



**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 UNIPEX** (Paulinha, Vick, Pessoal da limpeza e manutenção, Secretaria) 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).

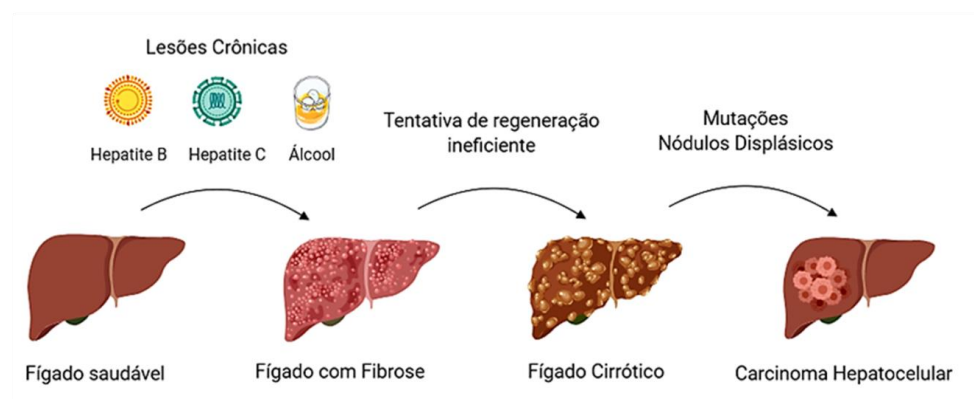


Figura 1. Esquema representativo do processo de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Imagem produzida utilizando o programa Biorender 2019 (<https://biorender.com/>).

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**).

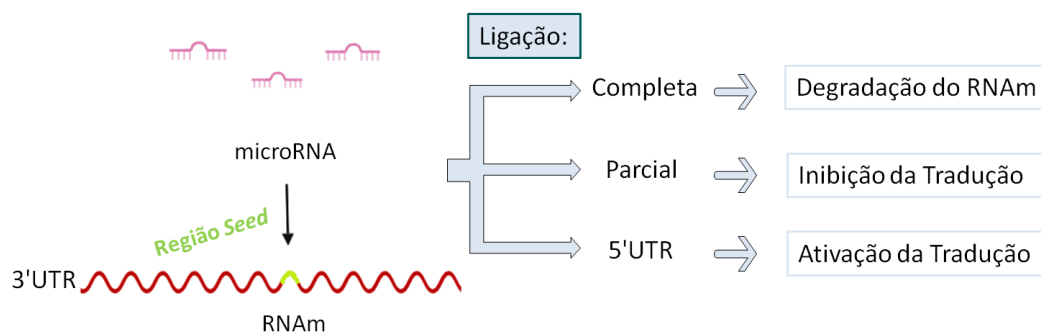


Figura 2. Esquema representativo da regulação da expressão gênica por meio da ligação do miRNA com o RNAm.

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. Ensaio 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.

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Identificar e validar experimentalmente a interação entre miRNA/genes-alvo potencialmente relacionados com o processo de tumorigênese do CHC, podendo dessa maneira, contribuir para a identificação de vias moleculares relevantes para o desenvolvimento tumoral.

Objetivos Específicos:

1. Selecionar miRNAs com expressão alterada consistente em amostras de pacientes com CHC .
2. Identificar por meio de análise de predição computacional, genes-alvo regulados por esse miRNA e as vias moleculares biologicamente relevantes no processo de tumorigênese do carcinoma hepatocelular.
3. Validar experimentalmente a interação miRNA/genes-alvo nas linhagens celulares de carcinoma hepatocelular pelo ensaio da luciferase e pela detecção dos transcritos por RT-qPCR.
4. Verificar o efeito da alteração da expressão do miRNA escolhido sobre o potencial de proliferação, migração e invasão celular das linhagens de CHC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Declaração de Ética

Esse projeto foi aprovado (CAAE: 85671518.2.0000.5411) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Nesse projeto não serão utilizadas amostras de pacientes, apenas linhagens celulares obtidas comercialmente.

4.2. Delineamento Experimental e Resultados

A **Figura 3** mostra o delineamento experimental do estudo com os principais resultados encontrados.

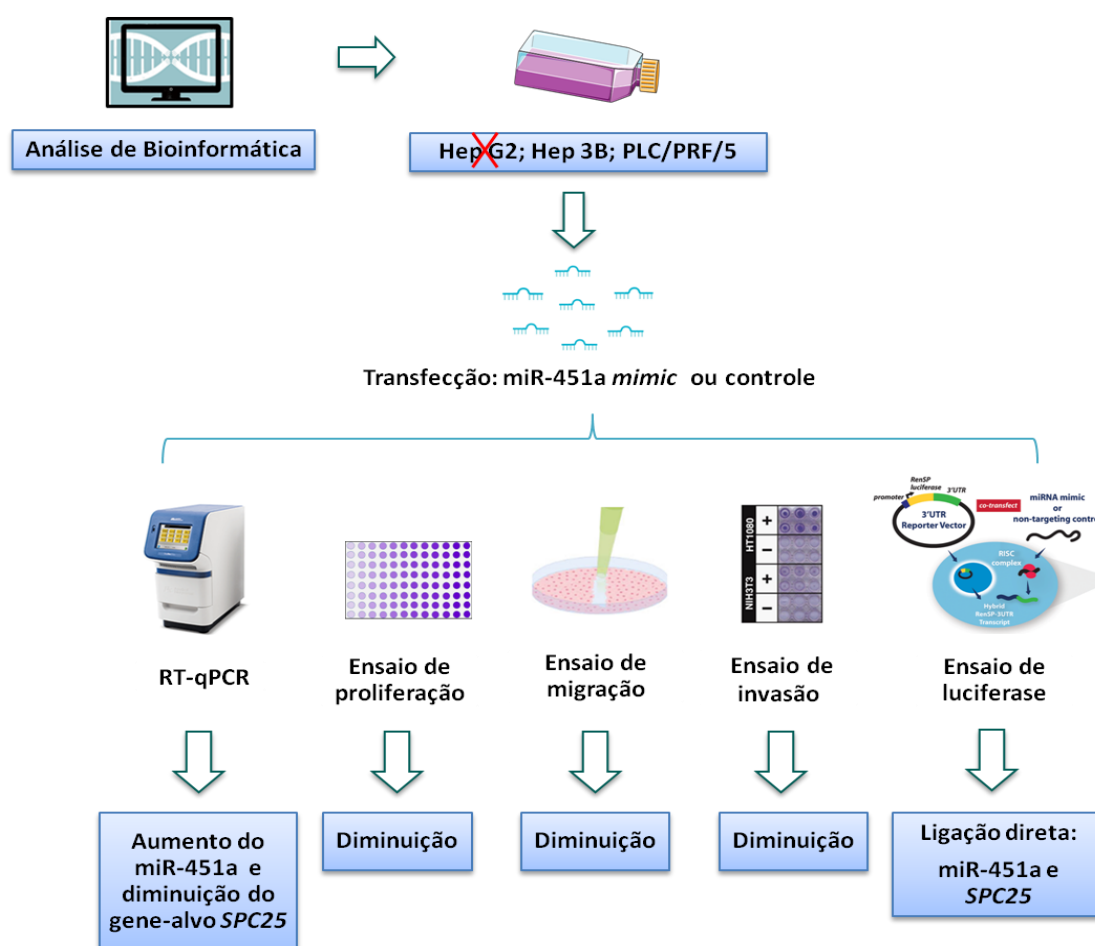


Figura 3. Desenho experimental do estudo. Linhagens celulares de câncer de fígado (HEPG2, Hep 3B e PCL/PRF/5).

4.3. Métodos de Análise Computacional

Seleção do microRNA (miRNAs) para validação funcional (baseado em dados de estudo prévio do nosso grupo).

A seleção do miRNA para validação funcional foi baseada em **(a)** análise de expressão global de miRNAs em 18 amostras de CHC pareadas com tecidos hepáticos normais, realizadas pelo nosso grupo (63); **(b)** meta-análise da literatura incluindo 8 estudos realizados em um total de 273 amostras de CHC e 253 amostras de tecido hepático normal; **(c)** análise de expressão global de miRNAs em 372 amostras de CHC e 50 de tecido hepático normal, disponível no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov/>) (63).

(a) Avaliação da expressão de miRNAs nas amostras de tecido:

Os critérios de inclusão do estudo foram: pacientes com diagnóstico de carcinoma de fígado, do subtipo histológico hepatocelular, de qualquer estadiamento e grau histológico, portadores do vírus da hepatite C, sendo as amostras provenientes de pacientes submetidos à cirurgia para tratamento. Os critérios de exclusão foram: pacientes com doença secundária ou metastática no fígado que não carcinoma hepatocelular primário. Após a rigorosa identificação das amostras, foi realizada a seleção dos casos positivos para o VHC totalizando 18 amostras pareadas de pacientes portadores de CHC e VHC+ (18 amostras de tecido hepático histologicamente normal e 18 amostras de tecido tumoral do mesmo paciente).

Nessas amostras foi avaliado a expressão global de miRNAs, utilizando a plataforma *TaqMan Array Human MicroRNA Cards* (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies), e foram identificados 8 miRNAs com expressão alterada estatisticamente significativa, sendo 5 com expressão aumentada (miR-345-3p, let-7d-5p, miR-27a-3p, miR-744-5p, miR-485-3p) e 3 com expressão diminuída (miR-422a, miR-523-3p, miR-451a) (**Tabela 1**) (63).

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).

Expressão diminuída			Expressão aumentada		
miRNA	FC	P-value	miRNA	FC	P-value
miR-422a	0,161	0,033	miR-345-3p	1,970	0,007
miR-523-3p	0,444	0,009	miR-let-7d-5p	2,402	0,030
miR-451a	0,538	0,019	miR-27a-3p	4,121	0,017
			miR-744-5p	5,169	0,028
			miR-485-3p	9,840	0,002

FC: *fold change*. Na análise dos dados, apenas os miRNAs com $FC \geq 1.5$ e $p < 0,05$ foram incluídos. Em verde estão representados os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

(b) Meta-análise da literatura:

Os artigos selecionados para a meta-análise foram encontrados utilizando as seguintes palavras chaves no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>): “*carcinoma, hepatocellular (mesh terms)*”, “*carcinoma, hepatocellular (mesh terms)*” AND “*microRNA profile*”. Os filtros utilizados para a seleção dos artigos foram datas de publicação (2006-2016), espécie (seres humanos) e idiomas (inglês). A meta-análise incluiu estudos que preencheram os seguintes critérios de inclusão: estudos que avaliaram a expressão global de miRNA em amostras de tecido de carcinoma hepatocelular humano em comparação com tecidos hepáticos adjacentes não neoplásicos e normais, e, inclusão de análises confirmatórias ou de validação e com dados incluídos no material complementar ou publicamente disponível. Além disso, os critérios de exclusão foram: estudos utilizando exclusivamente modelos animais ou linhagens celulares, estudos com dados duplicados e previamente relatados, relatos de casos e estudos com número de amostra < 10 (63).

Os resultados verificados na **Tabela 1** foram contrastados com dados obtidos da meta-análise, dados de expressão global de miRNAs em 273 amostras de CHC e 211 tecidos hepáticos histologicamente normais (**estudos incluídos na meta-análise descritos na Tabela 2**). Corroborando nossos achados, 3 miRNAs (miR-422a, miR-523-3p e miR-451a) foram identificados com expressão diminuída nessa meta-análise (63).

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

Public Data Set reference	Tumor samples	Control samples	Analysis platform
Murakami et al. Oncogene 2006 (73)	N=25	N=25	Custom oligonucleotide array
Wong et al. Clin Can Res 2010 (74)	N= 20	N= 12	TaqMan QPCR (Applied Biosystems)
Li et al. Int. J Cancer 2008 (75)	N=78	N=78	Custom array platform
Murakami et al. PLoS One 2014 (76)	N=14	N=6	Next-generation sequencing (NGS)
Augello et al. Liver Int 2012 (77)	N=30	N=10	Low-density array platform to profile the

berlin.de/), PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html), RNA22 microRNA Target Detection (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) e TargetScan37 (http://www.targetscan.org/vert_71/). O mirDIP utiliza o *Integrated Score* para priorizar as interações previstas dos miRNAs/genes-alvo. O *Integrated Score* foi estatisticamente inferido a partir de medidas específicas de recursos de confiança de predição. Quando mais perto de 1, mais confiável é a predição da interação entre o miRNA e o gene-alvo (81). A combinação desses vários bancos de dados oferece uma melhor precisão na análise de predição de genes-alvo e permitiu identificar vias biologicamente relevantes em CHC. Nesse programa foram usados os *Score Class* chamados *Very High* e *High*. Esse conjunto de genes foi então comparado com os genes identificados como alterados na análise dos dados do TCGA. Por ser um consórcio genômico internacional, a validação com o TCGA permite uma maior confiabilidade na predição desses genes.

Além disso, esses dados foram contrastados com a lista de genes-alvo que já foram validados experimentalmente segundo o banco de dados *miRTarBase* (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>), para identificar novos genes alvo ainda não validados. Esse programa fornece informações sobre interações miRNA-alvo validadas experimentalmente e dessa forma permite identificar genes-alvo para os quais já foram gerados dados de validação funcional. Após essa análise, foram selecionados apenas os genes com correlação negativa entre seus níveis de expressão em relação aos níveis de miRNA (por exemplo, se a expressão do miRNA de interesse estiver diminuída, foram selecionados genes-alvo com expressão aumentada). Após essa etapa, a lista de genes-alvo candidatos foi reduzida utilizando os seguintes critérios: Nível de alteração (*fold change*) ($FC \geq 1,5$), *p*-valor ($p < 0,05$) e *False Discovery Rate* - FDR $< 0,05$. No final dessa etapa os genes encontrados foram avaliados pela ferramenta de análise ToppGene (<https://toppgene.cchmc.org/>). A ferramenta ToppGene permite uma análise de enriquecimento de vias moleculares a partir de uma lista de genes, além de realizar a priorização de genes candidatos com base em anotações funcionais e redes de interações de proteínas. Essa abordagem permitiu identificar vias moleculares relevantes associadas à tumorigênese hepatocelular.

4.4. Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares tumorais: HEP G2 (código ATCC HB-8065), Hep 3B (código ATCC HB-8064) e PCL/PRF/5 (código ATCC CRL-8024), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Todas as linhagens foram cultivadas conforme

recomendações do fornecedor, em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), complementados com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1% de *Antibiotic-Antimycotic* (100X) (solução de Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B) (Anti-Anti) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) em 37 °C e 5% de CO₂. As características dos doadores dos tecidos primários utilizados para estabelecimento das linhagens celulares estão apresentadas no **Quadro 1** (82).

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

Linhagem	Tipo Histológico	VHB	Idade	Sexo	Proliferação	ATCC	Passagem
HEP G2	Hepatoblastoma	-	15	M	72h	HB-8065	93
Hep 3B	CHC	+	8	M	72-96h	HB-8064	11
PCL/PRF/5	CHC	+	24	M	48h	CRL-8024	7

4.5. Expansão das Linhagens Celulares

As linhagens celulares foram divididas em frascos de cultura para expansão. As células foram monitoradas diariamente e cultivadas até atingirem uma confluência de no mínimo 80% (em um período aproximado de 4-7 dias). Posteriormente, as células foram tripsinizadas e divididas em dois frascos de cultura para expansão. As células foram congeladas em solução de congelamento contendo 95% de soro fetal bovino e 5% de DMSO. Em cada criotubo foram congeladas em nitrogênio líquido 10⁶ células em um volume de 1 mL. Foram congelados 30 criotubos de cada linhagem celular para os ensaios funcionais. Durante o período de expansão das linhagens celulares foram obtidas fotos de cada linhagem em alta e baixa confluência. Todas as linhagens usadas para os experimentos foram mantidas por 2 meses em cultura e após esse período, descartadas e descongelados outros criotubos.

4.6. Viabilidade Celular por Teste de Exclusão por Azul de Tripan

A viabilidade celular de cada linhagem foi estimada utilizando o teste de exclusão por Azul de Tripan (0,4% de corante Azul de Tripan) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Esse ensaio é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular pela integridade da membrana celular. As células mortas absorvem o Azul de Tripan para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana corando-se de azul, enquanto que as células vivas permanecem incolores (83). Resumidamente, as amostras de cada linhagem celular foram diluídas na proporção de 1:1 com líquido de Azul de Tripan e foi acrescentada uma alíquota de 10µL na câmara de Neubauer para contagem no microscópio ótico de

contrate de fase. A viabilidade celular foi determinada utilizando a seguinte fórmula: Viabilidade celular % = número de células vivas x 100/ número de células totais (células vivas e mortas). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem.

4.7. Teste de Micoplasma

O teste de micoplasma foi realizado o Kit de Detecção de *Mycoplasma Venor*TM GeM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) para garantir que as culturas celulares estavam livres de contaminantes. Essa metodologia é baseada na PCR, amplificando a região conservada 16S do genoma de *Mycoplasma*, com alta sensibilidade, sendo capaz de detectar de 1-5 fg de DNA de *Mycoplasma* por amostra, o que corresponde 2-5 unidades de *Mycoplasma*, incluindo todas as espécies: *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, e *Ureaplasma*. O kit inclui um controle interno de amplificação (191pb), o qual é adicionado em todas as amostras e um controle positivo (270pb).

Para execução do teste, foram seguidas as instruções do fabricante. Resumidamente, 100 µl de sobrenadante da cultura celular foram colocados num tubo de microcentrífuga esterilizado, seguido de aquecimento a 95 °C durante 5 minutos (min.), e depois centrifugados (5 segundos) para eliminar os detritos celulares antes de adicionar o sobrenadante à mistura de PCR: 15,1µl ddH₂O, 2,5 µl de Tampão de Reação 10x, 2,5 µl de mistura de primer/nucleotídeo, 2,5 µl de controle interno e 0,4 µl de Taq Polimerase (2,5 U/µl); nessa mistura, foram usados 2 µl de água livre de DNA como controle negativo. Foram adicionados 2 µl de cada amostra de teste a tubos de reação de PCR e 2 µl de DNA de controle positivo para controle da reação. As condições do ciclo térmico foram: 1 ciclo a 94 °C durante 2 min.; 39 ciclos a 94 °C durante 30 segundos (s), 55 °C durante 1 min., 72 °C durante 30 s e arrefecimento a 4-8 °C. Os resultados do teste foram visualizados em gel de agarose.

4.8. Autenticação das linhagens celulares

1) Extração de DNA

A extração do DNA das linhagens foi realizada com o *DNeasy Blood&Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo instruções do fabricante. O DNA extraído foi eluído em água ultra pura e livre de nucleases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Em

seguida, o DNA foi quantificado usando o *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e armazenado a -20 °C até ser utilizado.

2) Análise do perfil de *Single Tandem Repeats* (STR)

Para garantir que uma linhagem celular é adequada para uso em experimentos de pesquisa é necessário o teste autenticação celular. Usamos o sistema *GenePrint® 10* para determinar o perfil STR de todas as linhagens celulares. Esta técnica de análise tem como base comparar o perfil de sequências curtas repetidas em tandem (*Short Tandem Repeats*, STR), que constituem unidades repetidas de 1-6 pb (84). A análise do perfil dessas sequências (STR) foi realizada utilizando o kit *GenePrint® 10 System* (Promega, Madison, USA), que permite a co-amplificação e detecção de nove locos humanos (TH01, TPOX, vWA, Amelogenina, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 e D5S818) e inclui o controle interno D21S11. Foram utilizados 5ng de DNA em 25µl de volume total de reação, conforme instruções do fabricante.

O primeiro passo foi a amplificação da região de interesse pela PCR utilizando o *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), com as seguintes condições de ciclagem: 96°C - 1 min., 30 ciclos de 94°C - 10 s, 59°C - 1 min., 72°C - 30 s, seguido por um ciclo de 60°C por 10 min. Após a conclusão da PCR, um segundo passo foi a detecção de fragmentos amplificados. Para isso, foi preparado um *mix* utilizando o *Internal Lane Standard 600* e *Hi-Di™ formamida*, de acordo com as recomendações do fabricante. Após esse preparo, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 min. e a seguir foram imediatamente resfriadas em gelo (~4°C), por 3 min. As amostras foram então desnaturadas e analisadas no sequenciador capilar *Applied Biosystems® 3500* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os dados foram exportados e analisados usando o *GeneMarker®* (<https://softgenetics.com/GeneMarker.php>). Os perfis de DNA-STR foram analisados em bases de dados disponíveis dos Centros de Recursos Biológicos (BRCs) ATCC (https://www.atcc.org/STR_Database.aspx) e DSMZ (<https://www.dsmz.de/services/services-human-e-animal-cell-lines/online-str-analysis.html>), a fim de comparar nossos resultados com perfis de STR previamente estabelecidos para as linhagens analisadas. Uma linhagem celular é considerada autêntica quando o perfil de STR mostra uma correspondência $\geq 80\%$ com os dados depositados da linhagem original (85).

4.9. Curva de Crescimento Celular

A construção da curva de crescimento consistiu em analisar o progresso da densidade da monocamada celular em relação ao tempo e a quantidade de células plaqueadas. Essa análise permitiu obter dados estimados do número de células necessárias e do tempo para os experimentos de transfecção celular. Para os ensaios de transfecção com *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as células devem estar em uma confluência de 60-80%. Dessa maneira, a partir da observação dos resultados foi possível escolher as concentrações a serem plaqueadas para cada linhagem, para que após 24h do cultivo, fosse obtida uma confluência de 70%. As células das três linhagens foram plaqueadas em placas de 24 poços estéreis (1,9 cm²/poço) nas quantidades de 0,8 x10⁶, 0,4 x10⁶, 0,2 x10⁶, 0,1 x10⁶ e 0,05 x10⁶ de células por poço. A curva foi construída com base na estimativa da confluência da monocamada celular observada por microscopia ótica de contraste de fase nos tempos 24, 48, 72 e 96h, após o plaqueamento. As células foram cultivadas todo o tempo em meio contendo 10% de FBS, 1% de solução de antibiótico (*Anti-Anti*).

4.10. Transfecção Celular

Para os ensaios de transfecção as linhagens celulares foram cultivadas em placas de 24 poços nas seguintes concentrações: Hep 3B (1,5x10⁵ células/poço) e PCL/PRF/5 (1,2x10⁵ células/poço) em DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de *Anti-Anti*. Após 24 horas o meio de cultura foi trocado e adicionada a solução de transfecção, *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), com as respectivas sequências: sequência mimética do miRNA (*Life Technologies, mirVanaTM miRNA Mimic*, código: 4464066), aqui denominada *mimic*, ou seu controle negativo, aqui denominado controle, (*Life Technologies, mirVanaTM miRNA Mimic Negative Control*, código: 4464058). O controle é uma molécula mimética de miRNA de sequência aleatória que não produzir efeitos identificáveis na função dos miRNAs. Dois complexos foram utilizados na solução final de transfecção. Primeiramente, a *Lipofectamine RNAiMAX* foi diluída em Opti-MEM® *Reduced Serum Medium* (Life Technologies, EUA) para a formação do primeiro complexo. Em seguida, a moléculas de *mimic* ou seu controle foram diluídos em Opti-MEM® para a formação do segundo complexo. O complexo Lipofectamina+Opti-MEM foi misturado com o complexo siRNA+Opti-MEM e incubado por 5 min. à temperatura ambiente. Após esse

período, foram adicionados 50µl da solução final de transfecção em 1 ml de meio de crescimento e as células foram incubadas por um período de 24 e 48 horas. Após o período de incubação, o meio contendo o complexo de transfecção foi retirado e substituído por meio de crescimento celular, DMEM+10%FBS+1%Anti-Anti, conforme protocolo recomendado para o estabelecimento e crescimento das culturas celulares.

4.11. Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, o RNA foi eluído em água ultra pura e livre de nucleases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e armazenado a -70 °C até a utilização. A quantificação das amostras foi realizada utilizando o *NanoDrop* 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.12. Análise da expressão do miRNA por (RT-QPCR)

A expressão do miRNA foi detectada seguindo o protocolo “*Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs* (86)”. Primeiro, o primer *RT steam loop* foi hibridizado com a molécula de miRNA e, em seguida, foi transcrito reversamente (RT) utilizando a enzima *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Em seguida, os produtos da RT foram amplificados usando um *primer forward* específico para o miRNA e o primer *universal reverse* por meio do *SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (**Figura 4**). Foram feitas curvas de diluição seriadas com o cDNA das amostras para verificar a eficiência dos primers (coeficiente de correlação- R^2 e eficiência da reação) e dessa maneira escolher a melhor concentração a ser usada.

