39. Lichter-konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human Phenylalanine Hydroxylase Gene Expression in Kidney and Other Nonhepatic. *Mol Genet Metab*. 1999;316:308–16.
 40. Fang EF, Hou Y, Demarest TG, Croteau DL, Mattson MP, Bohr VA. NAD + in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. *Cell Press*. 2017;23(10):899–916.
 41. Yaku K, Okabe K, Hikosaka K, Nakagawa T, Chen S. NAD Metabolism in Cancer Therapeutics. *Front Oncol*. 2018;8(December):1–9.
 42. Gerster H. Anticarcinogenic effect of common carotenoids *Int. J Vitam Nutr Res*. 1993;63(2):93–121.
 43. Paolini M, Abdel-rahman SZ, Sapone A, Franco G, Perocco P, Cantelli-forti G, et al. Beta-Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat Res*. 2003;543:195–200.
 44. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications Daniel. *Chem Biol*. 2014;21(3):319–29.
 45. Skrajnowska D, Bobrowska-korczak B. Potential Molecular Mechanisms of the Anti-cancer Activity of Vitamin D. *Anticancer Res*. 2019;(39):3353–63.
 46. Jeon S. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* [Internet]. 2018;50(20). Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>
 47. Finkelmeier F, Kronenberger B, Köberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, et al. Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma - A prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(10):1204–12.
 48. Wu DB, Wang ML, Chen EQ, Tang H. New insights into the role of vitamin D in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018;12(3):287–94. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/17474124.2018.1406307>
 49. Keane JT, Elangovan H, Stokes RA, Gunton JE. Vitamin D and the Liver — Correlation or Cause ? *Nutrients*. 2018;10(496):1–19.
 50. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fontanini E, Fornasiere E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(24):3016–24.
 51. Xu J, Wang Y, Zhang Y, Dang S, He S. Astemizole promotes the anti-tumor effect of vitamin D through inhibiting miR-125a-5p-mediated regulation of VDR in HCC. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;107(277):1682–91. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.153>
 52. Pourgholami MH, Akhter J, Lu Y, Morris DL. In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3. *Cancer Lett*. 2000;151:97–102.
 53. Duran A, Hernandez ED, Reina-Campos M, Castilla EA, Subramaniam S, Raghunandan S, et al. p62/SQSTM1 by Binding to Vitamin D Receptor Inhibits Hepatic Stellate Cell Activity, Fibrosis, and Liver Cancer. *Cancer Cell*. 2016;30(4):595–609.
 54. Huang J, Yang G, Huang Y, Zhang S. 1,25 (OH) 2 D 3 induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and inhibited their growth in a nude mouse

- xenograft model by regulating histone deacetylase 2. *Biochimie* [Internet]. 2018;146:28–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.012>
55. Cai L, Luo L, Tang Z, Meng X. Combined antitumor effects of 1, 25 - dihydroxy vitamin D3 and Notch inhibitor in liver cancer. *Oncol Rep*. 2018;40:1515–24.
 56. Provisiero DP, Negri M, de Angelis C, Di Gennaro G, Patalano R, Simeoli C, et al. Vitamin D reverts resistance to the mTOR inhibitor everolimus in hepatocellular carcinoma through the activation of a miR-375/oncogenes circuit. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-48081-9>
 57. Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2003;164:239–46.
 58. Sakaki T, Yasuda K, Kittaka A, Yamamoto K, Chen TC. CYP24A1 as a Potential Target for Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;25:97–108.
 59. Watnick T, He N, Liang Y, Parfrey P, Hefferton D, George- PS, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet*. 2000;25:144–6.
 60. Chen G, Kim SH, King AN, Zhao L, Simpson RU, Paul J, et al. CYP24A1 Is an Independent Prognostic Marker of Survival in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2012;17(4):817–26.
 61. Sun H, Wang C, Hao M, Sun R, Wang Y, Liu T, et al. CYP24A1 is a potential biomarker for the progression and prognosis of human. *Hum Pathol* [Internet]. 2016;50:101–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.11.008>
 62. Komagata S, Nakajima M, Takagi S, Mohri T, Taniya T. Human CYP24 Catalyzing the Inactivation of Calcitriol Is Post- Transcriptionally Regulated by miR-125b. *Mol Pharmacol*. 2009;76(4):702–9.
 63. Yang R, Suraokar M, Wistuba II, Gazdar AF, John D. Genetic mutation of p53 and suppression of the miR-17~92 cluster are synthetic lethal in non-small cell lung cancer due to upregulation of vitamin D signaling. *Cancer Res*. 2016;75(4):666–75.

OBJETIVOS ALCANÇADOS E CONCLUSÃO

A avaliação do efeito do miR-451a na reprogramação metabólica em células de carcinoma hepatocelular (PLC/PRF/5) demonstrou que houve um acúmulo de calcitriol, forma ativa da vitamina D, nas células transfectadas com o mimético do miR-451a em comparação ao controle. Além disso, o gene que codifica a enzima que catalisa a degradação do calcitriol, *CYP24A1*, teve uma diminuição significativa de expressão ($p < 0,05$) após transfecção do mimético do miR-451a, demonstrando que esse gene é um provável alvo do miR-451a. Conclusão: Demonstramos que a restauração da expressão do miR-451a leva ao acúmulo de calcitriol na linhagem celular PLC/PRF/5 e que o gene *CYP24A1* é um potencial alvo do miR-451a. Assim, uma característica da tumorigênese hepática pode ser a perda de calcitriol devido à desregulação do miR-451a.