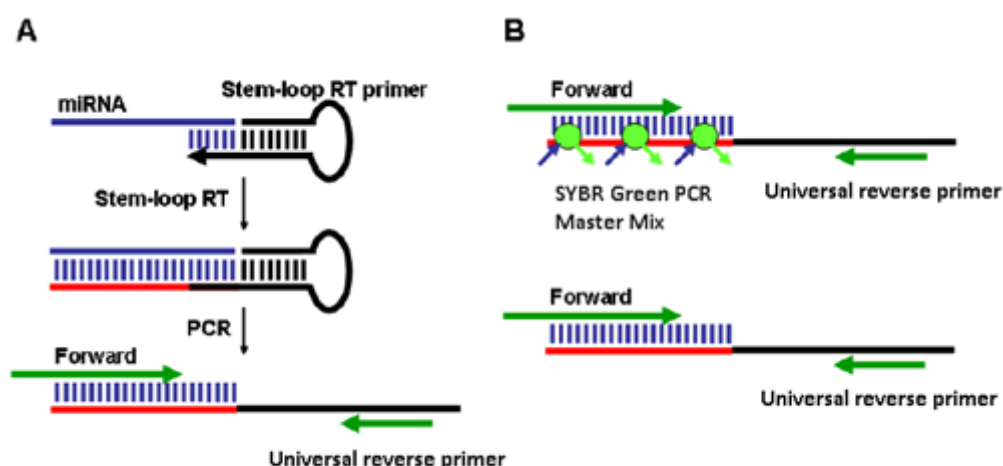


Figura 4. Esquema mostrando ensaio de quantificação de miRNA por stem-loop RT-qPCR. **A)** O primer Stem-loop RT se ligam a região 3' da molécula de miRNA, iniciando a transcrição reversa do miRNA. Em seguida, o produto da RT é amplificado usando um primer forward específico para miRNA e o primer *universal reverse*. **B)** Ensaio utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix. Adaptada de Varkonyi-gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol : a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>.

1) Reação de Transcrição Reversa (síntese de cDNA)

Após a extração de RNA total, o cDNA foi sintetizado com a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* seguindo o seguinte protocolo: em um tubo de 0,2mL foi acrescido, 10µL da amostra de RNA a 100ng, 0.5 µl de 10 mM dNTP mix e 1 µL de *Steam-loop RT* primer a 1 µM. Essa reação foi colocada no termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 5 min. a 65 °C, seguido de 2 min. no gelo. Nesse tubo foi acrescido: 4 µl de 5×*First-Strand Buffer*, 2 µl 0.1 M DTT, 0.1 µl *RNaseOUT* (40 units/µl), 0,5 µL *SuperScript III* (200 units/µl) e 1,9 µL de *nuclease free water* e colocado no termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) com a seguinte ciclagem: incube por 30 min. a 16 ° C, seguido por RT pulsada de 60 ciclos a 30 ° C por 30 s, 50 ° C por 30 s e 50 ° C por 1 s e por fim incubar a 85 ° C por 5 min. para inativar a transcriptase reversa. O produto final da RT foi diluído em uma proporção de 1:5 em água ultra pura e livre de nucleases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

2) PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-QPCR)

O RT-qPCR foi feito utilizando o kit *SYBR Green PCR Master Mix* segundo orientações do fabricante. Para normalização dos dados foi utilizado o U6 como controle endógeno. Todas as reações foram realizadas em duplicatas, no Sistema *QuanStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (87), o cálculo da expressão gênica foi realizado utilizando o método comparativo e estão representados por quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (88).

4.13. Análise da expressão gênica (RT-qPCR)

1) Reação de Transcrição Reversa (síntese de cDNA)- genes-alvo do miRNA.

A reação de Transcrição Reversa (síntese de cDNA) foi feita para os genes-alvo: *FMNL3*, *BUB1B*, *SPC25*, *KIF2A*, *PLEKHG2*, *BAK1*, *HMGB2*, *MEF2D*, *CDKN2B*, *HELLS*, *RRAGD*, *CSE1L*. Após a extração de RNA total do miRNA, o cDNA para análise dos genes-alvo foi sintetizado com a enzima *MultiScribe™ Reverse*, segundo orientações do fabricante, 10 µL de RNA total a 1000 ng, 2 µL de 10 X RT Buffer, 0,8 µL de 25 X dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10 X RT Random Primers, 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e 4,2 µL de água ultra pura e livre de nucleases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A mistura foi colocada no termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando as seguintes condições: 25°C por 10min., 37 °C por 120 min., seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min. O produto da RT foi diluído na proporção de 1:9.

2) PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) para os genes-avo do miRNA.

Todos os primers foram desenhados utilizando o programa *Primer Express 3.0.1* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Foram feitas curvas de diluição seriadas com o cDNA das amostras para verificar a eficiência dos primers (coeficiente de correlação- R^2 e eficiência da reação) e dessa maneira escolher a melhor concentração a ser usada. O RT-qPCR foi feito utilizando o kit *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* segundo orientações do fabricante. Todas as reações foram realizadas em duplicatas, no Sistema *QuanStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *MIQE* (87), o cálculo

da expressão gênica foi realizado utilizando o método comparativo e estão representados por quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (88).

4.14. Ensaio de Proliferação – MTS

A proliferação celular após transfecção do mimético do miR-451a ou do controle foi avaliada pelo *Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) (Promega, USA). As células foram plaqueadas na placa de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço para Hep 3B e 1×10^4 células/poço para PCL/PRF/5 e transfectadas por 24h. Após 0h, 24h, 48h e 72h, 20 μ l de [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium, MTS] foi adicionado em 100 μ l de DMEM (Thermo Fisher Scientific, EUA) e incubado por 2 h antes da leitura no leitor de microplacas Synergy/HT (Biotek, EUA) na absorvância de 490 nm.

4.15. Ensaio de Migração – Wound Healing

Para análise *in vitro* da ação do miRNA no potencial de migração celular das linhagens celulares, foi utilizado o ensaio *Wound Healing*. As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 24 poços nas seguintes concentrações: Hep 3B ($1,5 \times 10^5$ células/poço) e PCL/PRF/5 ($1,2 \times 10^5$ células/poço), em DMEM+10%FBS+1%Anti-Anti. Após atingirem a confluência de 80% foi realizada a transfecção, por 24 h, com os oligonucleotídeos *mimic* ou controle. Após o período de incubação, o meio contendo o complexo de transfecção foi retirado e substituído por meio de crescimento celular, DMEM+2%FBS+1%Anti-Anti, por 24 h. As monocamadas da cultura foram então lesadas (riscadas) em linha reta com o uso de uma ponteira estéril de 200 μ L. Os riscos foram feitos no centro de cada poço de forma a obter um risco regular. A área lesada na placa foi inspecionada nos tempos 0, 24 e 48 h, em microscópio invertido de contraste de fase com aumento de 10X, e as imagens foram capturadas nesses intervalos. A área de fechamento da lesão foi calculada comparando a porcentagem da área da ferida no primeiro momento até o fechamento total do risco, utilizando a seguinte equação: *wound healing* (%) = $[100 - (\text{área do risco em } T_{nh} / \text{área da ferida em } T_{0h})] \times 100$, onde T_{0h} é a medida no tempo imediatamente após o risco e T_{nh} é a medida do risco nos diferentes tempos (24h e 48h) (89). As análises das medidas foram feitas utilizando o programa *ImageJ*® (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Os experimentos foram feitos em triplicatas técnicas e biológicas.

4.16. Ensaio de invasão celular – Transwell

Para análise *in vitro* da ação do miRNA no potencial de invasão celular das linhagens celulares, foi utilizado o kit *QCM ECMatrix Cell Invasion Assay* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O Ensaio de Invasão foi realizado em uma câmara de invasão, a qual é constituída por uma placa de cultura de tecido de 24 poços com 12 inserções de cultura de células. As inserções contêm uma membrana de policarbonato de 8 µm sobre a qual há uma fina camada de matriz extracelular seca. A camada de matriz extracelular bloqueia os poros da membrana, impedindo a migração de células não invasivas. As células invasivas, por outro lado, migram através da matriz extracelular e aderem ao fundo da membrana de policarbonato.

Em resumo, as linhagens celulares foram cultivadas em placas de 6 poços nas seguintes concentrações: Hep 3B ($0,75 \times 10^6$ células/poço) e PCL/PRF/5 ($0,5 \times 10^6$ células/poço) em DMEM+10%FBS+1%Anti-Anti. Após atingirem a confluência de 80% foi realizada a transfecção, por 24 h, com os oligonucleotídeos *mimic* do miR-451a ou controle. Após o período de incubação, o meio contendo o complexo de transfecção foi retirado e substituído por meio de crescimento celular, DMEM isento de soro, por 2 h para que as células ficassem em privação de nutrientes. No interior das inserções foram adicionados 300 µl de meio isento de soro por 2 horas para reidratar a camada de matriz extracelular. Após a reidratação foi retirado o meio das inserções e adicionado à câmara inferior 500 µl de meio contendo 20% de soro fetal bovino como quimioatrativo. Em cada inserção foi adicionado 300 µl de suspensão celular (células já transfectadas) contendo $0,5-1,0 \times 10^6$ células em meio isento de soro. Após 24 h de incubação foi removido o meio de dentro do inserto e feito o processo de fixação, o qual se baseia em: formaldeído a 4% por 2 min, metanol 100% por 20 min e solução de coloração (fornecida como parte do kit) por 15 min, sendo que o inserto foi lavado duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) entre cada etapa. Após a coloração as células não invasivas foram retiradas de dentro do inserto com ajuda de um cotonete com ponta de algodão (fornecido como parte do kit). A análise das células invasivas foi feita média da contagem de células em dez campos visuais fotografados através do microscópio ótico de contraste de fase no aumento de 10X. Os experimentos foram feitos em triplicatas técnicas e biológicas.

4.17. Ensaio de Luciferase

A confirmação do pareamento funcional do miR-451a com o gene-alvo *SPC25* foi realizada pelo ensaio da atividade do gene repórter da luciferase. Para isso, a região 3'UTR do gene-alvo *SPC25* foi clonada no plasmídeo o *pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega, Madison, Wi, EUA) (**Tabela 3**). A construção dos vetores foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. As enzimas de restrição utilizadas foram *DraI* e *XhoI*.

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

Sequência <i>primers</i>	Enzima de restrição
<i>Forward</i> AAAAAA <u>TTTAA</u> ACATACAAATAGTGTATATAA	<i>DraI</i>
<i>Reverse</i> AAAAAA <u>CTCGAG</u> TAAAGACACATGCACACGTA	<i>XhoI</i>

1) PCR

Para o isolamento da região 3'UTR do gene *SPC25*, foram utilizadas amostras de DNA das linhagens células Hep 3B e PCL/PRF/5, extraídas utilizando o kit *DNeasy Blood&Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. A região 3'UTR do gene *SPC25* foi amplificada por meio da PCR com a ciclagem: 95°C por 2 min., 95°C por 30 s, 51°C por 30 s, 72°C por 30 s, 72°C por 30 s, 72°C por 5 min.

2) Reação de Digestão

O vetor *pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* e o resultado da PCR foram digeridos com as enzimas *DraI* e *XhoI* de acordo com o seguinte protocolo: 1ul da enzima *DraI*, 1ul da enzima *XhoI*, 1ul de *Buffer CutSmart* (10x) e 1ul de BSA (100x) foram adicionados em 1 ul do plasmídeo ou 15ul do produto do PCR, completando a reação com água isenta de nuclease para um total de 20ul. A reação foi incubada por 60 minutos a 37°C.

3) Purificação do produto de digestão

Nessa etapa, foram utilizadas beads magnéticas (*Agencourt® AMPure XP® PCR Purification system*) que apresentam afinidade ao DNA para purificar a digestão do vetor e do resultado do PCR. O produto da digestão foi colocado em uma placa de PCR e foram

adicionados 30 µl das beads magnéticas, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Após a incubação, a placa foi colocada em uma placa magnética por 2 min, em seguida o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes adicionando 200 µl de etanol 80%. Após a lavagem, a placa de PCR foi retirada da placa magnética e as beads foram ressuspensas em 40 µl de água ultra-pura com uma incubação a temperatura ambiente por 5 min. Na etapa seguinte, a placa foi posicionada na placa magnética por 2 min e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro poço limpo da placa, estando pronto para a quantificação por detecção de fluorescência pelo uso do kit *Qubit*, conforme as recomendações do fabricante.

4) Reação de ligação

O produto de PCR digerido e purificado foi ligado ao vetor digerido com a enzima T4 ligase numa reação padrão, contendo a enzima, o tampão, 50 ng de vetor e a quantidade necessárias do inserto para uma razão molar de 3:1. Utilizando a seguinte fórmula: Massa em ng do inserto = $3 \times (\text{o tamanho do inserto em pares de bases}) / (\text{tamanho do vetor em pares de bases}) \times \text{massa do vetor em ng}$. A reação foi incubada *overnight* a temperatura ambiente.

5) Transformação nas células DH5α

A transformação foi realizada nas células DH5α seguindo o seguinte protocolo: 5 µl da reação de ligação foram adicionados a uma alíquota de 50 µl das células competentes, incubado por 25 min no gelo, seguido por 5 min a 37°C e 2 min no gelo. Em seguida, adicionou-se 800 µl de meio de cultura LB-líquido e a solução foi deixada para recuperação das células transformadas a 37°C por 40 min com uma agitação de 225 rpm. Em seguida, foram plaqueados 200 µl das células em placas de LB-Ágar com Ampicilina (100 µg/mL) e as placas foram incubadas *overnight* a 37°C. Após o crescimento das colônias, algumas foram selecionadas para crescer em LB líquido contendo antibiótico por 16 h a 37°C, sob vigorosa agitação (250 rpm).

6) Minipreparação de plasmídeo pelo método de lise alcalina

Foram transferidos 1,5 mL da cultura bacteriana para um tubo de microcentrífuga e estes foram centrifugados durante 3 minutos a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e então novamente adicionou-se 1,5 mL da mesma cultura bacteriana nos tubos. Os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições e as células presentes no *pellet* foram

ressuspendidas em 600 µL de cultura bacteriana. Foram adicionados 100µl do *Cell Lysis Buffer* e homogeneizou-se os tubos por inversão. Depois foram acrescentados 350µl do *Neutralization Solution* gelado, e novamente homogeneizado por inversão, seguido de centrifugação a velocidade máxima por 3 min. O sobrenadante foi transferido para o *PureYield™ Minicolumn* e centrifugado a velocidade máxima por 1 min. O conteúdo dentro do tubo coletor foi descartado e foram adicionados 200µl do *Endotoxin Removal Wash (ERB)* e centrifugado a velocidade máxima por 1 min. O conteúdo dentro do tubo coletor foi descartado novamente e foram adicionados 400µl do *Column Wash Solution (CWC)* centrifugado a velocidade máxima por 1 min. Foram adicionados 40 µl de água isenta de nuclease dentro da coluna, e após 5 min, centrifugado a velocidade máxima por 1 min para obter o DNA.

7) Confirmação da Clonagem

A confirmação da clonagem foi feita por sequenciamento utilizando o DNA resultante do miniprep e o primer Forward: 5'-AAAAAATTTAAACATACAAATAGTGTATATAA-3' ou o Reverse: 5'-AAAAAACTCGAGTAAAGACACATGCACACGTA-3'. As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) utilizando-se 4µl de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl pH9,0, 10mM MgCl₂), 4µl de *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol dos oligonucleotídeos, e 4µl do DNA genômico a 5ng/µl. As reações de sequenciamento foram realizadas com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 s, com rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o primer forward e outra para o reverse.

8) Co-transfecção

Para analisar se a ligação do miR-451a ocorre de forma direta com seu gene alvo *SPC25*, foi feita uma co-transfecção entre o mimético do miR-451a ou o controle, com o vetor com a região 3'UTR do gene *SPC25*. Em placas de 96 poços foram plaqueadas as linhagens celulares na concentração de 1,5x10⁴ células/poço para Hep 3B e 1x10⁴ células/poço para PCL/PRF/5. A transfecção foi feita por 24h com *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando 10 μ M da sequência mimética do miR-451a (*Life Technologies, mirVanaTM miRNA Mimic*, código: 4464066) ou o controle (*Life Technologies, mirVanaTM miRNA Mimic Negative Control*, código: 4464058) e 300 ng de DNA vetor com a região 3'UTR do gene *SPC25*. Após o período de incubação, o meio contendo o complexo de transfecção foi retirado e substituído por meio de crescimento celular, DMEM+10%FBS+1%Anti-Anti, e deixamos em cultura por 48h até leitura com os reagentes da luciferase.

9) Dual-Glo® Luciferase Assay

O ensaio de luciferase foi realizado utilizando o kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, EUA). As placas foram removidas da estufa e deixadas no fluxo até as células cultivadas atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado a cada poço 75 μ l do reagente *Dual-Glo® Luciferase Assay Reagent*, misturado e deixado agir por 10 min para permitir a lise celular. Depois desse período, a luminescência do *firefly* foi medida um luminômetro. A próxima etapa foi a adição em cada poço de 75 μ l do reagente *Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent*, o qual foi misturado, deixado agir por menos 10 minutos e medido a luminescência da *Renilla*. A luminescência foi lida no *GloMax Explorer System* (Promega, EUA). O cálculo da atividade da luciferase deste ensaio foi realizado pela relação entre a luminescência do *Firefly* Luciferasa pela luminescência da *Renilla* Luciferasa. seguindo a seguintes fórmulas: Luminescência do Firefly do controle/ Luminescência da Renilla do controle; Luminescência do Firefly do vetor/ Luminescência da Renilla do vetor; Razão relativa: razão do vetor/razão do controle.

4.18. Análise estatística dos dados

Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 considerando uma diferença de 5% como estatisticamente significativa. Todos os dados passaram no teste de normalidade e foram expressos por média $\pm$ desvio padrão das réplicas técnicas e biológicas dos estudos funcionais. Os resultados da foram analisados pelo Teste t de Student pareado ou pelo teste de ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey para verificar as diferenças entre os tempos avaliados.

5. RESULTADOS

Será apresentada a seguir parte dos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto. Os resultados principais estão apresentados em forma de manuscrito no Anexo I. Além disso, no Capítulo II desta Dissertação estão apresentados os resultados de um projeto de estágio no Exterior, também na forma de manuscrito ainda em preparo para publicação.

5.1. Escolha do miR-451a para validação funcional

A análise de dados foi realizada a fim de determinar miRNAs comumente alterados em todos os conjuntos de dados (Ariede et al. 2017 , Meta-análise, TCGA). Essa análise resultou na identificação do miR-451a, o qual possui expressão significativamente diminuída nos três conjuntos de dados (**Figura 5.**). Além disso, o miR-451a tem sido demonstrado na literatura como regulador do processo de tumorigênese do CHC (90–92), entretanto muitos de seus genes-alvo ainda não foram validados, incluindo os genes-alvo selecionados nesse projeto.

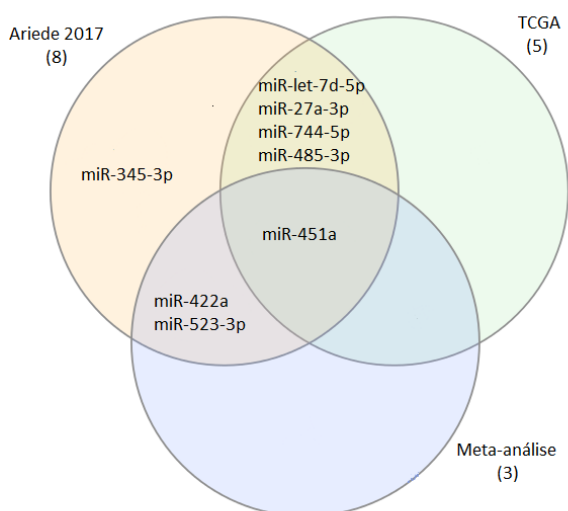


Figura 5. Diagrama de Venn com os microRNAs encontrados em mais de uma fonte de dado.

Heberle, H.; Meirelles, G. V.; da Silva, F. R.; Telles, G. P.; Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16:169 (2015).

5.2. A análise morfológica das linhagens celulares HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5 mostrou que as células estavam viáveis.

Examinar a morfologia das células em cultura é essencial para verificar se existem sinais de deterioração celular (granularidade ao redor do núcleo, descolamento das células do

substrato e vacuolização citoplasmática), contaminação celular visível, como por exemplo, pela presença de fungos, senescência da linhagem celular ou presença de substâncias tóxicas no meio (93).

A linhagem HEPG2 cresce por meio da formação de colônias aderentes, as quais promovem uma aparência de multicamada. As células possuem formato arredondado e citoplasma vacuolizado. A linhagem Hep 3B possui formato poliédrico com retículo endoplasmático granular e possui projeções citoplasmáticas. A linhagem PCL/PRF/5 possui formato poligonal e com retículo endoplasmático muito granular. A partir da análise da forma e aparência de cada linhagem, foi possível verificar que todas as linhagens possuem morfologia celular adequadas, sendo consideradas viáveis para os ensaios funcionais (**Figura 6**).

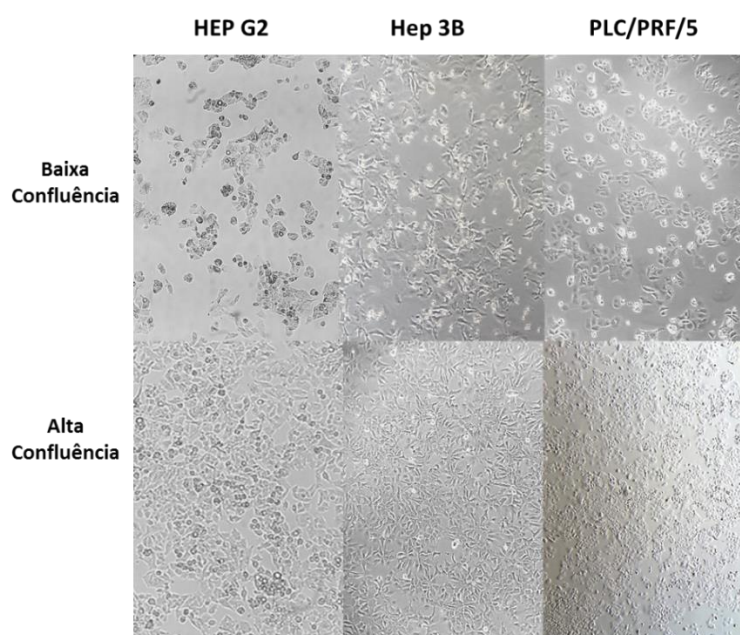


Figura 6. Morfologia das linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5) em baixa e alta confluência celular.

5.3. Teste de Exclusão por Azul de Tripan demonstrou que as linhagens celulares possuem viabilidade celular acima de 90%.

Análises de viabilidade celular antes e após a congelação são essenciais para avaliar a saúde celular, uma vez que, um aumento na viabilidade celular é acompanhado pelo crescimento celular, enquanto que a diminuição pode indicar os efeitos tóxicos dos compostos ou condições de cultura abaixo do ideal (93). Na **Figura 7** está representada a viabilidade celular de cada linhagem por meio do Teste de Exclusão por Azul de Tripan. Todas as

linhagens possuem viabilidade acima de 90%, demonstrando elas estavam viáveis para os ensaios funcionais.

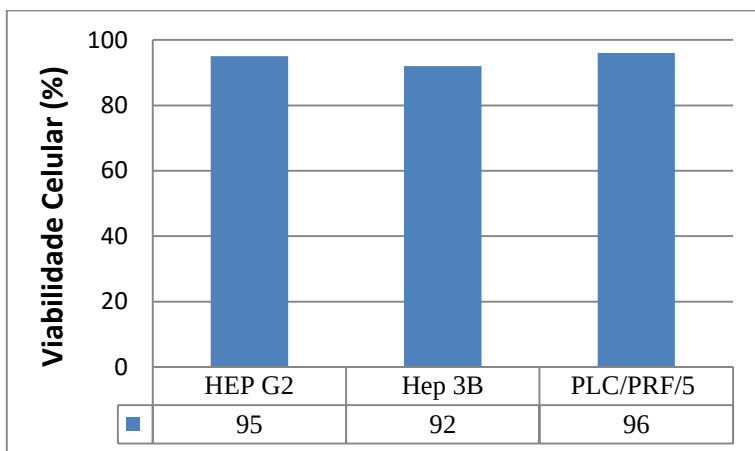


Figura 7. Viabilidade celular das linhagens HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5, por Teste de Exclusão por Azul de Tripán. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem conforme a seguinte fórmula: viabilidade celular (%) = número de células vivas x 100/ número de células totais (células vivas e mortas).

5.4. Teste de contaminação por *Mycoplasma* confirmou ausência de contaminação.

A análise das linhagens celulares confirmou que a HEP G2, Hep 3B e PCL/PRF/5 estavam livres de contaminação por *Mycoplasma*. O resultado foi visualizado em gel de agarose a 1,5%. Na **Figura 8** é possível observar que todas as amostras possuem amplificação em 191pb, controle interno (seta em vermelho), e que apenas o controle positivo possui amplificação em 270pb, banda a qual indica contaminação.



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. *Ladder* de 100pb; Controle Negativo (C-) e Controle Positivo (C+).

5.5. A análise de *Short Tandem Repeats (STR)* confirmou a autenticidade das linhagens celulares.

A autenticidade celular de uma linhagem é essencial para garantir que as células em cultura não sofreram alterações genótípicas ou contaminações cruzadas com outras linhagens. A análise de sequências curtas repetidas em tandem (*short tandem repeats* ou STR) é uma ferramenta essencial na determinação da identidade e singularidade de uma linhagem celular, uma vez que permite comparar o perfil de DNA de linhagens celulares com o perfil descrito na literatura (94).

A **Tabela 4** e a **Figura 9** mostram os resultados da análise de STR utilizando o software *GeneMarker* (softgenetics.com/GeneMarker.php). Esses dados foram comparados com os perfis de STR dos bancos de dados do ATCC e DMSZ (**Figura 10**), sendo que o examinador era cego para a identidade das linhagens, a qual foi revelada apenas após a geração dos resultados. As linhagens HEP G2 e Hep 3B mostraram ser 100% idênticas às linhagens celulares originais e PCL/PRF/5 mostrou 89% de identidade.

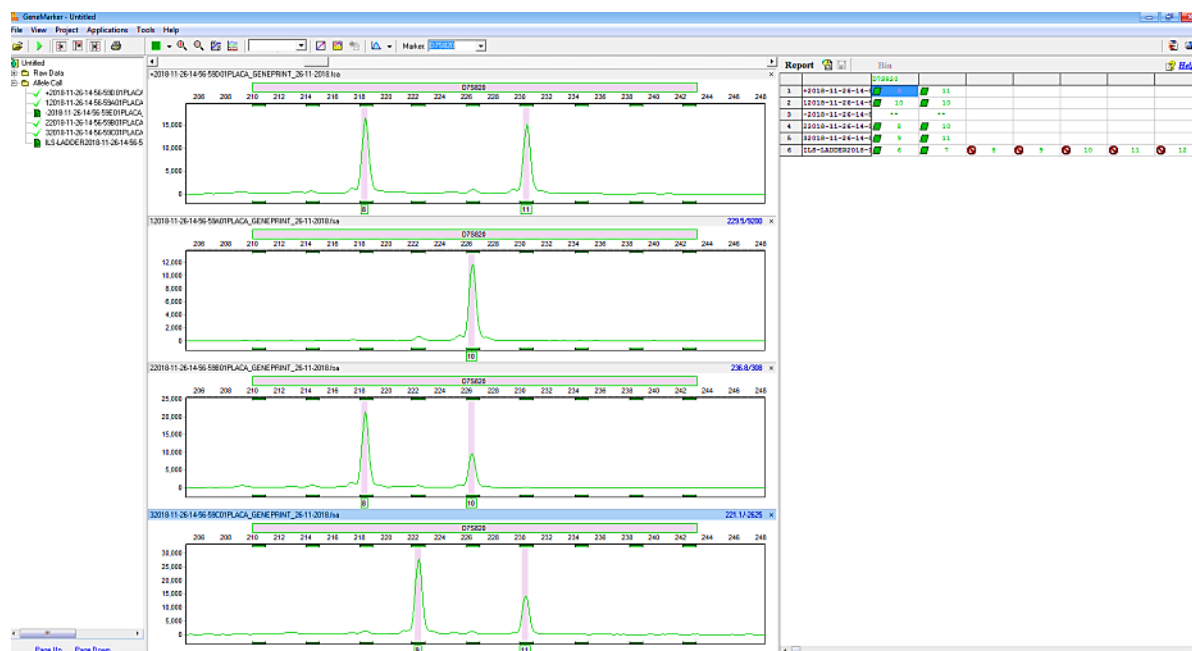


Figura 9. Exemplo representativo de dados de sequenciamento obtidos do GeneMarker para o marcador D7S820. Painel superior é a amostra de controle positivo com picos contendo 8 e 11 repetições. O segundo painel mostra 10 e 10 repetições do mesmo marcador na linhagem celular HEP

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.

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

Locus	HEP G2	HEP 3B	PCL/PRF/5
D5S818	11,12	13,13	12,12
D13S317	9,13	12,14	11,12
D7S820	10,10	8,10	9,11
D16S539	12,13	10,10	13,13
VWA	17,17	17,17	16,16
TH01	9,9	6,7	8,8
AM	X,Y	X,X	X,X
TPOX	8,9	9,9	5,8
CSF1PO	10,11	8,8	10,10
Autenticidade	100%	100%	89%

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
	Query (Your Cell)		13,13	12,14	8,10	10,10	17,17	6,7	X,X	9,9	8,8
1.00(36/36)	93	HEP-3B	13,13	12,14	8,10	10,10	17,17	6,7	X,X	9,9	8,8
1.00(36/36)	HB-8064	Hep 3B2.1-7 [Hep 3B, Hep-3B, Hep3B]	13,13	12,14	8,10	10,10	17,17	6,7	X,X	9,9	8,8

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
	Query (Your Cell)		12,12	11,12	9,11	13,13	16,16	8,8	X,X	5,8	10,10
0.89(32/36)	CRL-8024	PLC/PRF/5	12,12	11,12	9,11	13,13	15,16	8,8	X,X	8,8	10,10
0.83(30/36)	IFO50069	Alexander cells	12,12	11,12	9,11	13,13	15,16	7,8	X,X	8,8	10,10
0.83(30/36)	JCRB0406	PLC/PRF/5	12,12	11,12	9,11	13,13	15,16	7,8	X,X	8,8	10,10

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
	Query (Your Cell)		11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	180	HEP-G2	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	CRL-11997	HEP G2/2.2.1	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	HB-8065	Hep G2	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	HB-8065.1	HepG2/SF	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	JCRB1054	Hep G2	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	RCB1648	Hep G2	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
1.00(36/36)	RCB1886	Hep G2	11,12	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
0.94(34/36)	CRL-10741	C3A [HepG2/C3A, derivative of Hep G2 (ATCC HB-8065)]	11,13	9,13	10,10	12,13	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11
0.94(34/36)	RCB1681	GS-HepG2	11,12	9,13	10,10	12,12	17,17	9,9	X,Y	8,9	10,11

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.

5.6. Curva de Crescimento Celular

A análise da curva de crescimento celular é essencial para fornecer informações sobre o tempo de divisão de cada linhagem celular e a resposta da cultura a um estímulo. Quantificar o crescimento de uma cultura celular é importante para determinar o melhor momento para sub-cultura e a eficiência estimada de plaqueamento em várias densidades celulares. De acordo com os dados obtidos na **Figura 11**, estipulamos o número de 2×10^5 células/poço para HEP G2 (**11A**), $1,5 \times 10^5$ células/poço para Hep 3B (**11B**) e $1,2 \times 10^5$ células/poço para PCL/PRF/5 (**11C**) para os experimentos de transfecção.

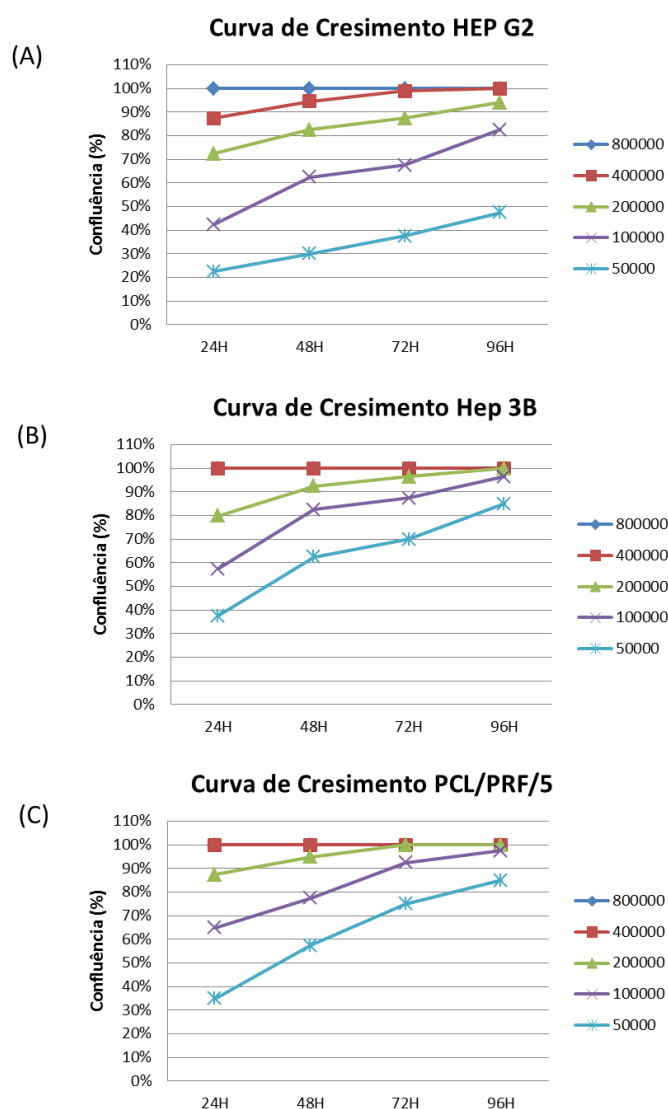


Figura 11. Curva de Crescimento das células HEP G2 (A), Hep 3B (B) e PCL/PRF/5 (C), expressa em porcentagem de confluência da monocamada (porcentagem de área ocupada pela monocamada em relação à área da superfície livre total do poço de 1,9 cm² da placa de cultura), nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após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

5.7. Confirmação da transfecção do mimic do miR-451a.

A eficiência da transfecção do miR-451a nas linhagens celulares foi testada por *stem-loop RT-qPCR*, utilizando o U6 como controle endógeno de normalização dos dados. A sequência e as concentrações dos primers utilizados na RT-qPCR são mostradas na **Tabela 5**. Na **Figura 12. (A, B, C)** é possível observar que nas três linhagens celulares apenas o tratamento com o mimético do miR-451a teve aumento significativo na expressão do miRNA, demonstrando que nem o veículo de transfecção, (lipofectamina) nem o Controle Negativo

interferem com a expressão do miR-451a. Além disso, os tratamentos de 24 e 48h de transfecção do mimético do miR-451a não tiveram diferença significativa entre eles. Assim, os próximos ensaios serão feitos utilizando 24h de transfecção e apenas o controle negativo como referência.

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

Nome	Sequência
Steam-loop RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACTCA-3' (1 µM)
Forward miR-451a	5'-CGGCGGAACCGTTACCATTAC-3' (800 nM)
Universal reverse primer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (10 µM)
Forward RNU6B	5'-GCAAATTCGTGAAGCGTTCC-3' (600 nM)

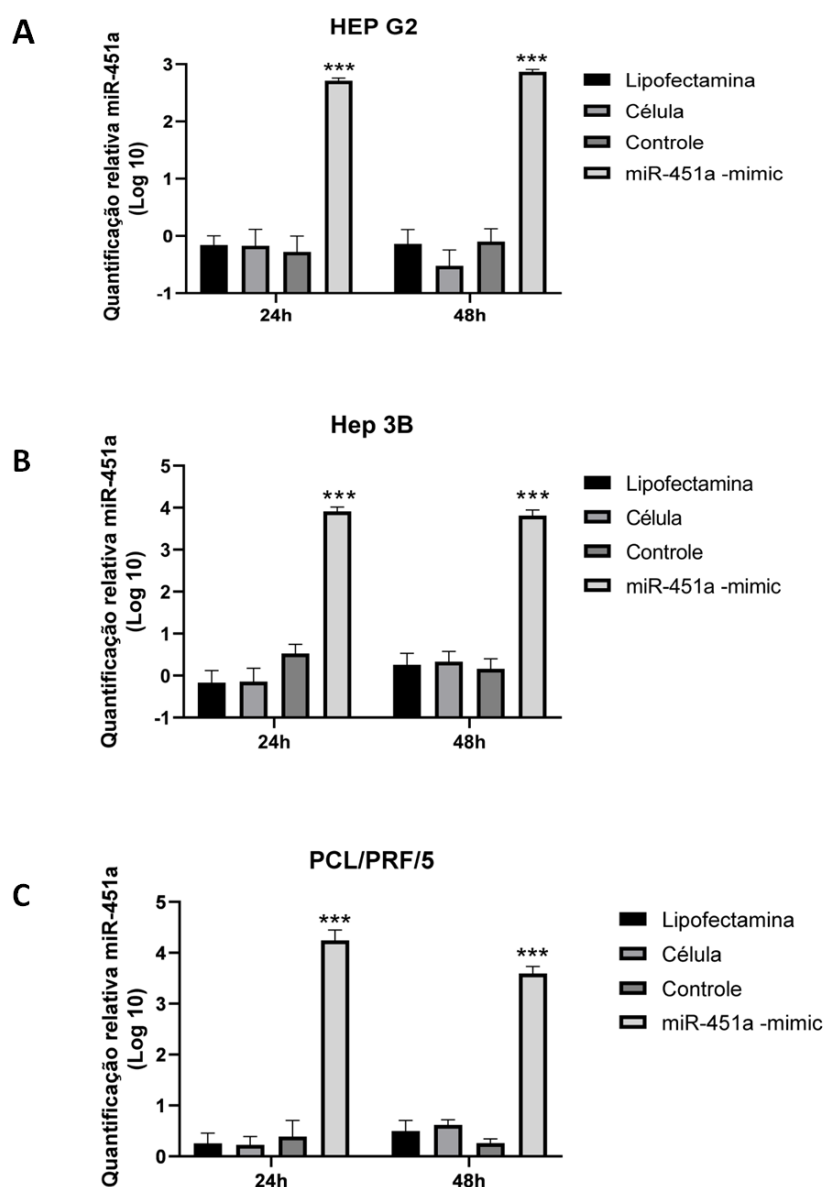


Figura 12. Análise da expressão do miR-451a por RT-qPCR, 24 e 48h após transfecção da molécula de miR-451a mimic. **(A)** HEP G2; **(B)** Hep 3B; **(C)** PCL/PRF/5. Todas as amostras foram normalizadas com o controle endógeno U6. Os dados estão representados em Log_{10} . Os dados estão representados por quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$).

5.8. Análise da expressão dos genes-alvo.

A sequência e as concentrações dos primers dos genes-alvo do miR-451a utilizados na RT-QPCR são mostradas na **Tabela 6**. Para normalização dos dados foram testados os seguintes endógenos: *B2M*, *HPRT1*, *GAPDH*, e *RPS13*. A sequência e as concentrações dos primers dos endógenos são mostradas na **Tabela 7**. O endógeno *B2M* foi o

que possui menor variação entre as amostras sendo utilizado para normalização de todos os genes.

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

Nome	Sequência e concentração do Primer <i>Foward</i>	Sequência e concentração do Primer <i>Reverse</i>
<i>SPC25</i>	5'-GGGCCTAGCAGAATTTCAAGAGA-3' (600 nM)	5'-CGAACATTGGCAAGAAAAGCT-3' (600 nM)
<i>BUB1B</i>	5'-AGGTGGCCGGTTTGTAGG-3' (600 nM)	5'-TGCCCTCGGAGCTACAGAAG-3' (800 nM)
<i>FMNL3</i>	5'-CTAAGGGCCGTGGAAGCTT-3' (800 nM)	5'-CTAACCGTTCCCCAGGCTTT-3' (600 nM)
<i>KIF2A</i>	5'-CAAGCCAGCAAGCAAATCAA-3' (800 nM)	5'-GCAGCAAATGCCGGTTTAAA-3' (800 nM)
<i>PLEKHG2</i>	5'-TCAGGTCGTGGAGACAAAAGG-3' (800 nM)	5'-GGCATACCACTGCTGGAACA-3' (800 nM)
<i>BAK1</i>	5'-CCCAGGACACAGAGGAGGTTT-3' (800 nM)	5'-GCCTCCTGTTCTGTGATG-3' (800 nM)
<i>CDKN2B</i>	5'-CGAAACACAGAGAAGCGGATT-3' (800 nM)	5'-AAGCAAACGACCCCTGGAA-3' (800 nM)
<i>RRAGD</i>	5'-TTGGGCTCAAGGGATCCTT-3' (400 nM)	5'-TGTTGTGCACACCTGTAGTTCT-3' (400 nM)
<i>CSE1L</i>	5'-TTTGACTAATCTTTTAAAGGCCACTATTG-3' (800 nM)	5'-CTCAGGGCAGAGGCATCATT-3' (800 nM)
<i>HELLS</i>	5'-AAGGGACTTTGCAGATTCATCCT-3' (800 nM)	5'-CATTTGGTCTCTCATGGCTATT-3' (800 nM)
<i>HMGB2</i>	5'-CCCGGACTCTTCCGTCAA-3' (600 nM)	5'-TCCATCTCTCCGAACACTTCTTG-3' (600 nM)
<i>MEF2D</i>	5'-GGACCCCCGGAGAAGATG-3' (600 nM)	5'-CGCTCGTCGGTGATTTCG-3' (600 nM)

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

Nome	Sequência e concentração do Primer <i>Foward</i>	Sequência e concentração do Primer <i>Reverse</i>
<i>B2M</i>	5'-GTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' (600 nM)	5'-TGAAACCCAGACATAGCAATTC-3' (600 nM)
<i>HPRT1</i>	5'-TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG-3' (800 nM)	5'-GGCCTCCCATCTCCTTCATC-3' (800 nM)
<i>GAPDH</i>	5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3' (400 nM)	5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3' (400 nM)
<i>RPS13</i>	5'-CCAGTCGGCTTTACCCTATCG-3' (600 nM)	5'-TGTGCAACACCATGTGAATCTC-3' (600 nM)

Na **Figura 13** é possível verificar o resultado da RT-qPCR para os genes alvo do miR-451a que tiveram uma diminuição significativa da expressão após transfecção do mimético do miR-451a. Todos os primers foram testados e estão mostrados apenas os genes que obtiveram diferença significativa. Como o gene *SPC25* possui uma diferença significativa maior ($p < 0.01$) na linhagem Hep 3B, ele foi selecionado para o ensaio de luciferase, uma vez que um alvo direto do miR-451a irá levar a inibição da tradução ou degradação RNAm.

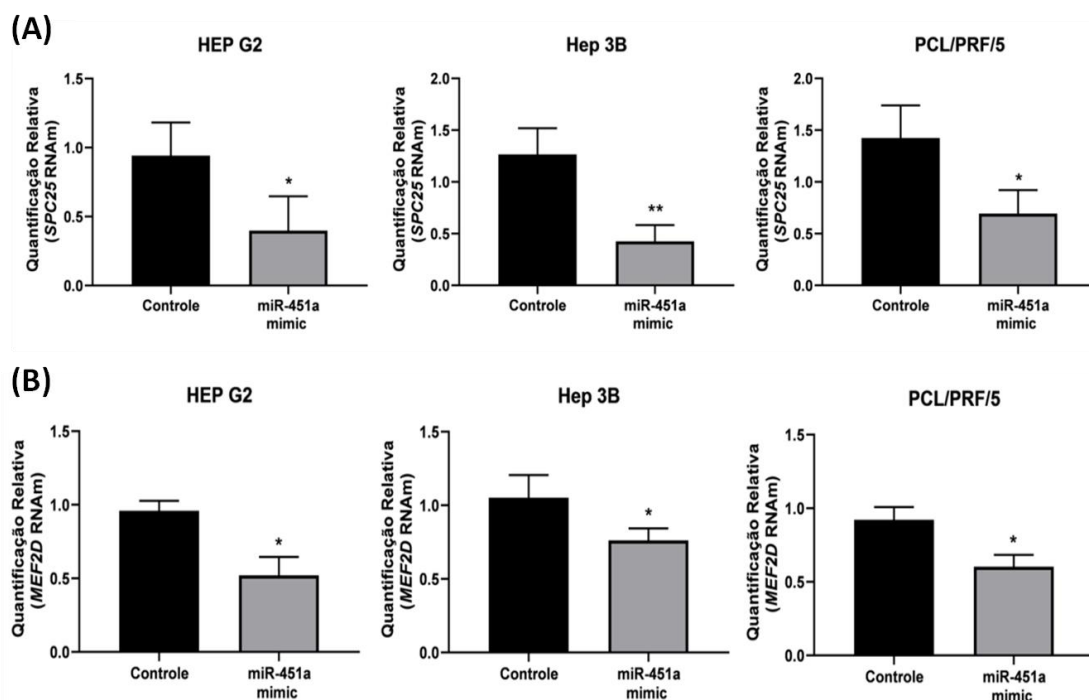


Figura 13. Análise da expressão do genes-alvo do miR-451a por RT-qPCR, 24h após transfecção da molécula de miR-451a mimic quando comparado ao controle. (A) *SPC25* (B) *MEF2D*. Todas as amostras foram normalizadas com o controle endógeno *B2M*. Os dados estão representados por quantificação relativa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

5.9. Linhagem HEP G2

Segundo Terrada e cols., a linhagem celular HEP G2, criada em 1979 por Barbara Knowles e cols. (95), foi erroneamente classificada como sendo derivada de um carcinoma hepatocelular (96). Terrada e cols. analisaram o histórico histopatológico do tumor do qual a HEP G2 foi estabelecida e verificaram que esta linhagem foi estabelecida a partir de um tumor classificado como hepatoblastoma epitelial. Além disso, estes autores avaliaram o perfil genômico da HEP G2 por hibridização genômica comparativa (CGH) e detectaram várias alterações características/frequentemente encontradas em hepatoblastoma. Entre estas alterações, perdas da região de 4q3, trissomias dos cromossomos 2 e 20 e deleção do exon 3 do gene da β -catenina (*CTNNB1*) (96). Por serem doenças distintas, o HB e o CHC possuem alterações genéticas diferentes (97). Estas diferenças no perfil genômico dos tumores (HB e CHC) podem levar a diferenças nas respostas à alterações em moléculas reguladoras, como, por exemplo, miRNAs. Por esses motivos, a linhagem HEP G2 não foi utilizado nos próximos experimentos.

Os outros resultados estão apresentados na forma de artigo científico no Anexo 1.

6. REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, 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(6):394–424.
2. American Cancer Society I. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2018*. Atlanta: American Cancer Society; 2018. *Bmj*. 2018;309(6970):1689.
3. Câncer de fígado | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. [citado 14 de março de 2019]. Available at: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>
4. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. O Fígados e as Vias Biliares, In: Robbins e Coltran. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 968–972 p.
5. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The Etiology of Hepatocellular Carcinoma and Consequences for Treatment. *Oncologist*. 2010;15(Supplement 4):14–22.
6. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4300–8.
7. Parikh S, Hyman D. Hepatocellular Cancer: A Guide for the Internist. *Am J Med*. 2007;120(3):194–202.
8. Okuda H. Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis. 2007;21(1):161–73.
9. Report M. Apoptosis and the Liver : A Mechanism of Disease , Growth Regulation , and Carcinogenesis. :811–5.
10. Serag HBEL, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epide-miology and molecular carcinogenesis. *Rev BASIC Clin Gastroenterol*. 2007;(Figure 1):2557–76.
11. Serag HB El. Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;(134):1752–63.
12. Bruix J, Sherman M. Management of Hepatocellular Carcinoma : An Update. *Hepatology*. 2011;53(3):2–4.
13. Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M. Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Hepatol Int*. 2008;2(1):17–30.
14. Yilmaz N, Yilmaz UE, Suer K, Goral V, Cakir N. Screening for hepatocellular carcinoma : summary of current guidelines up to 2018. *Hepatoma Res*. 2018;4(46).
15. Childs A, Meyer T. Hepatocellular Carcinoma Treatment & Management: Approach Considerations, Nonoperative Therapy, Surgical Therapy. *Evidence-based Gastroenterol Hepatol* 4e. 2019;703–14.
16. Pelo T, Milão CDE, Sá GPD, Vicentine FPP, Salzedas-netto AA, Adriana C, et al. O transplante hepático por hepatocarcinoma na era meld em São Paulo: análise de 414 casos transplantados pelo critério de Milão/Brasil. 2016;29(4):240–5.
17. Hilgard P, Gane E, Blanc J, Oliveira AC De, Santoro A, Raoul J, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *new Engl J Med Orig*. 2008;359:378–90.
18. Okusaka T, Ikeda M. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma : current status and future perspectives. *ESMO cancer horizons*. 2018;3:1–6.
19. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Ludmil B, Ligue EL. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505–11.
20. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*. 2013;4(3318):1–6.

21. Omagnolo AR, Illuart PIB, Nge CL. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Med Sci.* 1998;95:8847–51.
22. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014;1–10.
23. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ HC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature.* 1991;350(6317):427–8.
24. Ahn S, Jang SJ, Shim JH, Kim D, Hong S, Sung CO, et al. Genomic Portrait of Resectable Hepatocellular Carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 Aberrations for Patient Stratification. *Hepatology.* 2014;60(6):1972–82.
25. Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zhao A, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by oncogenomic screening. *Cancer Cell.* 2012;19(3):347–58.
26. Nault J-C, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular carcinoma: The next generation Jean-Charles. *J Hepatol.* 2014;60(1):224–6.
27. MacFarlane L-A, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010;11(7):537–61.
28. Leva G Di, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2006;78(2):180–9.
29. Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget.* 2017;8(63):107167–75.
30. Rivera J. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(11):144–1455.
31. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9(AUG):1–12.
32. Rocha W, Verreault A, Almouzni G, Paik J, Carey M, Workman JL, et al. Activation : MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science.* 2007;(December):1931–4.
33. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(8):2697–706.
34. 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.
35. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003;115(2):209–16.
36. Marco A, MacPherson JI, Ronshaugen M, Griffiths-Jones S. MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence [Internet].* 2012;3(1):1. Available at: Silence
37. 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.
38. Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1(November 2015).
39. Liyanage T, Masterson AN, Oyem HH, Kaimakliotis H, Nguyen H, Sardar R. Plasmoelctronic-Based Ultrasensitive Assay of Tumor Suppressor microRNAs Directly in Patient Plasma: Design of Highly Specific Early Cancer Diagnostic Technology. *Anal Chem.* 2019;91(3):1894–903.
40. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):0404–18.
41. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Cold Spring Harb Lab Press Sept.* 2009;17:515–

- 24.
42. Bartel D. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function Review. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
43. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene*. 2006;25(46):6220–7.
44. Rinaldi A, Poretti G, Kwee I, Zucca E, Catapano C, Tibiletti MG, et al. Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma [2]. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(2):410–2.
45. Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2010;9:1–13.
46. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008;283(2):1026–33.
47. Fabbri M, Roldo C, Sever NI, Wojcik SE, Shimizu M, Garzon R, et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793–801.
48. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Rna*. 2008;14(11):2348–60.
49. Su H-Y, Chen W-J, Chen WJ, Lee Y-C, Yu S-L, Liu C-C, et al. MicroRNA Signature Predicts Survival and Relapse in Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(1):48–57.
50. Nimmo RA, Slack FJ. An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer. *Chromosoma*. 2015;118(4):405–18.
51. Carlo M, Croce MD. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):704–14.
52. Barshack I, Chajut A, Kharenko O, Aharonov R, Gilad S, Lebanony D, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*. 2008;26(4):462–9.
53. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259–69.
54. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: Novel Biomarkers for Human Cancer. *Clin Chem*. 2009;55(4):623–31.
55. Wang J, Yu Y, Li B, Han Q, Jiang X, Zhu Y. Down-regulation of miR-214 contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by targeting Twist. *FEBS J*. 2012;279(13):2393–8.
56. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen W, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):430–41.
57. Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(2):77–87.
58. Huang B, Li H, Huang L, Luo C, Zhang Y. Clinical significance of microRNA 138 and cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *J Surg Res [Internet]*. 2015;193(2):718–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.076>
59. Chen E, Xu X, Liu R, Liu T. Small but Heavy Role: MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma Progression. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
60. Thurnherr T, Mah W, Lei Z, Jin Y, Rozen SG, Lee CG. Differentially Expressed miRNAs in Hepatocellular Carcinoma Target Genes in the Genetic Information Processing and Metabolism Pathways. *Nat Publ Gr*. 2016;(August 2015):1–12.
61. Awan FM, Naz A, Obaid A, Ali A, Ahmad J, Anjum S, et al. Identification of

- Circulating Biomarker Candidates for Hepatocellular Carcinoma (HCC): An Integrated Prioritization Approach. PLoS One [Internet]. 2015;10(9):e0138913. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414287>
62. Sidhu K, Kapoor NR, Pandey V, Kumar V. The “Macro” World of microRNAs in Hepatocellular Carcinoma. Front Oncol [Internet]. 2015;5(March):1–8. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00068/abstract>
 63. Ariede JR, Silva GF, Reis PP dos. MicroRNoma dos carcinomas de fígado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP); 217AD.
 64. Wang N, Wang Q, Shen D, Sun X, Cao X, Wu D. Downregulation of microRNA-122 promotes proliferation, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by activating epithelial–mesenchymal transition. Onco Targets Ther. 2016;9:2035–47.
 65. Bai J, Gao Y, Du Y, Yang X, Zhang X. MicroRNA-300 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells by downregulating CREPT/Wnt/ β -catenin signaling. Oncol Lett. 2019;18(4):3743–53.
 66. Gao D, Zhou Z, Huang H. miR-30b-3p Inhibits Proliferation and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells via Suppressing PI3K / Akt Pathway. Front Genet. 2019;10:1–10.
 67. Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. 2005;579:5904–10.
 68. Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a miRNA-target interactions. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(9):849–51.
 69. Easow G, Teleman AA, Cohen SM. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. RNA J. 2007;13(8):1198–204.
 70. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Zhu JY, Meister G. Identification of Human microRNA Targets From Isolated Argonaute Protein Complexes ND ES. RNA Biol. 2007;4(2).
 71. Vasudevan S. Functional validation of microRNA-target RNA interactions. Methods. 2012;58(2):126–34.
 72. Terry A V., Elton TS, Kuhn DE, Feldman DS, Martin MM, Nuovo GJ. Experimental validation of miRNA targets. Methods. 2007;44(1):47–54.
 73. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene. 2006;(25):2537–45.
 74. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PBS, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. Clin Cancer Res. 2010;16(3):867–75.
 75. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 2008;123(7):1616–22.
 76. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, et al. Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray. PLoS One. 2014;9(9):1–9.
 77. Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, et al. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. Liver Int. 2012;32(5):772–82.
 78. Sato F, Hatano E, Kitamura K, Myomoto A, Fujiwara T, Takizawa S, et al. MicroRNA profile predicts recurrence after resection in patients with hepatocellular carcinoma within the Milan criteria. PLoS One. 2011;6(1).
 79. Mizuguchi Y, Mishima T, Yokomuro S, Arima Y, Kawahigashi Y, Shigehara K, et al. Sequencing and bioinformatics-based analyses of the microRNA transcriptome in

- hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2011;6(1).
80. Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(4):1223–32.
81. 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.
82. Hirsch H, Bian CB, Higashi T, Nakagawa S, Zeleke TZ, Nair VD, et al. In vitro modeling of hepatocellular carcinoma molecular subtypes for anti-cancer drug assessment. *Exp Mol Med*. 2018;50(e419).
83. Velha V. Trypan Blue as an Affordable Marker for Automated Live-Dead Cell Analysis in Image Cytometry. 2016;38(June):857–63.
84. Tautz D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS*. 1993;67:21–8.
85. Reid Y, Storts D, Riss T, Minor L. Authentication of Human Cell Lines by STR DNA Profiling Analysis Flowchart: STR DNA Analysis for Human Cell Line Authentication Introduction. 2013;(Md):1–18.
86. 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.
87. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
89. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschla M. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res Mutat Res*. 2013;752:10–24.
90. 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).
91. Liu X, Zhang X, Xiang J, Lv YI, Shi J. miR-451 : Potential role as tumor suppressor of human hepatoma cell growth and invasion. 2014;739–45.
92. 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.
93. Geraghty RJ, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer [Internet]*. 2014;111(6):1021–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.166>
94. Chatterjee R. Cases of Mistaken Identity. *Sci Adv*. 2007;315:928–31.
95. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [15]. Vol. 282, *Nature*. 1979. p. 615–6.
96. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol [Internet]*. 2009;40(10):1512–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.003>
97. Buendia MA. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: Common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol*. 2002;39(5):530–5.

Anexo 1. Manuscrito: “*MiR-451a regulates spindle pole body component 25 expression and inhibits proliferation, migration and invasion in HCC cell lines.*”

MiR-451a regulates spindle pole body component 25 expression and inhibits proliferation, migration and invasion in HCC cell lines.

Carolina Fazio Campos^{1,2}, Fabio A. Marchi³, Tainara F. Felix², Márcio Carvalho⁴, Isabela G. F. Paiva^{5,6}, Diego P. Alonso^{5,6}, Paulo Eduardo Martins Ribolla^{5,6}, Sandra A. Drigo^{1,2}, Patricia P. Reis^{1,2}.

¹Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

²Experimental Research Unity (UNIPEX), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

³International Research Center, CIPE – A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

⁴Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

⁵Department of Genetics, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

⁶Biotechnology Institute (IBTEC), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common aggressive carcinoma of the liver and the fourth cause of cancer-related death. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate cell differentiation, cell cycle control, apoptosis, and proliferation. In HCC, miR-451a is downregulated and correlated with metastasis, advanced clinical stage (TNM grade) and worse disease-free survival. In this study, we combined *in silico* and functional analyses to reveal novel miR-451a target genes involved in hepatocellular carcinogenesis. **Material and Methods:** Bioinformatic analyses were performed using microRNA Data Integration Portal (mirDIP), The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) HCC dataset, miRTarBase and ToppGene to predict and select miR-451a target genes. The HCC cell lines (Hep 3B and PCL/PRF/5) were transfected with miR-451a mimic or control to perform the functional experiments. Differential expression of miR-451a and their target genes were confirmed by qRT-PCR. Luciferase assay was performed to confirm the interaction between miR-451a and target gene. Proliferation, migration and invasion assays were performed in HCC cell lines. **Results:** *In silico* analysis revealed 12 putative miR-451a target genes in HCC tumorigenesis which were not previously experimental validated: *FMNL3*, *BUB1B*, *SPC25*, *KIF2A*, *PLEKHG2*, *BAK1*, *HMGB2*, *MEF2D*, *CDKN2B*, *HELLS*, *RRAGD* and *CSE1L*. The Hep 3B and PCL/PRF/5 cell lines transfected with miR-451a mimic showed increased expression of miR-451a and significant decrease ($p < 0.05$) of *SPC25* expression. Luciferase assay confirmed that the gene *SPC25* is a direct target of miR-451a. The restoration of miR-451a leads to decreasing of proliferation, migration and invasion in both HCC cell lines. **Conclusion:** miR-451a directly targets *SPC25* and regulates proliferation, migration and invasion in the HCC cell lines. These findings suggest the miR-451a is related to HCC tumorigenesis and progression and can be a potential target for HCC therapy by targeting *SPC25*.

Keywords: hepatocellular carcinoma; miR-451a; *SPC25*; molecular pathways; tumor cell lines; functional validation.

INTRODUCTION

Worldwide, liver cancer is ranked as the sixth most common cancer and the fourth cause of cancer-related death, with 841,000 new cases and 782,000 deaths annually. Hepatocellular carcinoma (HCC) includes the majority of primary liver cancers (1) and have a 5-year survival of 18% (2). HCC is a complex disease that has a multistep process involving intense inflammatory damage, with hepatocyte necrosis and regeneration, resulting in a fibrotic deposition. Distinct genetic and epigenetic modifications lead to tumour heterogeneity, both intra-tumoral heterogeneity and between different lesions, contributing to tumour aggressiveness and drug resistance (3,4).

The molecular mechanisms underlying HCC pathogenesis have not been fully understood. Early studies have focused on protein-coding genes, however emerging evidence also indicate the important role of several classes of structurally and functionally different non-coding RNAs in HCC, such as microRNAs (5).

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small, endogenous, and non-coding RNA molecules (~22 nucleotides in length). MiRNAs negatively regulate the gene expression at the posttranscriptional level, binding to the 3' untranslated region (3' UTR) of their target mRNAs resulting in mRNA translational inhibition or degradation (6). Compelling evidence has demonstrated that miRNA expression is dysregulated in cancer and can act as oncogene or tumour suppressor, affecting the regulation of several cellular processes including cell differentiation, cell cycle control, apoptosis, and proliferation (7). Once most of the mRNAs have only partial base complementarity with their corresponding miRNAs, a single miRNA can target several different mRNAs and influence the expression of genes involved in different molecular mechanisms (8).

miR-451 is dysregulated in human cancers and plays a critical role in tumour development and progression (9). In HCC, miR-451a is downregulated in cell lines and tissues, acting as a tumour suppressor (10–12). Moreover, miR-451a has been correlated with metastasis, advanced clinical stage (TNM grade) and worse disease-free survival in HCC (12,13). miR-451 restoration leads to the suppression of proliferation and colony formation (14), reduction of cell growth, migration and invasion and activation of apoptosis (15), and decrease of tumour growth and angiogenesis in HCC cell lines (16).

The ability to modulate miRNA activity using the miRNA mimics or inhibitor approaches can provide an opportunity to use specific miRNAs as biomarkers to cancer diagnosis, prognosis, and therapeutic targets (17). Here, we analysed the effect of miR-451a

in the proliferation, migration, and invasion in HCC cell lines, and evaluated novel target genes related to hepatocellular carcinogenesis using in silico analyses and functional validation.

MATERIAL AND METHODS

Bioinformatic analysis

The microRNA Data Integration Portal (mirDIP) (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (18) was used to predict the miR-451a target genes, using Very High and High score class. The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) data were assessed to detect the expression levels of the putative target genes of miR-451a in HCC samples. The list of deregulated genes was further compared with miRTarBase database (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). In order to identify novel target genes, previously experimentally validated genes were excluded. Sequentially, the data was filtered by: inverse correlation (genes upregulated and miR-451a downregulated), Fold Change - FC ≥ 1.5 ; p-value - $p \leq 0.05$; and False Discovery Rate - FDR < 0.05 . In addition, the selected target genes were then analysed in the ToppGene (<https://toppgene.cchmc.org/>) to identify pathways that can be related to HCC development and progress. **Figure 1** shows a detailed strategy to select miR-451a target genes for functional validation.

Cell culture

HCC cell lines Hep 3B (ATCC HB-8064) and PCL/PRF/5 (ATCC CRL-8024) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). The cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, USA) and 1% Antimycotic (100X) (Thermo Fisher Scientific, USA) at 37°C and 5% CO₂.

Oligonucleotides transfection

The miR-451a mimic (Life Technologies, mirVana™ miRNA Mimic, code: 4464066) or the respective negative control (Life Technologies, mirVana™ miRNA mimic negative control, code: 4464058) were transfected for 24h in the cell lines using RNAiMAX lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, USA) diluted in Opti-MEM reduced serum medium (Thermo Fisher Scientific, USA) when the cells were 70-80% confluent. All experiments were performed in triplicate.

RT-qPCR for the detection of miRNA and mRNA.

Total-RNA from the cultured cells was isolated using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), as recommended by the manufacturer. NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to determine RNA quantification and quality.

miRNA detection was performed according to the Gasic et. al. protocol (19) and the stem-loop RT primers were designed as described by Chen et. al. previously (20) (**Table 1**). The cDNA was synthesized using the SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen) following the manufacturer instructions. Data were normalized using the small RNA MammU6 (RNU6B).

For the mRNA detection, the primers were designed using Primer Express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) (**Table 2**) and reverse transcribed into cDNA by High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) following the manufacturer protocol. qPCR data were normalized to the *B2M* reference gene.

miRNA and target genes expression were assessed using SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) in the QuantStudio™ 12K Flex System (Thermo Fisher Scientific, USA). The results were analysed in Expression Suite Software v1.0.3 (Thermo Fisher Scientific, USA) and the relative quantification was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and significance was accepted at p-value < 0.05 (19).

Table 1. Primer sequences used for miR-451a quantification by RT-qPCR.

Name	Sequence
Stem-loop RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTCA-3'
Forward miR-451a	5'-CGGCGGAACCGTTACCATTAC-3'
Universal reverse primer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
Forward RNU6B	5'-GCAAATTCGTGAAGCGTTCC-3'

Table 2. Primer sequences used for target gene quantification by RT-qPCR.

Name	Primer Forward Sequence	Primer Reverse Sequence
<i>SPC25</i>	5'-GGGCCTAGCAGAATTTCAAGAGA-3'	5'-CGAACATTGGCAAGAAAAGCT-3'
<i>BUB1B</i>	5'-AGGTGGCCGGTTTGTAGG-3'	5'-TGCCCTCGGAGCTACAGAAG-3'
<i>FMNL3</i>	5'-CTAAGGGCCGTGGAAGCTT-3'	5'-CTAACCGTTCCCCAGGCTTT-3'
<i>KIF2A</i>	5'-CAAGCCAGCAAGCAAATCAA-3'	5'-GCAGCAAATGCCGGTTTAAA-3'
<i>PLEKHG2</i>	5'-TCAGGTCGTGGAGACAAAAGG-3'	5'-GGCATACCACTGCTGGAACA-3'
<i>BAK1</i>	5'-CCCAGGACACAGAGGAGGTTT-3'	5'-GCCTCCTGTTCTGCTGATG-3'
<i>CDKN2B</i>	5'-CGAAACACAGAGAAGCGGATT-3'	5'-AAGCAAACGACCCCTGGAA-3'
<i>RRAGD</i>	5'-TTGGGCTCAAGGGATCCTT-3'	5'-TGGTTGTGCACACCTGTAGTTCT-3'
<i>CSE1L</i>	5'-TTTGAATAATCTTTTAAAGGCCACTATTG-3'	5'-CTCAGGGCAGAGGCATCATT-3'

<i>HELLS</i>	5'-AAGGGACTTTGCAGATTCATCCT-3'	5'-CATTCGGTCTCTCATGGCTATT-3'
<i>HMGB2</i>	5'-CCCGGACTCTTCCGTCAA-3'	5'-TCCATCTCTCCGAACACTTCTTG-3'
<i>MEF2D</i>	5'-GGACCCCCGGAGAAGATG-3'	5'-CGCTCGTCGGTGATTG-3'
<i>B2M</i>	5'-GTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3'	5'-TGAAACCCAGACATAGCAATTC-3'

Plasmid construction

DNA samples from the Hep 3B and PCL/PRF/5 cell lines were extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and used to isolate the gene sequence of interest. The 3'UTR region of the *SPC25* gene was amplified by PCR using the primers: F:5'-AAAAAATTAAACATACAAATAGTGTATATAA-3' and F:5'-AAAAAACTCGAGTAAAGACACATGCACACGTA-3'; and the following cycle conditions: 95 ° C for 2 min, 95 ° C for 30 s, 51 ° C for 30 s, 72 ° C for 30 s, 72 ° C for 30 s, 72 ° C for 5 min. The sequences were cloned in the pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, USA) using DH5 α Competent Cells (Thermo Fisher Scientific, USA), according to the manufacturer's recommendations. The cloning was confirmed by sequencing (**Supplementary Figure 1**).

Luciferase reporter assays

The cells were seed in a 96-well plate and co-transfected, for 24h, with 300 ng of plasmid pmir-GLO-3'UTR-SPC25 and 10 μ M miR-451a mimic or negative control, using RNAiMAX lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, USA). The luciferase assay was performed 48h after the transfection using Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, USA), according the manufacturer's instructions, and measured using GloMax Explorer System (Promega, USA).

Cell proliferation assay

Cell proliferation after transfection was evaluated by Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, USA). The cells were seeded in a 96-well plate and after 0 h, 24h, 48 h and 72 h, 20 μ l of [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] were added in 100 μ l of DMEM (Thermo Fisher Scientific, USA) and incubated for 2 h before reading using a microplate reader Synergy/HT (Biotek, USA) at a wavelength of 490 nm.

Migration assay

The cell migration was evaluated by wound healing assay. The cells were seeded in a 24-well plate in DMEM supplemented with 2% SFB and 1% antimycotic. After transfection, the cells were cultivated at 37°C and 5% CO₂ until they reached 90-100% of confluence. Subsequently, a scratch was generated in each plate using a 200-μl plastic tip and the cell debris was removed by washing three times with PBS. The wound open area was photographed and analysed at 0 h, 24 h and 48 h using the equation: % wound healing = $[100 - (\text{wound area at Tnh}/\text{wound area at T0h})] \times 100$, where T0h is the time point immediately after the scratch (0h) and Tnh is the time point after the scratch (24h and 48h) (21). Measurement analyses were performed using the ImageJ® program (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Invasion assay

The cell invasion was evaluated by transwell assay using the kit QCM ECMatrix Cell Invasion Assay (Sigma-Aldrich, EUA). The cells were seeded in a 24-well plate and, after the transfection, 1000 μl of the serum-free DMEM were added for each well, and then incubated for 2 h to promote cell starving. The inserts were rehydrated with 300 μl of serum-free DMEM for 2 h, and after that, 300 μl of cell suspension ($0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ transfected cells) were added inside the insert. In the lower chamber, 500 μl of DMEM with 20% SFB were added as chemoattractant. After 24h, the fixation process was performed: 4% formaldehyde for 2 min, 100% methanol for 20 min, and stain solution (provided in the kit) for 15 min; the insert was washed twice with PBS between each step. The non-invasive cells were removed using a cotton swab. The analysis of the invasive cells was performed by counting ten different visual fields that were photographed using an optical microscope with a 10X magnification.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 8 software. All data were normally distributed and reported as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of the technical and biological replicates. The data were analysed with the paired Student's t-test and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Selection of miR-451a target genes

Bioinformatics analyses were performed to select miR-451a target genes with biological relevance for HCC tumorigenesis for further functional validation (**Figure 1**). mirDIP identified 458 predicted target genes with very high and high score class (**Supplementary Table 1**). Next, predicted target genes were evaluated in TCGA dataset to identify those deregulated in HCC samples. To reveal novel miR-451a targets, genes that have already experimentally validated according to miRTarBase were excluded, resulting in 258 genes (**Supplementary Table 2**). After these analyses, only genes showing inverse correlation with miR-451a expression levels were selected, (genes with increased expression and miR-451a with decreased expression), finding 132 genes (**Supplementary Table 3**). Gene list were filtered by $p \leq 0.05$; $FC \geq 1.5$ and $FDR < 0.05$, resulting in 59 genes (**Supplementary Table 4**). Furthermore, the 59 target genes were submitted to molecular pathway enrichment analysis by ToppGene (**Supplementary Table 5**). Twelve genes participating in six pathways related to the HCC tumorigenesis were selected to further analysis (**Table 3**).

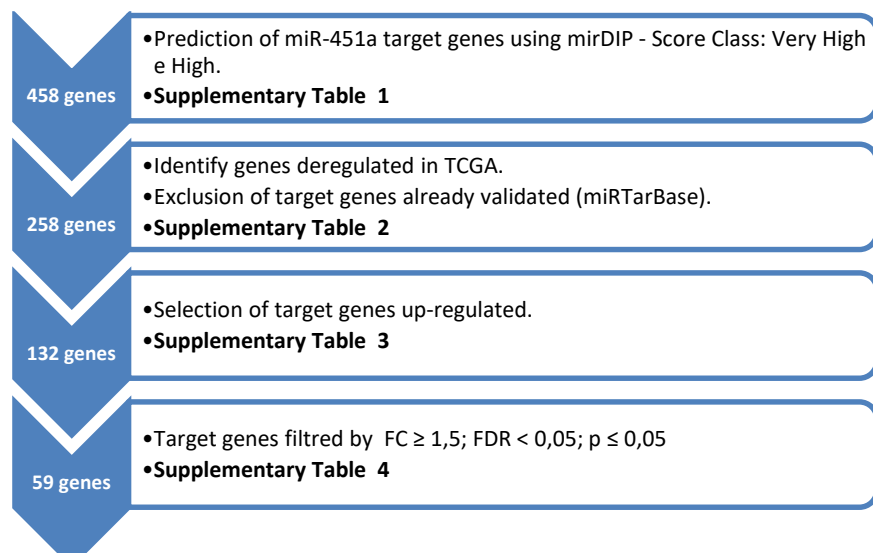


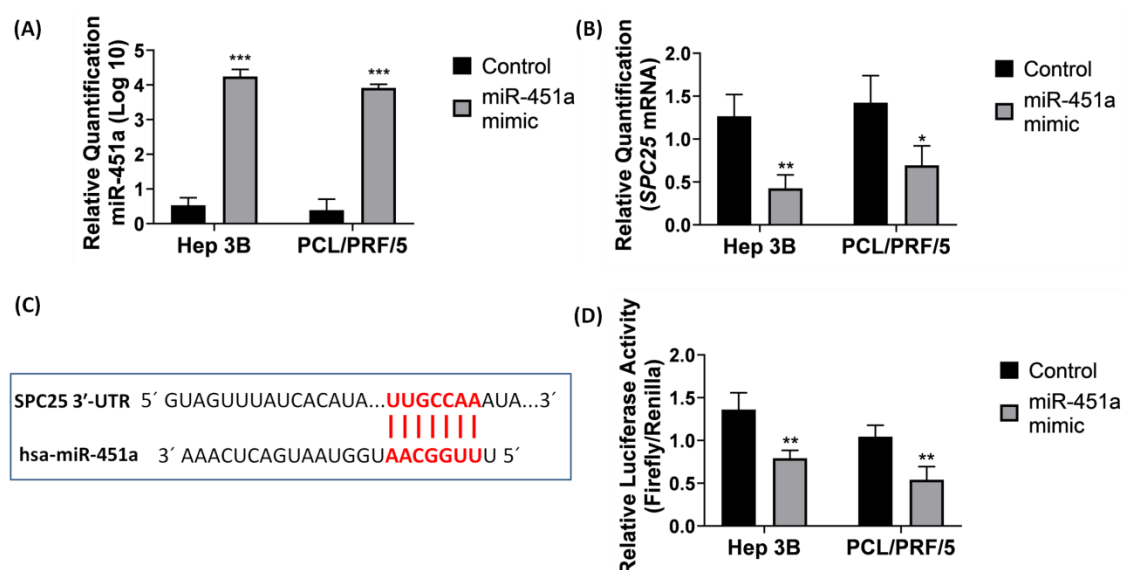
Figure 1. Flow chart depicting the strategy to select miR-451a target genes for functional validation.

Table 3. Pathways that can be related to HCC tumorigenesis.

Pathway Name	Genes Related
RHO GTPases	<i>FMNL3, BUB1B, SPC25, KIF2A, PLEKHG2</i>
Programmed Cell Death	<i>BAK1, HMGB2, MEF2D</i>
Viral Carcinogenesis	<i>CDKN2B, BAK1</i>
Wnt signaling pathway	<i>HELLS</i>
p53 signaling pathway	<i>RRAGD, CSE1L, BAK1</i>
mTOR signaling pathway	<i>RRAGD</i>

SPC25 is a direct target of miR-451a

The transfection of miR-451a mimic was effective in the cell lines Hep 3B and PCL/PRF/5 leading to significant increase of miR-451a levels (**Figure 2A**). The expression of the 12 target genes (*FMNL3, BUB1B, SPC25, KIF2A, PLEKHG2, BAK1, HMGB2, MEF2D, CDKN2B, HELLs, RRAGD, CSE1L*) after the transfection of miR-451a mimic or control were evaluated by RT-qPCR. The expression of *SPC25* gene was significantly decreased in both cell lines (**Figure 2B**). To check if *SPC25* is as a direct target of miR-451a, the 3'UTR of *SPC25* was cloned into a luciferase reporter plasmid, generating the plasmid pmiRGlo-SPC25-3'UTR. The co-transfection of pmiRGlo-SPC25-3'UTR with miR-451a mimic led to a reduction in the luciferase activity in both cell lines, Hep 3B and PCL/PRF/5, when compared with the co-transfection with control (**Figure 2C and D**).

**Figure 2.** (A) miR-451a expression by RT-qPCR 24h after transfection of the miR-451a mimic or control. All samples were normalized with the U6 endogenous control. The data are represented by

relative quantification ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (B) Relative expression of *SPC25* gene detected 24h after transfection of the miR-451a mimic or control. All samples were normalized with the *B2M* endogenous control. The data are represented by relative quantification ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (C) The predicted miR-451a binding site in the 3'UTR of *SPC25A*. The seed matching sequence was marked in red. (D) Identification of *SPC25* as a transcriptional target of miR-451a. The Luciferase Activity was normalized with Renilla expression plasmid. The data represents the average of three independent experiments, and bars represent the standard deviation. The statistical significance was analysed using the Student's t-tests. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

miR-451a transfection decreased the proliferation in the HCC cell lines

To evaluate the effect of miR-451a up-regulation in the HCC cell lines proliferation, miR-451a mimic or control were transfected into the cell lines. MTS assay showed significant decrease in the cell proliferation rates of both Hep 3B and PCL/PRF/5 cell lines (Figure 3).

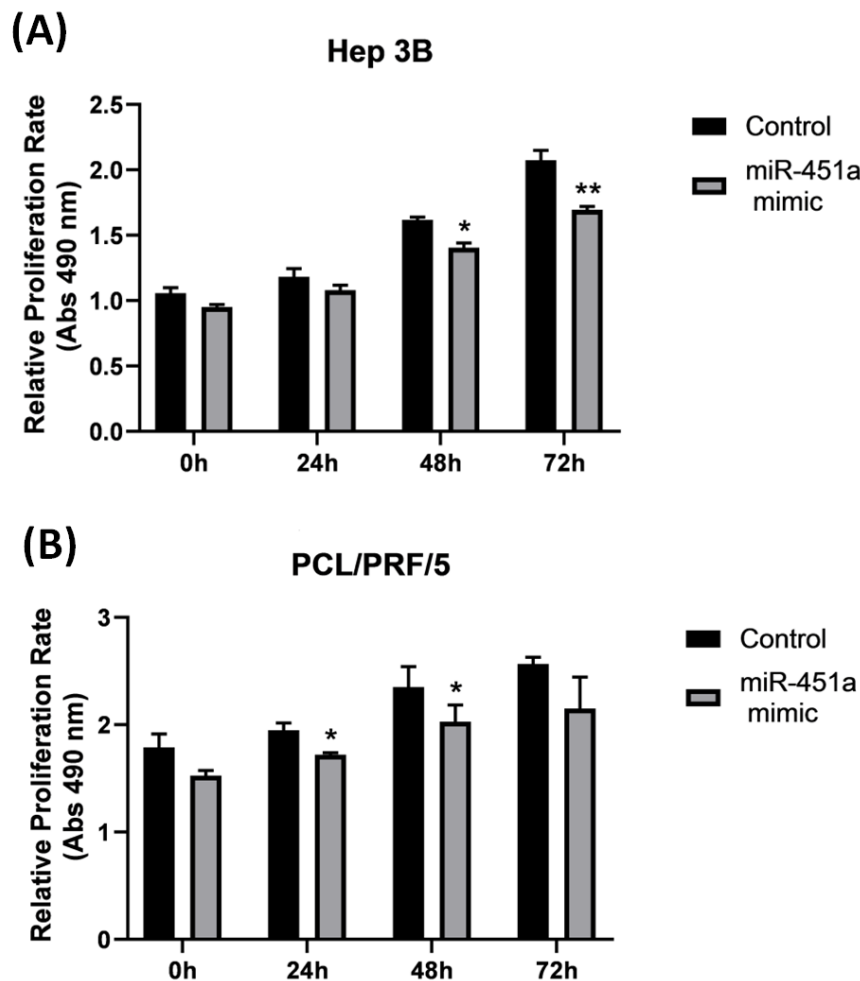


Figure 3. Effect of miR-451a overexpression on the proliferation of HCC cell lines measured by MST assay. MiR-451a decreases proliferation of (A) Hep 3B and (B) PCL/PRF/5 cell lines. The data

represents the average of three independent experiments, and bars represent the standard deviation. The statistical significance was analysed using the Student's t-tests. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

miR-451a inhibited HCC cell lines migration

HCC cell lines migration after transfection with miR-451a mimic or control was analysed by measuring the wound closure at 0 h, 24 h, and 48 h after the scratch. Hep 3B showed significant decreased of migration after 24h (miR-451: 56%; control: 69.5%) and 48h (miR-451: 88%; control: 98%) (Figure 4A and 4C). PCL/PRF/5 showed a significant decreased of migration after 48h (miR-451: 44.8%; control: 60.6%) (Figure 4B and 4D). These results demonstrated that the restoration of miR-451a reduced the migration rate of the HCC cell lines.

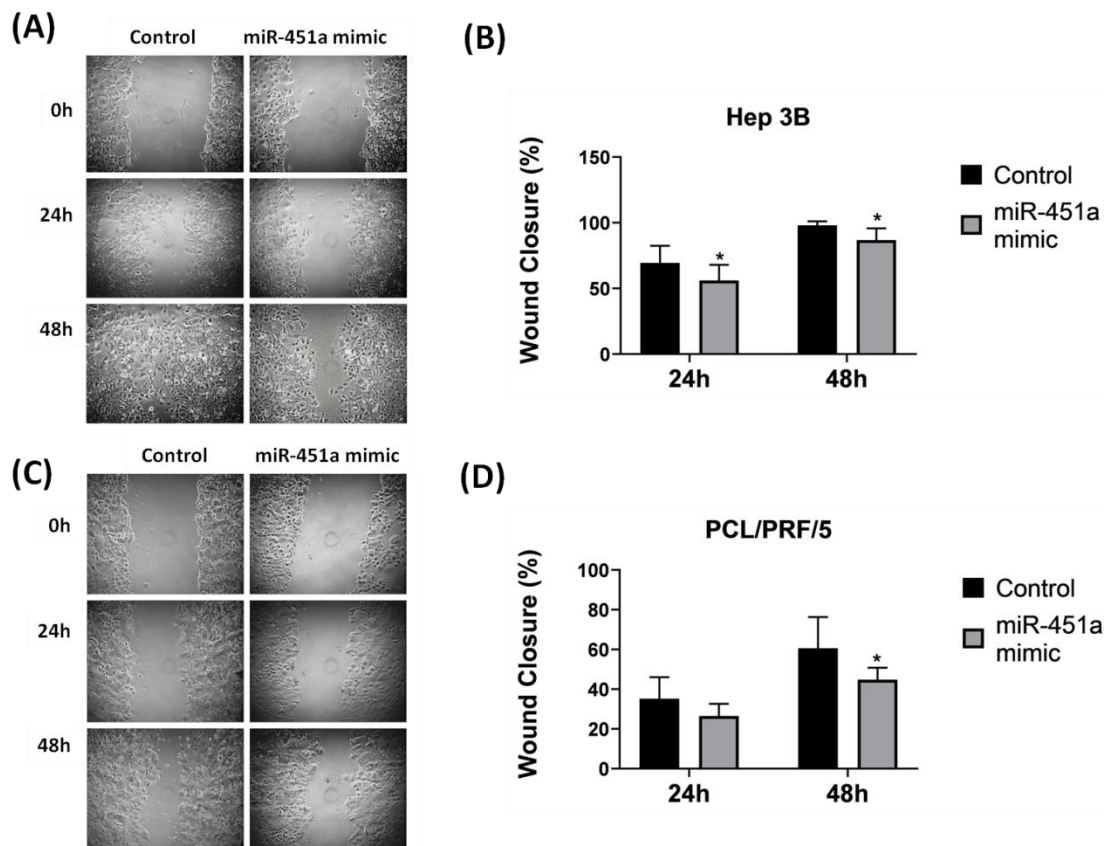


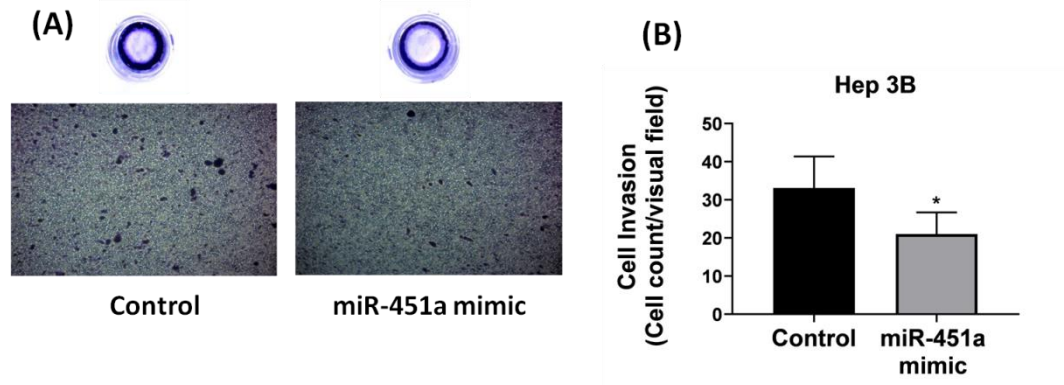
Figure 4. Effect of miR-451a overexpression on the migration of HCC cell lines at 0, 24 and 48h after the injury. Representative images from *in vitro* scratch wound healing assays demonstrating decreased cell migration of Hep 3B (A) and PCL/PRF/5 cell lines (C) transfected with miR-451a into the cell-free region. Semi-quantitative analysis of wound closure percentage of Hep 3B (B) and PCL/PRF/5 (D) cell lines. The data represent the

average of three independent experiments, and bars represent the standard deviation. The statistical significance was analysed using the Student's t-tests. * $P < 0.05$.

Restoration of miR-451a attenuates cell invasion

The effect of miR-451a restoration on invasion of HCC cell lines was evaluated by transwell invasion assay. Transfection of miR-451a leads to reduced invasion in both Hep 3B and PCL/PRF/5 cell lines (**Figure 5**).

Hep 3B



PCL/PRF/5

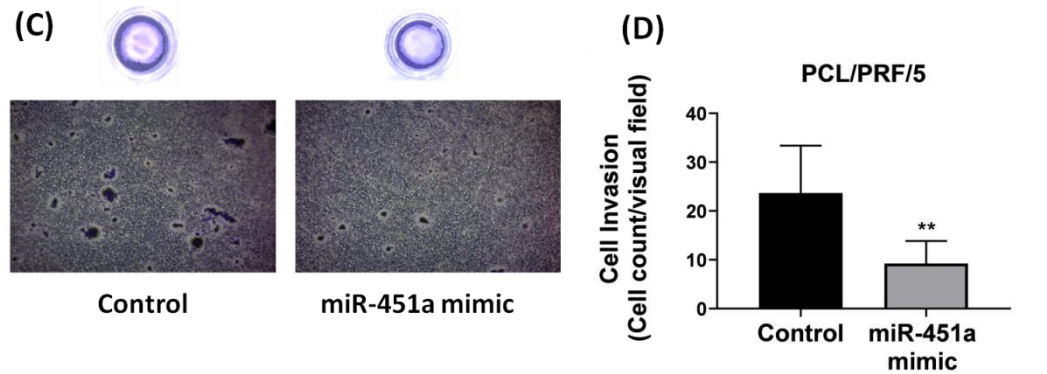


Figure 5. Transwell cell invasion assay. Representative images of Hep 3B (A) and PCL/PRF/5 (C) cell lines transfected with control and miR-451a mimic. Semi-quantitative analysis of the effect of miR-451a overexpression on the invasion potential of the Hep 3B (B), PCL/PRF/5 (D) cell lines when compared to the control. The analysis of the invasive cells was performed by counting ten different visual fields which were photographed using an optical microscope with a 10X magnification. The data represent the average of three independent experiments, and bars represent the standard deviation. The statistical significance was analysed using the Student's t-tests. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

DISCUSSION

Down-expression of miR-451a has been reported in HCC for several studies (10,11,14,15) and also has been associated with advanced clinical staging, early recurrence, metastasis and lower overall survival (15). Despite its clinical association, the mechanisms underlying its suppressive role in HCC remain unclear. In the present study, miR-451a upregulation, by the transfection of miR-451a mimic, leads to decreased proliferation, migration and invasion in HCC cell lines (Hep 3B and PCL/PRF/5). Moreover, the *Spindle Pole Body Component 25 (SPC25)* gene was founded as a direct target of miR-451a.

Huang et. al. demonstrated that miR-451 decreased cell growth induced G0/G1 arrest and activated apoptosis in HCC cell lines (HEP G2, Bel7402, HCCLM3 and MHCC97H). In addition, the oncogene *c-Myc* was identified as a direct target of miR-451a. The upregulation of this gene was related to the activation of Erk1/2 signaling, which through regulation of GSK-3 β / snail/E-cadherin and the increased expression of matrix metalloproteinase family members, promoted epithelial to mesenchymal transition (EMT) in HCC cells (15). Liu et al. also showed that the overexpression of miR-451a in the cell lines HCCLM3 and SNU449 inhibited the cell growth in a caspase-3-related manner and attenuated cell invasion mediated by matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (22).

The overexpression of miR-451 in HCC cells (HEP G2) decreased the viability, migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by targeting IL-6R-STAT3-VEGF pathway. Upregulation of miR-451 *in vivo* (BALB/c nude mice) led to reduced tumour growth and angiogenesis (16). Furthermore, Zhao et al. identified that miR-451a is significantly downregulated in serum-derived exosomes from HCC patients. The overexpression of miR-451a altered the cell growth and tumour angiogenesis via apoptosis in HCC cell line (SMMC-7721), HUVECs and *in vivo* (BALB/c nude mice) by targeting *LPIN1* (23).

The overexpression of miR-451a was related to the decrease of cell migration by targeting transcription factor 2 (ATF2) in the HCC cell lines (HEP G2 and SK-Hep-1) (11). Moreover, the overexpression of miR-451a also inhibited the cell proliferation *in vivo* (BALB/c nude mice) and *in vitro* (HEP G2 and QGY-7703) in HCC, by downregulating cyclin D1 and *c-Myc* through inhibition of NF- κ B pathway initiated through the direct suppression of IKK- β (14). Upregulation of miR-451a was also reported to inhibit proliferation, invasion and migration in HCC cell lines (HepG2 and Huh-7) via targeting *YWHAZ* (24).

The current study revealed a new target of miR-451a: *SPC25*. We also showed that this gene is deregulated in HCC samples (TCGA data) and is a direct target of miR-451a using luciferase reporter assay in HCC cell lines.

SPC25 is a member of the NDC80 Kinetochore Complex which consists of *NDC80*, *NUF2*, *SPC24*, and *SPC25*. This complex forms the outer kinetochore to interact with microtubules, being essential for chromosome segregation and spindle checkpoint activity during the progression of the cell cycle. *SPC25* is required for kinetochore integrity and can form a heterodimer with *SPC24*, regulating kinetochore-microtubule attachment, chromosome alignment, and spindle formation and assembly checkpoint (25,26). The misregulation of NDC80 complex components have been related to uncontrolled proliferation, invasion potential, evading apoptosis, and poor prognosis in various tumours (27–30). Dysregulated *SPC25* expression has been associated with the oncogenesis and malignant phenotypes of several types of cancers, such as prostate cancer (31), breast cancer (32), colorectal and gastric (33) cancers, lung cancer (32,34) and HCC (35).

Yang et. al. analysed the expression of *SPC25* in 374 HCC samples and 50 non-neoplastic tissues from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and founded that the expression of *SPC25* in HCC tissues was significantly higher than that in normal tissues. Additionally, the diagnostic and prognostic values of *SPC25* were also analysed via receiver operating characteristic (ROC) curve and survival analyses, respectively. *SPC25* expression showed high diagnostic value in HCC. Moreover, high *SPC25* expression in HCC samples was associated with worse prognosis and independently associated with overall survival (36).

SPC25 overexpression was also reported to be associated with worse prognosis in HCC using weighted correlation network analysis (WGCNA) in HCC gene expression profile from Gene Expression Omnibus database (GEO) and (TCGA) dataset. The knockdown of *SPC25* significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of HCC cell lines (HepG2 and SMMC7721). In addition, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showed a significant correlation between *SPC25* and the P53 pathway, and the expression levels of *P53*, *p-P53*, and *P21* were upregulated by siRNA-mediated *SPC25* knockdown (35). Moreover, *SPC25* is a Wnt-regulated recurrence-associated gene and is related to early recurrence after liver resection in HCC patients (37). Taken altogether, these data highly suggest that the upregulation of *SPC25* is related to HCC tumorigenesis and progression and might be at least in part explained by miR-451a deregulation.

Chen et al. analysed the clinical importance of the NDC80 kinetochore complex components in terms of their expression level, prognostic value, and therapeutic potential in HCC patients in HCC samples from Nanfang Hospital, TCGA database and other cases from GSE89377 using statistical methods and GSEA. They founded that high expression of the NDC80 complex predicts poor survival in HCC patients (30).

In conclusion, our study showed that miR-451a regulates proliferation, migration and invasion in the HCC cell lines. In addition, we showed for the first time that the *SPC25* gene is directly regulated by miR-451a in HCC cell lines. Our data suggest that deregulation of miR-451a is implicated in hepatocellular carcinogenesis and can be a potential target for HCC therapy by targeting *SPC25*.

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. ACS. The American Cancer Facts and Figures of the 2018. Am Cancer Soc [Internet]. 2018;(No. 500818 Rev.6/18):1–76. Available at: cancer.org, 1.800.227.2345 1.866.228.4327 TTY
3. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1450–62.
4. Caruso S, O'Brien DR, Cleary SP, Roberts LR, Zucman-Rossi J. Genetics of HCC: Novel approaches to explore molecular diversity. *Hepatology.* 2020;0–2.
5. Pea A, Jamieson NB, Braconi C. Biology and clinical application of regulatory RNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2020;0–2.
6. 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>
7. Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1(15004).
8. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, Chavdoula E, Hatzia Apostolou M, Polytarchou C, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cell Oncol.* 2017;40(4):303–39.
9. Pan X, Wang R, Wang ZX. The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(7):1153–62.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Huang JY, Zhang K, Chen DQ, Chen J, Feng B, Song H, et al. MicroRNA-451: Epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(21):18613–30.
14. 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.
15. 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).
16. Liu X, Zhang A, Xiang J, Lv Y, Zhang X. miR-451 acts as a suppressor of angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting the IL-6R-STAT3 pathway. *Oncol Rep.* 2016;36(3):1385–92.
17. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):203–21.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
 21. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstscha M. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res Mutat Res.* 2013;752:10–24.
 22. Liu X, Zhang X, Xiang J, Lv YI, Shi J. miR-451 : Potential role as tumor suppressor of human hepatoma cell growth and invasion. 2014;739–45.
 23. 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.
 24. 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.
 25. McClelland ML, Gardner RD, Kallio MJ, Daum JR, Gorbsky GJ, Burke DJ, et al. The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev.* 2003;17(1):101–14.
 26. Suzuki A, Badger BL, Haase J, Ohashi T, Erickson HP, Salmon ED, et al. How the kinetochore couples microtubule force and centromere stretch to move chromosomes. *Nat Cell Biol.* 2016;18(4):382–92.
 27. Zhang D, Liu E, Kang J, Yang X, Liu H. MiR-3613-3p affects cell proliferation and cell cycle in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(54):93014–28.
 28. Yan X, Huang L, Liu L, Qin H, Song Z. Nuclear division cycle 80 promotes malignant progression and predicts clinical outcome in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2018;7(2):420–32.
 29. Shiraishi T, Terada N, Zeng Y, Suyama T, Luo J, Trock B, et al. Cancer/Testis antigens as potential predictors of biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy. *J Transl Med [Internet].* 2011;9(1):153. Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/153>
 30. Chen X, Li W, Xiao L, Liu L. Nuclear division cycle 80 complex is associated with malignancy and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(4):1233–47.
 31. Cui F, Hu J, Fan Y, Tan J, Tang H. Knockdown of spindle pole body component 25 homolog inhibits cell proliferation and cycle progression in prostate cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5712–20.
 32. Sun ZY, Wang W, Gao H, Chen QF. Potential therapeutic targets of the nuclear division cycle 80 (NDC80) complexes genes in lung adenocarcinoma. *J Cancer.* 2020;11(10):2921–34.
 33. Kaneko N, Miura K, Gu Z, Karasawa H, Ohnuma S, Sasaki H, et al. siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(4):1235–40.
 34. Chen J, Chen H, Yang H, Dai H. SPC25 upregulation increases cancer stem cell properties in non-small cell lung adenocarcinoma cells and independently predicts poor survival. *Biomed Pharmacother.* 2018;100(February):233–9.
 35. Chen F, Zhang K, Huang Y, Luo F, Hu K, Cai Q. SPC25 may promote proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via p53. *FEBS Open Bio.* 2020;10(7):1261–75.
 36. Yang X, Sun H, Song Y, Yang L, Liu H. Diagnostic and prognostic values of upregulated SPC25 in patients with hepatocellular carcinoma. 2020;1–16.

37. Chen J, Rajasekaran M, Xia H, Zhang X, Kong SN, Sekar K, et al. The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut*. 2016;65(9):1522–34.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Prediction of mi-451a target genes by mirDIP, using Score Class: Very High and High.

Gene	<i>Integrated Score</i>	Database Number	<i>Score Class</i>
<i>ATF2</i>	0,7583676	18	Very High
<i>EMSY</i>	0,753166433	18	Very High
<i>AEBP2</i>	0,718406848	17	Very High
<i>MEX3C</i>	0,706484491	15	Very High
<i>CAB39</i>	0,70040017	17	Very High
<i>OSR1</i>	0,677211613	15	Very High
<i>PSMB8</i>	0,674647799	14	Very High
<i>TSC1</i>	0,647689633	16	Very High
<i>ZNF644</i>	0,644706368	15	Very High
<i>YWHAZ</i>	0,643434693	15	Very High
<i>SAMD4B</i>	0,616392819	14	Very High
<i>GK</i>	0,614358603	15	Very High
<i>SETD5</i>	0,61270481	15	Very High
<i>MIF</i>	0,607614287	12	Very High
<i>CDKN2D</i>	0,607331235	14	Very High
<i>TTN</i>	0,600324123	11	Very High
<i>SMARCA2</i>	0,575130406	16	Very High
<i>CDKN2B</i>	0,571034891	16	Very High
<i>ADAM10</i>	0,56941927	15	Very High
<i>YTHDF2</i>	0,556225953	13	Very High
<i>PRICKLE2</i>	0,553520167	15	Very High
<i>CMTM6</i>	0,551582702	13	Very High
<i>YTHDF3</i>	0,548100338	11	Very High
<i>PMM2</i>	0,536122203	14	Very High
<i>YTHDC1</i>	0,535897639	14	Very High
<i>VAPA</i>	0,534265024	10	Very High
<i>MAML1</i>	0,533736232	14	Very High
<i>AKTIP</i>	0,528621759	14	Very High
<i>FBLN5</i>	0,527562255	15	Very High
<i>EREG</i>	0,525860805	13	Very High
<i>FBXO33</i>	0,525114156	11	Very High
<i>SEC23IP</i>	0,522235458	15	Very High
<i>TBX1</i>	0,51435047	12	Very High
<i>TBC1D9B</i>	0,508686226	12	Very High
<i>POU3F2</i>	0,507568609	14	Very High
<i>NRARP</i>	0,503150048	13	Very High
<i>EIF2AK3</i>	0,499460215	13	Very High

<i>SPC25</i>	0,497551547	14	Very High
<i>CPD</i>	0,493983603	16	Very High
<i>CTNNBIP1</i>	0,491604011	16	Very High
<i>SZRD1</i>	0,488991909	14	Very High
<i>RAB5A</i>	0,486012443	12	Very High
<i>GALK2</i>	0,480584941	15	Very High
<i>NPTN</i>	0,478894114	13	Very High
<i>GATAD2B</i>	0,478250525	10	Very High
<i>NSMAF</i>	0,476757649	15	Very High
<i>GRSF1</i>	0,47422476	15	Very High
<i>FNTA</i>	0,473253507	12	Very High
<i>CXCL16</i>	0,472738374	12	Very High
<i>PRR12</i>	0,472123873	12	Very High
<i>USP46</i>	0,471771034	15	Very High
<i>CUX2</i>	0,470525051	11	Very High
<i>KIAA1217</i>	0,469853764	13	Very High
<i>PHF20L1</i>	0,469098478	11	Very High
<i>TRIM66</i>	0,463585743	12	Very High
<i>MEF2D</i>	0,461864012	10	Very High
<i>FAM91A1</i>	0,453469288	14	Very High
<i>S1PR2</i>	0,44918768	8	Very High
<i>CXorf21</i>	0,449124985	11	Very High
<i>GLIS2</i>	0,445950296	3	Very High
<i>NAMPT</i>	0,44420734	12	Very High
<i>EGLN3</i>	0,443690945	13	Very High
<i>CYLD</i>	0,441518292	13	Very High
<i>MAU2</i>	0,441082602	11	Very High
<i>ARHGEF3</i>	0,440707938	14	Very High
<i>KIF2A</i>	0,440185481	13	Very High
<i>DCBLD2</i>	0,438896766	15	Very High
<i>CAV1</i>	0,436744084	11	Very High
<i>ZNF654</i>	0,428996904	11	Very High
<i>GDI1</i>	0,427160032	11	Very High
<i>ZIC3</i>	0,426188191	11	Very High
<i>NPEPPS</i>	0,421719719	10	Very High
<i>SREK1</i>	0,420956675	8	Very High
<i>NEDD9</i>	0,419397453	12	Very High
<i>FAM208B</i>	0,419370494	10	Very High
<i>NR5A2</i>	0,419270233	14	Very High
<i>WDFY2</i>	0,418535215	13	Very High
<i>KIF24</i>	0,416112118	14	Very High
<i>CERK</i>	0,415691787	13	Very High

<i>RPL13</i>	0,407968348	13	Very High
<i>BTBD9</i>	0,406791941	12	Very High
<i>ADGRL3</i>	0,405347727	12	Very High
<i>ST8SIA4</i>	0,404237486	11	Very High
<i>ADARB1</i>	0,401748287	12	Very High
<i>MINDY2</i>	0,400926413	13	Very High
<i>DCAF5</i>	0,40016216	11	Very High
<i>ACADL</i>	0,394445651	13	Very High
<i>MBP</i>	0,391310982	12	Very High
<i>SLC39A14</i>	0,389709102	11	Very High
<i>SWAP70</i>	0,386925538	13	Very High
<i>TNFSF15</i>	0,386802055	13	Very High
<i>EHF</i>	0,384189954	13	Very High
<i>STK4</i>	0,384027169	12	Very High
<i>VSX1</i>	0,383448081	12	Very High
<i>C21orf91</i>	0,382657335	12	Very High
<i>CELF2</i>	0,37973897	10	High
<i>DBX2</i>	0,378728466	11	High
<i>PCLAF</i>	0,378498383	12	High
<i>STK26</i>	0,37828788	11	High
<i>SSU72</i>	0,377184612	13	High
<i>ING3</i>	0,375820808	8	High
<i>BAK1</i>	0,37565814	12	High
<i>SLC7A6OS</i>	0,375607782	12	High
<i>MEOX2</i>	0,372885953	13	High
<i>AKR1B1</i>	0,370755541	12	High
<i>CBLN4</i>	0,368028576	10	High
<i>PSMD11</i>	0,364406867	9	High
<i>IL6R</i>	0,36374158	12	High
<i>SOS1</i>	0,363428866	10	High
<i>MSL3</i>	0,362676666	11	High
<i>RAB14</i>	0,357928091	11	High
<i>UPF3A</i>	0,356992703	13	High
<i>NUP58</i>	0,352991338	9	High
<i>BAZ2B</i>	0,35128589	8	High
<i>NAIP</i>	0,351119337	12	High
<i>EVL</i>	0,349890957	11	High
<i>GADL1</i>	0,349802407	11	High
<i>CTDSP1</i>	0,346334035	11	High
<i>TOP2B</i>	0,346171369	10	High
<i>DPYSL3</i>	0,345547065	12	High
<i>PCCB</i>	0,344883305	7	High

<i>LENG8</i>	0,344707223	10	High
<i>CPNE3</i>	0,343106682	9	High
<i>SLC30A5</i>	0,342645175	6	High
<i>BMP6</i>	0,341876113	12	High
<i>LPIN1</i>	0,340719012	11	High
<i>MYOG</i>	0,338879848	12	High
<i>EPC2</i>	0,337475241	7	High
<i>UBA6</i>	0,333722617	11	High
<i>HIP1</i>	0,333459731	12	High
<i>TIGAR</i>	0,333374332	12	High
<i>MAP3K1</i>	0,331191699	11	High
<i>BACH2</i>	0,331006323	11	High
<i>OXCT1</i>	0,330958891	11	High
<i>IST1</i>	0,330944647	12	High
<i>SGK1</i>	0,328539909	9	High
<i>MPRIIP</i>	0,328231792	12	High
<i>RYBP</i>	0,325939572	8	High
<i>CAND2</i>	0,325742627	11	High
<i>SNRNP48</i>	0,323808687	12	High
<i>C22orf23</i>	0,322267274	11	High
<i>KLF11</i>	0,322165245	11	High
<i>BRWD1</i>	0,320412808	9	High
<i>YAP1</i>	0,319867439	7	High
<i>YWHAE</i>	0,318565766	7	High
<i>UCK1</i>	0,318412177	13	High
<i>DBNL</i>	0,316320876	7	High
<i>PLSCR2</i>	0,315730555	11	High
<i>MEGF6</i>	0,314207693	9	High
<i>KIF5B</i>	0,312338881	8	High
<i>CELSR1</i>	0,31222946	10	High
<i>ASTN2</i>	0,31195429	12	High
<i>DTX3L</i>	0,30997694	11	High
<i>NPAS3</i>	0,30859644	9	High
<i>DDX3Y</i>	0,308015153	11	High
<i>CYB561D1</i>	0,307972695	11	High
<i>BTAF1</i>	0,307552307	7	High
<i>RASGRP3</i>	0,306148764	7	High
<i>BATF</i>	0,302198768	11	High
<i>OSBPL8</i>	0,302025295	8	High
<i>PTTG1IP</i>	0,29997444	10	High
<i>CRELD2</i>	0,298536982	12	High
<i>FAM168B</i>	0,297838928	12	High

<i>DRG2</i>	0,297691395	10	High
<i>AP1G1</i>	0,296974271	8	High
<i>TNRC6C</i>	0,295747443	11	High
<i>AQP4</i>	0,294318555	11	High
<i>WTAP</i>	0,292858149	7	High
<i>PHTF2</i>	0,292221571	6	High
<i>CRIP2</i>	0,292092211	10	High
<i>STC1</i>	0,291302109	10	High
<i>SEC16B</i>	0,29118576	7	High
<i>PMP22</i>	0,291173064	8	High
<i>SPTB</i>	0,290762968	11	High
<i>ZFHX3</i>	0,29053932	5	High
<i>TMEM33</i>	0,289098991	7	High
<i>MOBP</i>	0,288267393	6	High
<i>MED13L</i>	0,284185755	6	High
<i>SFXN4</i>	0,284077174	10	High
<i>ZFP36L1</i>	0,282764495	6	High
<i>CLEC2D</i>	0,282604044	11	High
<i>TMEM30A</i>	0,282067016	6	High
<i>TBX18</i>	0,281642566	11	High
<i>OXTR</i>	0,280293916	11	High
<i>KLHL28</i>	0,280289751	9	High
<i>C15orf40</i>	0,280283861	11	High
<i>PRRC2C</i>	0,279341589	9	High
<i>EP300</i>	0,278757543	6	High
<i>ARPP19</i>	0,278289531	10	High
<i>KCTD10</i>	0,27812565	10	High
<i>RBM4</i>	0,277968827	6	High
<i>ZNF140</i>	0,277923752	12	High
<i>RASGEF1A</i>	0,276037329	11	High
<i>DBT</i>	0,2758017	7	High
<i>SLC7A11</i>	0,274743237	8	High
<i>SGIP1</i>	0,274034388	9	High
<i>RBPJ</i>	0,273032768	7	High
<i>CD1D</i>	0,272253646	9	High
<i>C16orf72</i>	0,271543552	10	High
<i>ANKRD27</i>	0,271361829	6	High
<i>CRTAP</i>	0,270505861	11	High
<i>LIN7C</i>	0,270446283	5	High
<i>YIPF5</i>	0,270394855	6	High
<i>SFPQ</i>	0,269927057	6	High
<i>RAD18</i>	0,269860991	9	High

<i>C5orf42</i>	0,268049725	5	High
<i>UBE2L3</i>	0,267431236	11	High
<i>SLC44A1</i>	0,267106062	6	High
<i>ACADSB</i>	0,267033868	11	High
<i>PTPRE</i>	0,266499006	8	High
<i>UBN2</i>	0,264451314	8	High
<i>ZNF583</i>	0,26403344	6	High
<i>PITPNB</i>	0,263954348	7	High
<i>KLF6</i>	0,263888585	7	High
<i>TEAD2</i>	0,263292338	7	High
<i>ACTR1B</i>	0,262707079	5	High
<i>LUZP2</i>	0,260290578	10	High
<i>RNF125</i>	0,260252932	8	High
<i>PPARA</i>	0,259020124	9	High
<i>ATL2</i>	0,258870232	7	High
<i>LSS</i>	0,25797893	10	High
<i>PCDH7</i>	0,257897834	8	High
<i>ZDHHC23</i>	0,257168047	11	High
<i>PPFIA1</i>	0,257160623	6	High
<i>LIPG</i>	0,256839854	10	High
<i>DNAJB9</i>	0,255978638	8	High
<i>PPP1R11</i>	0,255948379	6	High
<i>HDHD5</i>	0,255190074	9	High
<i>CAP1</i>	0,25512579	9	High
<i>MYO3A</i>	0,255034557	7	High
<i>CCND1</i>	0,254494071	8	High
<i>GFI1</i>	0,253848229	11	High
<i>ATP2C1</i>	0,253814478	6	High
<i>LETM2</i>	0,253527228	7	High
<i>PDXK</i>	0,253205888	10	High
<i>KLHL1</i>	0,252255378	7	High
<i>HMGB2</i>	0,251373999	8	High
<i>ACTG1</i>	0,251266121	7	High
<i>LRRC39</i>	0,251082932	6	High
<i>FBLN7</i>	0,249992276	10	High
<i>SYNPO2L</i>	0,249937608	11	High
<i>HHLA2</i>	0,249552821	10	High
<i>PLEKHG2</i>	0,249122078	11	High
<i>SPSB1</i>	0,248904555	9	High
<i>RORA</i>	0,248550635	8	High
<i>NHSL1</i>	0,248201702	9	High
<i>XPO1</i>	0,247275118	6	High

<i>BUB1B</i>	0,247274639	7	High
<i>MSC</i>	0,246244041	10	High
<i>SS18</i>	0,244016726	6	High
<i>ZNF460</i>	0,243580531	10	High
<i>TMCC1</i>	0,242555615	7	High
<i>ZNF830</i>	0,242385338	7	High
<i>GRIN2A</i>	0,242290631	9	High
<i>ADCY7</i>	0,242212103	10	High
<i>SERPINE2</i>	0,241203439	7	High
<i>MPPED2</i>	0,240869817	7	High
<i>PREPL</i>	0,238530941	11	High
<i>CRIP1</i>	0,238447958	6	High
<i>RNU6ATAC</i>	0,238436431	3	High
<i>ZNF398</i>	0,238236003	11	High
<i>PHF5A</i>	0,237762147	5	High
<i>KIF1B</i>	0,237466888	6	High
<i>NFIA</i>	0,237175432	8	High
<i>SPAG17</i>	0,236931399	4	High
<i>TRAK1</i>	0,236878279	8	High
<i>POFUT2</i>	0,234887627	11	High
<i>SLC39A9</i>	0,23477817	7	High
<i>UPF2</i>	0,234752423	6	High
<i>FAM9C</i>	0,234477878	8	High
<i>CTTNBP2NL</i>	0,234239447	5	High
<i>CUX1</i>	0,233935497	8	High
<i>GRAMD2B</i>	0,233917293	7	High
<i>SON</i>	0,233598814	6	High
<i>CCNB3</i>	0,233170286	7	High
<i>MAP4K3</i>	0,232693962	6	High
<i>PDZRN3</i>	0,231338486	9	High
<i>COPS7B</i>	0,231049602	6	High
<i>NCKAP1</i>	0,231005866	7	High
<i>SPOCK2</i>	0,23054351	9	High
<i>ZFHX4</i>	0,230108533	4	High
<i>FBXL19</i>	0,228804692	9	High
<i>PSIP1</i>	0,227361392	6	High
<i>BCCIP</i>	0,227046882	10	High
<i>ROCK1</i>	0,226691575	7	High
<i>RPL28</i>	0,226491298	9	High
<i>PNMA6A</i>	0,226276789	7	High
<i>CNOT1</i>	0,226077454	5	High
<i>DNAJC7</i>	0,22596905	4	High

<i>FAM13C</i>	0,225370136	6	High
<i>ZNF451</i>	0,224662257	7	High
<i>CACNA1C</i>	0,224560153	9	High
<i>LPP</i>	0,224412673	10	High
<i>SUCO</i>	0,223821329	6	High
<i>FNDC3B</i>	0,223777549	6	High
<i>WWC1</i>	0,223468747	11	High
<i>AMMECR1L</i>	0,223352402	8	High
<i>SYNJ2</i>	0,223190522	11	High
<i>ADAM5</i>	0,222309634	3	High
<i>CDC14B</i>	0,222236602	8	High
<i>ATP8B1</i>	0,220491454	6	High
<i>RUBCNL</i>	0,219598577	9	High
<i>DISC1</i>	0,218892892	11	High
<i>CTNNBL1</i>	0,21774465	5	High
<i>DPY19L2P2</i>	0,217540944	4	High
<i>SOGA1</i>	0,217349959	5	High
<i>SLC38A4</i>	0,217346718	6	High
<i>MIDN</i>	0,216651073	5	High
<i>SYS1</i>	0,21664662	11	High
<i>ZBTB44</i>	0,216566744	9	High
<i>BEND6</i>	0,216314901	5	High
<i>CNOT6L</i>	0,216110062	7	High
<i>KREMEN1</i>	0,215979845	10	High
<i>DGCR2</i>	0,215799866	7	High
<i>FOXK1</i>	0,215251588	8	High
<i>HNRNPA1</i>	0,214846824	4	High
<i>FRY</i>	0,214147345	4	High
<i>PNPT1</i>	0,213239302	9	High
<i>TNPO1</i>	0,212626093	8	High
<i>ZBTB24</i>	0,212509666	7	High
<i>SLC22A23</i>	0,212271141	6	High
<i>LYSMD4</i>	0,212070567	5	High
<i>MYO16</i>	0,212064703	7	High
<i>HELLS</i>	0,211350046	6	High
<i>ATP5F1</i>	0,211255141	4	High
<i>GPR85</i>	0,210680394	6	High
<i>KLHL7</i>	0,210264561	7	High
<i>GORASP2</i>	0,2101553	5	High
<i>TMEM231</i>	0,210064665	9	High
<i>P2RY14</i>	0,209721246	7	High
<i>ARID4B</i>	0,209098832	5	High

<i>KIAA1109</i>	0,208432565	6	High
<i>SLC36A1</i>	0,208301642	7	High
<i>DHX33</i>	0,207939374	8	High
<i>MR1</i>	0,207812834	12	High
<i>C8orf22</i>	0,207498737	10	High
<i>SPATA1</i>	0,207075414	4	High
<i>BAGE</i>	0,20686913	8	High
<i>TRAF7</i>	0,206729592	6	High
<i>SLCO5A1</i>	0,206433359	7	High
<i>LONRF1</i>	0,206369004	6	High
<i>CREBL2</i>	0,205960086	5	High
<i>ATRX</i>	0,205828477	5	High
<i>RABGAP1</i>	0,205380146	4	High
<i>CREBZF</i>	0,205110784	5	High
<i>PPP2R3A</i>	0,204728525	7	High
<i>ATG4A</i>	0,204360109	7	High
<i>NXPE3</i>	0,204217261	6	High
<i>IL5</i>	0,204187668	6	High
<i>USP37</i>	0,204066152	8	High
<i>LGALS8</i>	0,203817238	5	High
<i>MATR3</i>	0,203435114	7	High
<i>NCOA6</i>	0,203314903	5	High
<i>VANGL1</i>	0,2029113	10	High
<i>LARP4</i>	0,202593008	6	High
<i>RAB31</i>	0,20237274	5	High
<i>KLC2</i>	0,201738268	8	High
<i>ZCCHC24</i>	0,201604176	7	High
<i>MGEA5</i>	0,201529518	5	High
<i>TTY12</i>	0,201315845	2	High
<i>BCL2L11</i>	0,200477152	7	High
<i>CA10</i>	0,200232918	5	High
<i>PHLPP2</i>	0,199988533	8	High
<i>DLG2</i>	0,199661086	3	High
<i>CC2D2A</i>	0,199107627	5	High
<i>SRP68</i>	0,19901835	4	High
<i>GMFB</i>	0,198691851	7	High
<i>SLC35E2B</i>	0,198349745	10	High
<i>FAM109B</i>	0,198319244	4	High
<i>JADE1</i>	0,198296706	8	High
<i>RND3</i>	0,198275201	6	High
<i>CDH8</i>	0,198249163	7	High
<i>DUSP16</i>	0,19800327	7	High

<i>S1PR3</i>	0,19764896	4	High
<i>SUPT16H</i>	0,196851142	6	High
<i>ACYP2</i>	0,196715595	8	High
<i>ALDH3B2</i>	0,196538762	9	High
<i>MORF4L2</i>	0,196390302	7	High
<i>PPP4R3B</i>	0,195964831	9	High
<i>RRAGD</i>	0,195948467	9	High
<i>C10orf82</i>	0,19579824	7	High
<i>KIAA1147</i>	0,195494206	7	High
<i>FMNL3</i>	0,195313728	9	High
<i>RNF138</i>	0,195205604	4	High
<i>MAK</i>	0,19508493	7	High
<i>TRMT11</i>	0,194940815	9	High
<i>VCAN</i>	0,194643559	6	High
<i>SOBP</i>	0,194567043	8	High
<i>TRAM1</i>	0,194442841	8	High
<i>ETNK1</i>	0,194336676	5	High
<i>ACTR2</i>	0,194057074	6	High
<i>GPR88</i>	0,193996399	5	High
<i>ZNF106</i>	0,193366087	9	High
<i>TIAM1</i>	0,192814683	8	High
<i>ATXN3</i>	0,192656337	6	High
<i>NKAIN2</i>	0,192601722	9	High
<i>ELAVL1</i>	0,192476352	6	High
<i>HEXB</i>	0,192274543	4	High
<i>TSN</i>	0,192042842	5	High
<i>VIM</i>	0,191629795	6	High
<i>ZMIZ2</i>	0,191306509	9	High
<i>SEC24D</i>	0,19121694	5	High
<i>SOCS5</i>	0,19102475	5	High
<i>TCEAL6</i>	0,19098982	5	High
<i>PTBP3</i>	0,190562774	5	High
<i>ZNF423</i>	0,190481397	4	High
<i>PDLIM5</i>	0,190030644	7	High
<i>RYK</i>	0,190021512	6	High
<i>CRISPLD2</i>	0,190006816	5	High
<i>SATB2</i>	0,189889042	6	High
<i>AGPAT4</i>	0,189798653	8	High
<i>ANKH</i>	0,189700116	8	High
<i>CCT6A</i>	0,189255241	5	High
<i>NFATC1</i>	0,18923795	6	High
<i>CACHD1</i>	0,189118394	8	High

<i>PHACTR1</i>	0,189025847	7	High
<i>AKT1</i>	0,188979381	6	High
<i>MBTD1</i>	0,188803478	6	High
<i>UQCRQ</i>	0,188798172	7	High
<i>ZDHHC14</i>	0,188466048	5	High
<i>KLF9</i>	0,188233632	5	High
<i>TMEM131L</i>	0,188219781	3	High
<i>CSNK1G1</i>	0,187931848	5	High
<i>PCDH9</i>	0,187580161	7	High
<i>MSL2</i>	0,187434899	6	High
<i>IRX5</i>	0,187427969	3	High
<i>GIT2</i>	0,187287913	8	High
<i>DOCK10</i>	0,187273001	7	High
<i>PGRMC1</i>	0,187092859	5	High
<i>RBM14-RBM4</i>	0,186824628	3	High
<i>ALG13</i>	0,186634498	6	High
<i>CD2BP2</i>	0,186612135	4	High
<i>ARMCX1</i>	0,186459909	4	High
<i>STX3</i>	0,186040669	10	High
<i>UNC93A</i>	0,185578229	7	High
<i>VWA3B</i>	0,185500891	5	High
<i>FKBP14</i>	0,185476147	7	High
<i>POLQ</i>	0,185237002	5	High
<i>IKBKB</i>	0,185126579	7	High
<i>DST</i>	0,185043915	8	High
<i>CSE1L</i>	0,184780837	7	High
<i>TBCA</i>	0,184183108	5	High
<i>OLFM1</i>	0,183939006	6	High
<i>COL14A1</i>	0,183844748	4	High
<i>CYYR1</i>	0,183395057	7	High
<i>EEF1A1</i>	0,183295403	5	High
<i>ATN1</i>	0,18299513	4	High
<i>C15orf61</i>	0,18282186	3	High
<i>TBC1D1</i>	0,182732093	6	High
<i>IQCH</i>	0,182720878	6	High
<i>MIS12</i>	0,182407347	5	High
<i>CAPRIN1</i>	0,181930936	5	High
<i>LRP1B</i>	0,181647446	8	High
<i>KLRC1</i>	0,181609759	6	High
<i>CBR1</i>	0,181493251	5	High
<i>ZFC3H1</i>	0,181219614	4	High
<i>NSD1</i>	0,181047729	6	High

<i>KHDRBS1</i>	0,180911577	6	High
----------------	-------------	---	------

Supplementary Table 2. Expression of miR-451a target genes in HCC samples from TCGA dataset and which were not experimentally validated according to miRTarBase database.

mirDIP	FC (T-N)	Pval	FDR
<i>KHDRBS1</i>	1,12	2,59E-03	5,47E-03
<i>MATR3</i>	1,13	1,33E-03	2,96E-03
<i>PNPT1</i>	1,14	1,52E-02	2,77E-02
<i>MORF4L2</i>	1,14	1,01E-02	1,90E-02
<i>KIF5B</i>	1,16	8,61E-03	1,65E-02
<i>MPRIIP</i>	1,17	1,21E-02	2,25E-02
<i>TRAM1</i>	1,17	1,91E-02	3,40E-02
<i>UBN2</i>	1,17	1,21E-02	2,25E-02
<i>SRP68</i>	1,18	1,49E-04	3,91E-04
<i>VANGL1</i>	1,18	2,20E-02	3,87E-02
<i>SFXN4</i>	1,18	1,31E-02	2,42E-02
<i>PSMD11</i>	1,20	3,91E-05	1,12E-04
<i>ARID4B</i>	1,20	6,30E-03	1,24E-02
<i>RBM4</i>	1,21	4,66E-04	1,12E-03
<i>ELAVL1</i>	1,21	1,27E-06	4,53E-06
<i>ALG13</i>	1,22	7,01E-04	1,64E-03
<i>DNAJC7</i>	1,22	1,40E-04	3,69E-04
<i>SOCS5</i>	1,22	5,18E-04	1,24E-03
<i>TSN</i>	1,22	1,35E-05	4,15E-05
<i>POFUT2</i>	1,22	1,83E-03	3,97E-03
<i>NPEPPS</i>	1,23	2,37E-03	5,04E-03
<i>GIT2</i>	1,24	1,07E-05	3,34E-05
<i>SUPT16H</i>	1,24	4,31E-06	1,42E-05
<i>BTBD9</i>	1,25	4,37E-04	1,06E-03
<i>GORASP2</i>	1,25	1,37E-07	5,61E-07
<i>PPP1R11</i>	1,26	4,52E-06	1,48E-05
<i>KLHL7</i>	1,27	1,49E-05	4,54E-05
<i>KCTD10</i>	1,27	7,48E-06	2,39E-05
<i>DBNL</i>	1,27	2,49E-06	8,52E-06
<i>ZDHHC23</i>	1,28	1,57E-02	2,85E-02
<i>ATP8B1</i>	1,29	1,21E-02	2,25E-02
<i>PHF5A</i>	1,29	4,19E-07	1,60E-06
<i>CAPRIN1</i>	1,30	3,79E-08	1,68E-07
<i>HEXB</i>	1,30	2,36E-05	6,99E-05
<i>CERK</i>	1,31	3,74E-04	9,17E-04
<i>GMFB</i>	1,31	4,26E-06	1,40E-05

<i>C5orf42</i>	1,31	1,26E-02	2,34E-02
<i>RASGRP3</i>	1,33	7,59E-03	1,47E-02
<i>USP46</i>	1,33	3,19E-05	9,26E-05
<i>PHF20L1</i>	1,34	1,28E-06	4,57E-06
<i>C15orf61</i>	1,35	5,04E-06	1,65E-05
<i>CRTAP</i>	1,37	1,75E-05	5,28E-05
<i>ZNF398</i>	1,37	8,13E-10	4,48E-09
<i>NCOA6</i>	1,37	5,76E-07	2,16E-06
<i>ATN1</i>	1,38	1,60E-06	5,60E-06
<i>DRG2</i>	1,38	6,42E-07	2,38E-06
<i>UPF3A</i>	1,38	6,56E-08	2,81E-07
<i>MAML1</i>	1,38	2,39E-07	9,45E-07
<i>SPTB</i>	1,38	1,70E-02	3,06E-02
<i>XPO1</i>	1,40	3,62E-13	3,06E-12
<i>C15orf40</i>	1,41	5,63E-09	2,79E-08
<i>NSMAF</i>	1,41	1,98E-04	5,08E-04
<i>SAMD4B</i>	1,41	1,58E-05	4,80E-05
<i>DGCR2</i>	1,42	2,75E-10	1,62E-09
<i>PHTF2</i>	1,43	1,15E-06	4,13E-06
<i>TRAF7</i>	1,43	2,63E-09	1,36E-08
<i>FAM168B</i>	1,44	6,09E-09	3,01E-08
<i>SWAP70</i>	1,44	2,11E-06	7,27E-06
<i>GATAD2B</i>	1,45	2,70E-11	1,80E-10
<i>GDI1</i>	1,46	6,42E-12	4,68E-11
<i>SATB2</i>	1,46	8,64E-04	1,99E-03
<i>POU3F2</i>	1,46	2,15E-02	3,80E-02
<i>ARHGEF3</i>	1,46	3,15E-03	6,57E-03
<i>RPL28</i>	1,47	6,24E-05	1,73E-04
<i>YWHAZ</i>	1,47	1,60E-06	5,63E-06
<i>PHACTR1</i>	1,47	3,76E-03	7,73E-03
<i>CSNK1G1</i>	1,47	5,08E-11	3,28E-10
<i>LYSMD4</i>	1,49	7,00E-07	2,59E-06
<i>MEF2D</i>	1,50	2,78E-11	1,86E-10
<i>GLIS2</i>	1,50	1,40E-02	2,57E-02
<i>CD2BP2</i>	1,50	2,49E-11	1,67E-10
<i>FAM13C</i>	1,52	2,85E-02	4,89E-02
<i>FBLN7</i>	1,52	2,18E-03	4,66E-03
<i>ZFC3H1</i>	1,53	1,35E-08	6,32E-08
<i>CSE1L</i>	1,53	7,38E-15	7,61E-14
<i>CPD</i>	1,55	3,23E-06	1,08E-05
<i>KIF2A</i>	1,55	1,21E-06	4,31E-06
<i>PDXK</i>	1,56	2,01E-10	1,21E-09

<i>LETM2</i>	1,57	1,74E-03	3,80E-03
<i>PRR12</i>	1,57	1,77E-09	9,31E-09
<i>NSD1</i>	1,58	9,75E-14	8,83E-13
<i>SLC22A23</i>	1,58	1,39E-07	5,70E-07
<i>SLCO5A1</i>	1,59	6,59E-03	1,29E-02
<i>COPS7B</i>	1,59	2,05E-18	3,28E-17
<i>HNRNPA1</i>	1,59	3,10E-13	2,65E-12
<i>CLEC2D</i>	1,59	6,78E-10	3,79E-09
<i>CRELD2</i>	1,62	4,92E-09	2,46E-08
<i>FMNL3</i>	1,63	4,59E-07	1,75E-06
<i>ZMIZ2</i>	1,66	2,15E-18	3,42E-17
<i>MPPED2</i>	1,67	7,83E-03	1,51E-02
<i>RRAGD</i>	1,69	1,63E-05	4,95E-05
<i>RAD18</i>	1,70	7,41E-16	8,70E-15
<i>LENG8</i>	1,73	2,23E-11	1,51E-10
<i>CDH8</i>	1,77	1,35E-05	4,14E-05
<i>TNFSF15</i>	1,78	1,52E-03	3,34E-03
<i>CCT6A</i>	1,79	8,17E-25	2,73E-23
<i>NRARP</i>	1,79	7,06E-07	2,61E-06
<i>TRIM66</i>	1,79	1,13E-10	6,97E-10
<i>BAK1</i>	1,83	3,91E-10	2,25E-09
<i>LRRC39</i>	1,85	2,13E-04	5,43E-04
<i>AGPAT4</i>	1,85	1,01E-04	2,72E-04
<i>LUZP2</i>	1,87	4,76E-03	9,59E-03
<i>ANKRD27</i>	1,91	1,53E-14	1,52E-13
<i>VSX1</i>	1,93	2,00E-05	5,98E-05
<i>BAGE</i>	1,95	1,46E-03	3,22E-03
<i>CACNA1C</i>	2,00	1,15E-05	3,55E-05
<i>SLC36A1</i>	2,05	1,51E-16	1,93E-15
<i>TEAD2</i>	2,11	1,39E-07	5,70E-07
<i>GRIN2A</i>	2,13	4,79E-03	9,65E-03
<i>FBXL19</i>	2,18	6,82E-24	2,01E-22
<i>PLEKHG2</i>	2,20	1,72E-15	1,92E-14
<i>C22orf23</i>	2,28	1,72E-17	2,49E-16
<i>KLC2</i>	2,29	3,76E-22	9,05E-21
<i>DPY19L2P2</i>	2,32	1,42E-06	5,02E-06
<i>HMGB2</i>	2,33	2,47E-17	3,51E-16
<i>STC1</i>	2,35	9,43E-09	4,52E-08
<i>FOXK1</i>	2,37	1,00E-24	3,34E-23
<i>IRX5</i>	2,53	8,23E-06	2,61E-05
<i>MEOX2</i>	2,61	4,12E-07	1,58E-06
<i>CYB561D1</i>	2,64	6,07E-24	1,80E-22

<i>CDKN2B</i>	2,67	2,10E-15	2,31E-14
<i>KIF24</i>	3,33	3,45E-23	9,26E-22
<i>HELLS</i>	6,65	2,01E-28	9,67E-27
<i>POLQ</i>	9,11	3,65E-33	2,84E-31
<i>SLC7A11</i>	11,35	4,15E-19	7,12E-18
<i>SPC25</i>	14,54	7,06E-46	1,66E-43
<i>BUB1B</i>	15,89	9,31E-43	1,53E-40
<i>CDKN2D</i>	1,24	7,11E-03	1,38E-02
<i>MIF</i>	1,54	8,86E-04	2,03E-03
<i>OSR1</i>	1,96	2,14E-03	4,59E-03
<i>OXTR</i>	1,81	1,57E-03	3,45E-03
<i>TSC1</i>	1,92	2,07E-19	3,66E-18
<i>PCDH9</i>	-8,98	2,67E-22	6,51E-21
<i>ACADL</i>	-8,59	1,59E-11	1,10E-10
<i>RND3</i>	-6,04	1,31E-40	1,89E-38
<i>CD1D</i>	-5,38	2,21E-22	5,43E-21
<i>AQP4</i>	-5,10	5,95E-11	3,80E-10
<i>RNF125</i>	-4,94	5,70E-25	1,94E-23
<i>CAND2</i>	-4,71	9,20E-18	1,38E-16
<i>SLC38A4</i>	-4,48	2,67E-12	2,04E-11
<i>OLFM1</i>	-4,44	4,80E-12	3,55E-11
<i>ACADSB</i>	-4,19	4,81E-25	1,64E-23
<i>PDZRN3</i>	-4,18	1,55E-09	8,20E-09
<i>BACH2</i>	-3,95	1,68E-14	1,67E-13
<i>DLG2</i>	-3,82	1,51E-13	1,34E-12
<i>MYO16</i>	-3,73	6,60E-12	4,80E-11
<i>SLC39A14</i>	-3,53	2,09E-29	1,12E-27
<i>UNC93A</i>	-3,47	5,93E-05	1,65E-04
<i>COL14A1</i>	-3,44	1,49E-07	6,06E-07
<i>C21orf91</i>	-3,35	2,57E-30	1,50E-28
<i>CUX2</i>	-3,30	7,13E-06	2,29E-05
<i>PCDH7</i>	-3,24	2,73E-07	1,07E-06
<i>CRISPLD2</i>	-3,22	3,93E-10	2,26E-09
<i>LIPG</i>	-3,10	1,59E-10	9,68E-10
<i>FBLN5</i>	-3,06	3,32E-09	1,69E-08
<i>NAMPT</i>	-3,02	1,30E-15	1,47E-14
<i>TIAM1</i>	-2,89	5,37E-12	3,95E-11
<i>CBLN4</i>	-2,80	2,45E-04	6,20E-04
<i>KLF6</i>	-2,64	5,81E-19	9,83E-18
<i>SGK1</i>	-2,59	3,60E-11	2,37E-10
<i>PRICKLE2</i>	-2,53	8,50E-08	3,58E-07
<i>KLF9</i>	-2,51	1,16E-12	9,25E-12

<i>KLF11</i>	-2,33	1,77E-25	6,31E-24
<i>LRP1B</i>	-2,31	1,10E-03	2,48E-03
<i>NPAS3</i>	-2,29	9,59E-07	3,48E-06
<i>DBT</i>	-2,26	9,35E-24	2,68E-22
<i>MYO3A</i>	-2,26	6,78E-06	2,18E-05
<i>CDC14B</i>	-2,24	8,72E-11	5,47E-10
<i>PDLIM5</i>	-2,23	2,03E-23	5,61E-22
<i>RORA</i>	-2,22	2,52E-11	1,69E-10
<i>ZFP36L1</i>	-2,19	2,16E-25	7,61E-24
<i>LONRF1</i>	-2,14	1,97E-15	2,17E-14
<i>CMTM6</i>	-2,12	7,29E-21	1,53E-19
<i>EREG</i>	-2,11	5,23E-03	1,05E-02
<i>DOCK10</i>	-2,11	1,87E-06	6,52E-06
<i>CXorf21</i>	-2,10	1,68E-06	5,87E-06
<i>ZCCHC24</i>	-2,09	2,04E-19	3,61E-18
<i>SMARCA2</i>	-2,05	1,41E-11	9,77E-11
<i>BMP6</i>	-2,02	7,40E-07	2,73E-06
<i>MAK</i>	-1,97	1,89E-07	7,58E-07
<i>TMEM231</i>	-1,94	2,08E-05	6,20E-05
<i>KLRC1</i>	-1,89	1,29E-04	3,42E-04
<i>GK</i>	-1,88	2,84E-07	1,11E-06
<i>NFIA</i>	-1,86	1,60E-13	1,41E-12
<i>DUSP16</i>	-1,85	4,38E-12	3,26E-11
<i>CCND1</i>	-1,83	2,02E-05	6,03E-05
<i>PGRMC1</i>	-1,83	4,23E-09	2,13E-08
<i>VWA3B</i>	-1,82	4,46E-04	1,08E-03
<i>SEC24D</i>	-1,80	1,09E-09	5,88E-09
<i>CREBL2</i>	-1,78	2,63E-17	3,72E-16
<i>ZFHX4</i>	-1,74	1,58E-04	4,12E-04
<i>ZNF460</i>	-1,74	9,23E-08	3,87E-07
<i>ACYP2</i>	-1,74	5,08E-10	2,88E-09
<i>LIN7C</i>	-1,69	5,80E-25	1,97E-23
<i>NFATC1</i>	-1,64	1,74E-04	4,52E-04
<i>KIAA1217</i>	-1,64	3,41E-10	1,98E-09
<i>S1PR3</i>	-1,64	2,10E-03	4,52E-03
<i>CELF2</i>	-1,62	4,15E-04	1,01E-03
<i>NR5A2</i>	-1,60	3,63E-04	8,92E-04
<i>TRMT11</i>	-1,58	4,50E-07	1,72E-06
<i>RYBP</i>	-1,57	1,28E-15	1,45E-14
<i>PCCB</i>	-1,56	2,28E-09	1,19E-08
<i>SPSB1</i>	-1,55	1,90E-04	4,90E-04
<i>RNF138</i>	-1,52	2,33E-10	1,39E-09

<i>KLHL28</i>	-1,52	5,26E-07	1,99E-06
<i>DNAJB9</i>	-1,51	1,34E-06	4,76E-06
<i>TMEM30A</i>	-1,51	9,50E-13	7,68E-12
<i>RAB14</i>	-1,51	5,32E-17	7,25E-16
<i>ZNF654</i>	-1,50	1,01E-11	7,18E-11
<i>BAZ2B</i>	-1,49	1,29E-06	4,57E-06
<i>LARP4</i>	-1,49	3,88E-12	2,91E-11
<i>PPARA</i>	-1,48	5,94E-05	1,66E-04
<i>EVL</i>	-1,48	4,63E-04	1,11E-03
<i>AKT1</i>	-1,47	6,11E-11	3,89E-10
<i>KIAA1109</i>	-1,44	3,38E-05	9,77E-05
<i>SPATA1</i>	-1,43	6,52E-03	1,28E-02
<i>CNOT6L</i>	-1,42	1,02E-07	4,25E-07
<i>DCBLD2</i>	-1,42	2,06E-06	7,12E-06
<i>GPR85</i>	-1,42	2,16E-02	3,81E-02
<i>NHSL1</i>	-1,39	9,17E-04	2,10E-03
<i>FBXO33</i>	-1,37	1,67E-08	7,73E-08
<i>OSBPL8</i>	-1,36	3,89E-05	1,11E-04
<i>AP1G1</i>	-1,36	4,33E-08	1,90E-07
<i>BRWD1</i>	-1,36	1,70E-06	5,93E-06
<i>MIDN</i>	-1,36	2,86E-04	7,14E-04
<i>C16orf72</i>	-1,34	1,53E-09	8,12E-09
<i>FRY</i>	-1,32	5,36E-03	1,07E-02
<i>CYLD</i>	-1,31	1,14E-05	3,54E-05
<i>PITPNB</i>	-1,31	1,73E-07	6,96E-07
<i>SLC44A1</i>	-1,30	1,40E-04	3,68E-04
<i>WDFY2</i>	-1,29	3,67E-04	9,01E-04
<i>MBP</i>	-1,28	5,55E-03	1,10E-02
<i>YWHAE</i>	-1,28	5,28E-07	1,99E-06
<i>SS18</i>	-1,28	4,82E-07	1,83E-06
<i>LPP</i>	-1,27	7,94E-03	1,53E-02
<i>AKTIP</i>	-1,27	1,20E-03	2,70E-03
<i>DST</i>	-1,27	5,22E-03	1,04E-02
<i>EIF2AK3</i>	-1,25	2,07E-03	4,45E-03
<i>ANKH</i>	-1,24	4,47E-03	9,05E-03
<i>GRSF1</i>	-1,22	4,10E-05	1,17E-04
<i>EPC2</i>	-1,21	4,30E-03	8,74E-03
<i>AEBP2</i>	-1,20	5,03E-03	1,01E-02
<i>SEC23IP</i>	-1,20	4,75E-03	9,58E-03
<i>ATXN3</i>	-1,20	1,83E-03	3,98E-03
<i>YTHDC1</i>	-1,19	2,55E-05	7,52E-05
<i>ETNK1</i>	-1,19	6,59E-03	1,29E-02

<i>DCAF5</i>	-1,19	4,38E-04	1,06E-03
<i>ZNF644</i>	-1,18	6,05E-03	1,19E-02
<i>ROCK1</i>	-1,17	2,61E-02	4,52E-02
<i>YIPF5</i>	-1,17	1,15E-03	2,59E-03
<i>CTDSP1</i>	-1,16	8,73E-04	2,01E-03
<i>ZBTB44</i>	-1,16	2,26E-02	3,96E-02
<i>RAB5A</i>	-1,16	1,10E-03	2,49E-03
<i>SON</i>	-1,15	1,79E-02	3,21E-02
<i>TMEM33</i>	-1,15	1,44E-02	2,63E-02
<i>SLC39A9</i>	-1,14	1,78E-02	3,20E-02
<i>YTHDF2</i>	-1,10	1,27E-02	2,36E-02

Supplementary Table 3. miR-451a target genes filtered by inverse correlation (genes with increased expression, since miR-451a has decreased expression). FC (Fold Change), FDR (False Discovery Rate), T (tumor), N (normal), Pval (p value).

mirDIP	FC (T-N)	Pval	FDR	miR-451a
<i>KHDRBS1</i>	1,12	2,59E-03	5,47E-03	-4,29
<i>MATR3</i>	1,13	1,33E-03	2,96E-03	-4,29
<i>PNPT1</i>	1,14	1,52E-02	2,77E-02	-4,29
<i>MORF4L2</i>	1,14	1,01E-02	1,90E-02	-4,29
<i>KIF5B</i>	1,16	8,61E-03	1,65E-02	-4,29
<i>MPRIIP</i>	1,17	1,21E-02	2,25E-02	-4,29
<i>TRAM1</i>	1,17	1,91E-02	3,40E-02	-4,29
<i>UBN2</i>	1,17	1,21E-02	2,25E-02	-4,29
<i>SRP68</i>	1,18	1,49E-04	3,91E-04	-4,29
<i>VANGL1</i>	1,18	2,20E-02	3,87E-02	-4,29
<i>SFXN4</i>	1,18	1,31E-02	2,42E-02	-4,29
<i>PSMD11</i>	1,20	3,91E-05	1,12E-04	-4,29
<i>ARID4B</i>	1,20	6,30E-03	1,24E-02	-4,29
<i>RBM4</i>	1,21	4,66E-04	1,12E-03	-4,29
<i>ELAVL1</i>	1,21	1,27E-06	4,53E-06	-4,29
<i>ALG13</i>	1,22	7,01E-04	1,64E-03	-4,29
<i>DNAJC7</i>	1,22	1,40E-04	3,69E-04	-4,29
<i>SOCS5</i>	1,22	5,18E-04	1,24E-03	-4,29
<i>TSN</i>	1,22	1,35E-05	4,15E-05	-4,29
<i>POFUT2</i>	1,22	1,83E-03	3,97E-03	-4,29
<i>NPEPPS</i>	1,23	2,37E-03	5,04E-03	-4,29
<i>GIT2</i>	1,24	1,07E-05	3,34E-05	-4,29
<i>SUPT16H</i>	1,24	4,31E-06	1,42E-05	-4,29
<i>BTBD9</i>	1,25	4,37E-04	1,06E-03	-4,29

<i>GORASP2</i>	1,25	1,37E-07	5,61E-07	-4,29
<i>PPP1R11</i>	1,26	4,52E-06	1,48E-05	-4,29
<i>KLHL7</i>	1,27	1,49E-05	4,54E-05	-4,29
<i>KCTD10</i>	1,27	7,48E-06	2,39E-05	-4,29
<i>DBNL</i>	1,27	2,49E-06	8,52E-06	-4,29
<i>ZDHHC23</i>	1,28	1,57E-02	2,85E-02	-4,29
<i>ATP8B1</i>	1,29	1,21E-02	2,25E-02	-4,29
<i>PHF5A</i>	1,29	4,19E-07	1,60E-06	-4,29
<i>CAPRIN1</i>	1,30	3,79E-08	1,68E-07	-4,29
<i>HEXB</i>	1,30	2,36E-05	6,99E-05	-4,29
<i>CERK</i>	1,31	3,74E-04	9,17E-04	-4,29
<i>GMFB</i>	1,31	4,26E-06	1,40E-05	-4,29
<i>C5orf42</i>	1,31	1,26E-02	2,34E-02	-4,29
<i>RASGRP3</i>	1,33	7,59E-03	1,47E-02	-4,29
<i>USP46</i>	1,33	3,19E-05	9,26E-05	-4,29
<i>PHF20L1</i>	1,34	1,28E-06	4,57E-06	-4,29
<i>C15orf61</i>	1,35	5,04E-06	1,65E-05	-4,29
<i>CRTAP</i>	1,37	1,75E-05	5,28E-05	-4,29
<i>ZNF398</i>	1,37	8,13E-10	4,48E-09	-4,29
<i>NCOA6</i>	1,37	5,76E-07	2,16E-06	-4,29
<i>ATN1</i>	1,38	1,60E-06	5,60E-06	-4,29
<i>DRG2</i>	1,38	6,42E-07	2,38E-06	-4,29
<i>UPF3A</i>	1,38	6,56E-08	2,81E-07	-4,29
<i>MAML1</i>	1,38	2,39E-07	9,45E-07	-4,29
<i>SPTB</i>	1,38	1,70E-02	3,06E-02	-4,29
<i>XPO1</i>	1,40	3,62E-13	3,06E-12	-4,29
<i>C15orf40</i>	1,41	5,63E-09	2,79E-08	-4,29
<i>NSMAF</i>	1,41	1,98E-04	5,08E-04	-4,29
<i>SAMD4B</i>	1,41	1,58E-05	4,80E-05	-4,29
<i>DGCR2</i>	1,42	2,75E-10	1,62E-09	-4,29
<i>PHTF2</i>	1,43	1,15E-06	4,13E-06	-4,29
<i>TRAF7</i>	1,43	2,63E-09	1,36E-08	-4,29
<i>FAM168B</i>	1,44	6,09E-09	3,01E-08	-4,29
<i>SWAP70</i>	1,44	2,11E-06	7,27E-06	-4,29
<i>GATAD2B</i>	1,45	2,70E-11	1,80E-10	-4,29
<i>GDI1</i>	1,46	6,42E-12	4,68E-11	-4,29
<i>SATB2</i>	1,46	8,64E-04	1,99E-03	-4,29
<i>POU3F2</i>	1,46	2,15E-02	3,80E-02	-4,29
<i>ARHGEF3</i>	1,46	3,15E-03	6,57E-03	-4,29
<i>RPL28</i>	1,47	6,24E-05	1,73E-04	-4,29
<i>YWHAZ</i>	1,47	1,60E-06	5,63E-06	-4,29
<i>PHACTR1</i>	1,47	3,76E-03	7,73E-03	-4,29

<i>CSNK1G1</i>	1,47	5,08E-11	3,28E-10	-4,29
<i>LYSMD4</i>	1,49	7,00E-07	2,59E-06	-4,29
<i>MEF2D</i>	1,50	2,78E-11	1,86E-10	-4,29
<i>GLIS2</i>	1,50	1,40E-02	2,57E-02	-4,29
<i>CD2BP2</i>	1,50	2,49E-11	1,67E-10	-4,29
<i>FAM13C</i>	1,52	2,85E-02	4,89E-02	-4,29
<i>FBLN7</i>	1,52	2,18E-03	4,66E-03	-4,29
<i>ZFC3H1</i>	1,53	1,35E-08	6,32E-08	-4,29
<i>CSE1L</i>	1,53	7,38E-15	7,61E-14	-4,29
<i>CPD</i>	1,55	3,23E-06	1,08E-05	-4,29
<i>KIF2A</i>	1,55	1,21E-06	4,31E-06	-4,29
<i>PDXK</i>	1,56	2,01E-10	1,21E-09	-4,29
<i>LETM2</i>	1,57	1,74E-03	3,80E-03	-4,29
<i>PRR12</i>	1,57	1,77E-09	9,31E-09	-4,29
<i>NSD1</i>	1,58	9,75E-14	8,83E-13	-4,29
<i>SLC22A23</i>	1,58	1,39E-07	5,70E-07	-4,29
<i>SLCO5A1</i>	1,59	6,59E-03	1,29E-02	-4,29
<i>COPS7B</i>	1,59	2,05E-18	3,28E-17	-4,29
<i>HNRNPA1</i>	1,59	3,10E-13	2,65E-12	-4,29
<i>CLEC2D</i>	1,59	6,78E-10	3,79E-09	-4,29
<i>CRELD2</i>	1,62	4,92E-09	2,46E-08	-4,29
<i>FMNL3</i>	1,63	4,59E-07	1,75E-06	-4,29
<i>ZMIZ2</i>	1,66	2,15E-18	3,42E-17	-4,29
<i>MPPED2</i>	1,67	7,83E-03	1,51E-02	-4,29
<i>RRAGD</i>	1,69	1,63E-05	4,95E-05	-4,29
<i>RAD18</i>	1,70	7,41E-16	8,70E-15	-4,29
<i>LENG8</i>	1,73	2,23E-11	1,51E-10	-4,29
<i>CDH8</i>	1,77	1,35E-05	4,14E-05	-4,29
<i>TNFSF15</i>	1,78	1,52E-03	3,34E-03	-4,29
<i>CCT6A</i>	1,79	8,17E-25	2,73E-23	-4,29
<i>NRARP</i>	1,79	7,06E-07	2,61E-06	-4,29
<i>TRIM66</i>	1,79	1,13E-10	6,97E-10	-4,29
<i>BAK1</i>	1,83	3,91E-10	2,25E-09	-4,29
<i>LRRC39</i>	1,85	2,13E-04	5,43E-04	-4,29
<i>AGPAT4</i>	1,85	1,01E-04	2,72E-04	-4,29
<i>LUZP2</i>	1,87	4,76E-03	9,59E-03	-4,29
<i>ANKRD27</i>	1,91	1,53E-14	1,52E-13	-4,29
<i>VSX1</i>	1,93	2,00E-05	5,98E-05	-4,29
<i>BAGE</i>	1,95	1,46E-03	3,22E-03	-4,29
<i>CACNA1C</i>	2,00	1,15E-05	3,55E-05	-4,29
<i>SLC36A1</i>	2,05	1,51E-16	1,93E-15	-4,29
<i>TEAD2</i>	2,11	1,39E-07	5,70E-07	-4,29

<i>GRIN2A</i>	2,13	4,79E-03	9,65E-03	-4,29
<i>FBXL19</i>	2,18	6,82E-24	2,01E-22	-4,29
<i>PLEKHG2</i>	2,20	1,72E-15	1,92E-14	-4,29
<i>C22orf23</i>	2,28	1,72E-17	2,49E-16	-4,29
<i>KLC2</i>	2,29	3,76E-22	9,05E-21	-4,29
<i>DPY19L2P2</i>	2,32	1,42E-06	5,02E-06	-4,29
<i>HMGB2</i>	2,33	2,47E-17	3,51E-16	-4,29
<i>STC1</i>	2,35	9,43E-09	4,52E-08	-4,29
<i>FOXK1</i>	2,37	1,00E-24	3,34E-23	-4,29
<i>IRX5</i>	2,53	8,23E-06	2,61E-05	-4,29
<i>MEOX2</i>	2,61	4,12E-07	1,58E-06	-4,29
<i>CYB561D1</i>	2,64	6,07E-24	1,80E-22	-4,29
<i>CDKN2B</i>	2,67	2,10E-15	2,31E-14	-4,29
<i>KIF24</i>	3,33	3,45E-23	9,26E-22	-4,29
<i>HELLS</i>	6,65	2,01E-28	9,67E-27	-4,29
<i>POLQ</i>	9,11	3,65E-33	2,84E-31	-4,29
<i>SLC7A11</i>	11,35	4,15E-19	7,12E-18	-4,29
<i>SPC25</i>	14,54	7,06E-46	1,66E-43	-4,29
<i>BUB1B</i>	15,89	9,31E-43	1,53E-40	-4,29
<i>CDKN2D</i>	1,24	7,11E-03	1,38E-02	-4,29
<i>MIF</i>	1,54	8,86E-04	2,03E-03	-4,29
<i>OSR1</i>	1,96	2,14E-03	4,59E-03	-4,29
<i>OXTR</i>	1,81	1,57E-03	3,45E-03	-4,29
<i>TSC1</i>	1,92	2,07E-19	3,66E-18	-4,29

Supplementary Table 4. miR-451a target genes filtered by Fold Change (FC) ≥ 1.5 and False Discovery Rate (FDR) < 0.05 and $p \leq 0,05$. Tumor (T), Normal (N).

mirDIP	FC (T-N)	Pval	FDR	miR-451a	r (pearson) **
<i>BUB1B</i>	15,89	9,31E-43	1,53E-40	-4,29	-0,18
<i>SPC25</i>	14,54	7,06E-46	1,66E-43	-4,29	-0,21
<i>SLC7A11</i>	11,35	4,15E-19	7,12E-18	-4,29	0,00
<i>POLQ</i>	9,11	3,65E-33	2,84E-31	-4,29	-0,13
<i>HELLS</i>	6,65	2,01E-28	9,67E-27	-4,29	-0,14
<i>KIF24</i>	3,33	3,45E-23	9,26E-22	-4,29	-0,07
<i>CDKN2B</i>	2,67	2,10E-15	2,31E-14	-4,29	-0,11
<i>CYB561D1</i>	2,64	6,07E-24	1,80E-22	-4,29	-0,18
<i>MEOX2</i>	2,61	4,12E-07	1,58E-06	-4,29	0,13
<i>IRX5</i>	2,53	8,23E-06	2,61E-05	-4,29	0,04
<i>FOXK1</i>	2,37	1,00E-24	3,34E-23	-4,29	-0,20
<i>STC1</i>	2,35	9,43E-09	4,52E-08	-4,29	0,12

<i>HMGB2</i>	2,33	2,47E-17	3,51E-16	-4,29	-0,05
<i>DPY19L2P2</i>	2,32	1,42E-06	5,02E-06	-4,29	-0,03
<i>KLC2</i>	2,29	3,76E-22	9,05E-21	-4,29	-0,15
<i>C22orf23</i>	2,28	1,72E-17	2,49E-16	-4,29	-0,07
<i>PLEKHG2</i>	2,20	1,72E-15	1,92E-14	-4,29	-0,12
<i>FBXL19</i>	2,18	6,82E-24	2,01E-22	-4,29	-0,10
<i>GRIN2A</i>	2,13	4,79E-03	9,65E-03	-4,29	-0,20
<i>TEAD2</i>	2,11	1,39E-07	5,70E-07	-4,29	-0,22
<i>SLC36A1</i>	2,05	1,51E-16	1,93E-15	-4,29	-0,14
<i>CACNA1C</i>	2,00	1,15E-05	3,55E-05	-4,29	-0,06
<i>BAGE</i>	1,95	1,46E-03	3,22E-03	-4,29	0,11
<i>VSX1</i>	1,93	2,00E-05	5,98E-05	-4,29	-0,04
<i>ANKRD27</i>	1,91	1,53E-14	1,52E-13	-4,29	-0,10
<i>LUZP2</i>	1,87	4,76E-03	9,59E-03	-4,29	0,14
<i>AGPAT4</i>	1,85	1,01E-04	2,72E-04	-4,29	-0,01
<i>LRRC39</i>	1,85	2,13E-04	5,43E-04	-4,29	0,15
<i>BAK1</i>	1,83	3,91E-10	2,25E-09	-4,29	-0,23
<i>CCT6A</i>	1,79	8,17E-25	2,73E-23	-4,29	-0,19
<i>TRIM66</i>	1,79	1,13E-10	6,97E-10	-4,29	0,06
<i>NRARP</i>	1,79	7,06E-07	2,61E-06	-4,29	-0,04
<i>TNFSF15</i>	1,78	1,52E-03	3,34E-03	-4,29	-0,18
<i>CDH8</i>	1,77	1,35E-05	4,14E-05	-4,29	-0,06
<i>LENG8</i>	1,73	2,23E-11	1,51E-10	-4,29	-0,05
<i>RAD18</i>	1,70	7,41E-16	8,70E-15	-4,29	-0,13
<i>RRAGD</i>	1,69	1,63E-05	4,95E-05	-4,29	-0,10
<i>MPPED2</i>	1,67	7,83E-03	1,51E-02	-4,29	-0,05
<i>ZMIZ2</i>	1,66	2,15E-18	3,42E-17	-4,29	-0,09
<i>FMNL3</i>	1,63	4,59E-07	1,75E-06	-4,29	-0,06
<i>CRELD2</i>	1,62	4,92E-09	2,46E-08	-4,29	0,01
<i>COPS7B</i>	1,59	2,05E-18	3,28E-17	-4,29	-0,08
<i>HNRNPA1</i>	1,59	3,10E-13	2,65E-12	-4,29	-0,10
<i>CLEC2D</i>	1,59	6,78E-10	3,79E-09	-4,29	0,01
<i>SLCO5A1</i>	1,59	6,59E-03	1,29E-02	-4,29	-0,09
<i>NSD1</i>	1,58	9,75E-14	8,83E-13	-4,29	-0,10
<i>SLC22A23</i>	1,58	1,39E-07	5,70E-07	-4,29	-0,14
<i>PRR12</i>	1,57	1,77E-09	9,31E-09	-4,29	-0,11
<i>LETM2</i>	1,57	1,74E-03	3,80E-03	-4,29	-0,09
<i>PDXK</i>	1,56	2,01E-10	1,21E-09	-4,29	-0,03
<i>KIF2A</i>	1,55	1,21E-06	4,31E-06	-4,29	-0,07
<i>CPD</i>	1,55	3,23E-06	1,08E-05	-4,29	-0,17
<i>CSE1L</i>	1,53	7,38E-15	7,61E-14	-4,29	-0,06
<i>ZFC3H1</i>	1,53	1,35E-08	6,32E-08	-4,29	-0,06

<i>FBLN7</i>	1,52	2,18E-03	4,66E-03	-4,29	0,07
<i>FAM13C</i>	1,52	2,85E-02	4,89E-02	-4,29	0,12
<i>CD2BP2</i>	1,50	2,49E-11	1,67E-10	-4,29	-0,11
<i>MEF2D</i>	1,50	2,78E-11	1,86E-10	-4,29	-0,22
<i>GLIS2</i>	1,50	1,40E-02	2,57E-02	-4,29	-0,11

Supplementary Table 5. Analysis of molecular pathways enriched using ToppGene.

Pathways Name	Pval	Pathways Genes
RHO GTPases Activate Formins	4.27E-04	FMNL3,BUB1B,SPC25,KIF2A
Signaling by Rho GTPases	1.77E-03	FMNL3,BUB1B,SPC25,KLC2,KIF2A,PLEKH G2
RHO GTPase Effectors	1.91E-03	FMNL3,BUB1B,SPC25,KLC2,KIF2A
Resolution of Sister Chromatid Cohesion	3.76E-03	BUB1B,SPC25,KIF2A
Amino acid transport across the plasma membrane	3.99E-03	SLC36A1,SLC7A11
Mitotic Prometaphase	4.64E-03	BUB1B,SPC25,KIF2A
Proton-coupled neutral amino acid transporters	6.10E-03	SLC36A1
Activation and oligomerization of BAK protein	6.10E-03	BAK1
Pyridoxal phosphate salvage pathway	6.10E-03	PDXK
Kinesins	7.57E-03	KLC2,KIF2A
PLK1 signaling events	7.92E-03	BUB1B,KIF2A
Vitamin B6 metabolism	9.13E-03	PDXK
long term depression	1.22E-02	GRIN2A
Vitamins B6 activation to pyridoxal phosphate	1.22E-02	PDXK
Vitamin B6 Metabolism	1.22E-02	PDXK
Separation of Sister Chromatids	1.49E-02	BUB1B,SPC25,KIF2A
pyridoxal 5'-phosphate salvage	1.52E-02	PDXK
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	1.67E-02	CACNA1C,KLC2
Mitotic Anaphase	1.76E-02	BUB1B,SPC25,KIF2A
Long-term potentiation	1.77E-02	CACNA1C,GRIN2A
Mitotic Metaphase and Anaphase	1.78E-02	BUB1B,SPC25,KIF2A
Vitamin B6 metabolism	1.82E-02	PDXK
Amphetamine addiction	1.82E-02	CACNA1C,GRIN2A
COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic	2.64E-02	KLC2,KIF2A
long term potentiation	2.72E-02	GRIN2A
Folding of actin by CCT/TriC	3.01E-02	CCT6A
Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis	3.01E-02	HMGB2
Excitatory synaptic transmission	3.01E-02	GRIN2A
RHO GTPases activate KTN1	3.31E-02	KLC2
Granzyme A mediated Apoptosis Pathway	3.31E-02	HMGB2
HDR through MMEJ (alt-NHEJ)	3.31E-02	POLQ
Circadian entrainment	3.46E-02	CACNA1C,GRIN2A
Programmed cell death, or apoptosis, eliminates damaged or unneeded cells.	3.60E-02	BAK1
Membrane Trafficking	3.75E-02	COPS7B,KLC2,CPD,KIF2A,ANKRD27

Apoptosis induced DNA fragmentation	3.90E-02	HMGB2
Activation of DNA fragmentation factor	3.90E-02	HMGB2
MHC class II antigen presentation	3.93E-02	KLC2,KIF2A
Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides	4.21E-02	SLC36A1,SLC7A11
Golgi-to-ER retrograde transport	4.50E-02	KLC2,KIF2A
Glutamatergic synapse	4.72E-02	CACNA1C,GRIN2A
mTOR signaling	4.78E-02	RRAGD
Vesicle-mediated transport	4.88E-02	COPS7B,KLC2,CPD,KIF2A,ANKRD27
Unblocking of NMDA receptor, glutamate binding and activation	5.07E-02	GRIN2A
MAP00030 Pentose phosphate	5.07E-02	FMNL3
CREB phosphorylation through the activation of CaMKII	5.07E-02	GRIN2A
Triacylglycerol biosynthesis	5.07E-02	AGPAT4
Role of Erk5 in Neuronal Survival	5.36E-02	MEF2D
insulin secretion pathway	5.36E-02	CACNA1C
Cell cycle	5.48E-02	CDKN2B,BUB1B
Ras activation upon Ca ²⁺ influx through NMDA receptor	5.65E-02	GRIN2A
CDP-diacylglycerol biosynthesis	5.65E-02	AGPAT4
Inactivation of APC/C via direct inhibition of the APC/C complex	5.94E-02	BUB1B
Inhibition of the proteolytic activity of APC/C required for the onset of anaphase by mitotic spindle checkpoint components	5.94E-02	BUB1B
Dopaminergic synapse	5.96E-02	CACNA1C,GRIN2A
Direct p53 effectors	6.12E-02	CSE1L,BAK1
Role of Mitochondria in Apoptotic Signaling	6.22E-02	BAK1
Mitotic Spindle Checkpoint	6.22E-02	BUB1B
SALM protein interactions at the synapses	6.22E-02	GRIN2A
Role of MEF2D in T-cell Apoptosis	6.22E-02	MEF2D
Nitric Oxide Signaling Pathway	6.51E-02	GRIN2A
mTORC1-mediated signalling	6.80E-02	RRAGD
Cyclins and Cell Cycle Regulation	6.80E-02	CDKN2B
M Phase	6.86E-02	BUB1B,SPC25,KIF2A
MAP00052 Galactose metabolism	7.08E-02	FMNL3
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	7.08E-02	GRIN2A
MAP00051 Fructose and mannose metabolism	7.08E-02	FMNL3
Regulation of PGC-1 α	7.08E-02	MEF2D
Cell Cycle, Mitotic	7.14E-02	CDKN2B,BUB1B,SPC25,KIF2A
DNA Repair	7.28E-02	RAD18,COPS7B,POLQ
triacylglycerol biosynthesis	7.36E-02	AGPAT4
APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	7.36E-02	BUB1B
Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC	7.65E-02	CCT6A
Basigin interactions	7.93E-02	SLC7A11
Phase 2 - plateau phase	8.21E-02	CACNA1C

Cell Cycle: G1/S Check Point	8.21E-02	CDKN2B
Energy dependent regulation of mTOR by LKB1-AMPK	8.21E-02	RRAGD
FGFR2 alternative splicing	8.21E-02	HNRNPA1
Adrenaline,noradrenaline inhibits insulin secretion	8.21E-02	CACNA1C
Factors involved in megakaryocyte development and platelet production	8.27E-02	KLC2,KIF2A
YAP1- and WWTR1 (TAZ)-stimulated gene expression	8.49E-02	TEAD2
Nicotine pharmacodynamics pathway	8.49E-02	CACNA1C
Hippo signaling pathway -multiple species	8.49E-02	TEAD2
Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	8.49E-02	CCT6A
CREB phosphorylation through the activation of Ras	8.49E-02	GRIN2A
Myogenesis	8.49E-02	MEF2D
CDO in myogenesis	8.49E-02	MEF2D
Reelin signaling pathway	8.49E-02	GRIN2A
intrinsic apoptotic	8.49E-02	BAK1
Control of skeletal myogenesis by HDAC and calcium/calmodulin-dependent kinase (CaMK)	8.77E-02	MEF2D
Recognition of DNA damage by PCNA-containing replication complex	8.77E-02	RAD18
TNFs bind their physiological receptors	8.77E-02	TNFSF15
cGMP-PKG signaling pathway	8.82E-02	CACNA1C,MEF2D
Adherens junctions interactions	9.05E-02	CDH8
Oncogene Induced Senescence	9.33E-02	CDKN2B
Alzheimer's disease	9.57E-02	CACNA1C,GRIN2A
Apoptosis - multiple species	9.61E-02	BAK1
Apoptosis	9.85E-02	BAK1,HMGB2
SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer regulates transcription	9.88E-02	CDKN2B
Angiotensin II mediated activation of JNK Pathway via Pyk2 dependent signaling	9.88E-02	MEF2D
Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	9.88E-02	CCT6A
Synthesis of PA	9.88E-02	AGPAT4
Programmed Cell Death	1.01E-01	BAK1,HMGB2
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic	1.04E-01	KLC2,KIF2A
p38 MAPK pathway	1.04E-01	MEF2D
Calcium signaling pathway	1.06E-01	CACNA1C,GRIN2A
Post NMDA receptor activation events	1.07E-01	GRIN2A
NCAM1 interactions	1.07E-01	CACNA1C
mRNA Splicing - Major Pathway	1.12E-01	CD2BP2,HNRNPA1
DNA Damage Recognition in GG-NER	1.13E-01	COPS7B
G1 Phase	1.13E-01	CDKN2B
Cyclin D associated events in G1	1.13E-01	CDKN2B
Signaling events mediated by HDAC Class III	1.13E-01	MEF2D
Ferroptosis	1.15E-01	SLC7A11

mTOR signalling	1.15E-01	RRAGD
Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis	1.15E-01	CCT6A
p38 MAPK Signaling Pathway	1.15E-01	MEF2D
Nicotine addiction	1.15E-01	GRIN2A
Activation of NMDA receptor upon glutamate binding and postsynaptic events	1.18E-01	GRIN2A
PKB-mediated events	1.18E-01	RRAGD
Genes encoding structural ECM glycoproteins	1.20E-01	FBLN7,CRELD2
mRNA Splicing	1.20E-01	CD2BP2,HNRNPA1
Cell Cycle	1.21E-01	CDKN2B,BUB1B,SPC25,KIF2A
cAMP signaling pathway	1.22E-01	CACNA1C,GRIN2A
Cooperation of PDCL (PhLP1) and TRiC/CCT in G-protein beta folding	1.23E-01	CCT6A
Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	1.23E-01	CACNA1C
Beta1 adrenergic receptor signaling pathway	1.23E-01	CACNA1C
Viral carcinogenesis	1.25E-01	CDKN2B,BAK1
Intrinsic Pathway for Apoptosis	1.26E-01	BAK1
Transcriptional activation of mitochondrial biogenesis	1.29E-01	MEF2D
Ionotropic glutamate receptor pathway	1.31E-01	GRIN2A
Type II diabetes mellitus	1.31E-01	CACNA1C
Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer	1.31E-01	CDKN2B
Phase 0 - rapid depolarisation	1.34E-01	CACNA1C
Cocaine addiction	1.39E-01	GRIN2A
DNA Damage Bypass	1.42E-01	RAD18
Regulation of Androgen receptor activity	1.42E-01	ZMIZ2
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	1.45E-01	GRIN2A
Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	1.45E-01	MEF2D
MAP00010 Glycolysis Gluconeogenesis	1.47E-01	FMNL3
Apoptotic execution phase	1.50E-01	HMGB2
Mitochondrial biogenesis	1.53E-01	MEF2D
Formation of TC-NER Pre-Incision Complex	1.53E-01	COPS7B
Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	1.55E-01	GRIN2A
Oxytocin receptor mediated signaling pathway	1.55E-01	CACNA1C
Coregulation of Androgen receptor activity	1.60E-01	HNRNPA1
Golgi Associated Vesicle Biogenesis	1.60E-01	CPD
Glycerolipid metabolism	1.65E-01	AGPAT4
p53 pathway	1.65E-01	CSE1L
Interactions of neuroligins and neuroligins at synapses	1.65E-01	GRIN2A
Lysine degradation	1.65E-01	NSD1
Validated targets of C-MYC transcriptional repression	1.71E-01	CDKN2B
Cell-cell junction organization	1.73E-01	CDH8
NRAGE signals death through JNK	1.73E-01	PLEKHG2

Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	1.75E-01	CD2BP2,HNRNPA1
5HT2 type receptor mediated signaling pathway	1.76E-01	CACNA1C
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	1.78E-01	GRIN2A
Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism	1.80E-01	TEAD2,AGPAT4
Fas Signaling Pathway	1.81E-01	BAK1
Renin secretion	1.81E-01	CACNA1C
HTLV-I infection	1.84E-01	CDKN2B,BUB1B
Macroautophagy	1.86E-01	RRAGD
Circadian Clock	1.96E-01	MEF2D
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	1.98E-01	CACNA1C
Platinum drug resistance	2.01E-01	BAK1
PKMTs methylate histone lysines	2.01E-01	NSD1
Protein-protein interactions at synapses	2.01E-01	GRIN2A
trans-Golgi Network Vesicle Budding	2.01E-01	CPD
Clathrin derived vesicle budding	2.01E-01	CPD
Ensemble of genes encoding core extracellular matrix including ECM glycoproteins, collagens and proteoglycans	2.05E-01	FBLN7,CRELD2
Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	2.05E-01	BUB1B
Signaling by FGFR2	2.05E-01	HNRNPA1
APC:Cdc20 mediated degradation of cell cycle proteins prior to satisfaction of the cell cycle checkpoint	2.08E-01	BUB1B
NCAM signaling for neurite out-growth	2.09E-01	CACNA1C,GRIN2A
Signaling by TGF-beta Receptor Complex	2.10E-01	CDKN2B
Regulation of nuclear SMAD2/3 signaling	2.10E-01	CDKN2B
Cell death signalling via NRAGE, NRIF and NADE	2.13E-01	PLEKHG2
APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	2.13E-01	BUB1B
Cardiac muscle contraction	2.13E-01	CACNA1C
Activation of APC/C and APC/C:Cdc20 mediated degradation of mitotic proteins	2.15E-01	BUB1B
Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER)	2.15E-01	COPS7B
PI3K Cascade	2.18E-01	RRAGD
Regulation of insulin secretion	2.18E-01	CACNA1C
SLC-mediated transmembrane transport	2.18E-01	SLC36A1,SLC7A11
Aldosterone synthesis and secretion	2.22E-01	CACNA1C
Triglyceride Biosynthesis	2.22E-01	AGPAT4
Integrin Signaling Pathway	2.22E-01	CSE1L
Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase	2.25E-01	BUB1B
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2.25E-01	CACNA1C
Taste transduction	2.25E-01	CACNA1C
TGF-beta signaling pathway	2.27E-01	CDKN2B

Small cell lung cancer	2.27E-01	CDKN2B
Insulin secretion	2.30E-01	CACNA1C
Global Genome Nucleotide Excision Repair (GG-NER)	2.30E-01	COPS7B
IRS-mediated signalling	2.31E-01	RRAGD,GRIN2A
Salmonella infection	2.32E-01	KLC2
TP53 Regulates Metabolic Genes	2.32E-01	RRAGD
Insulin receptor signalling cascade	2.34E-01	RRAGD,GRIN2A
MAPKinase Signaling Pathway	2.34E-01	MEF2D
IGF1R signaling cascade	2.35E-01	RRAGD,GRIN2A
IRS-related events triggered by IGF1R	2.35E-01	RRAGD,GRIN2A
Signaling by Type 1 Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R)	2.36E-01	RRAGD,GRIN2A
GABAergic synapse	2.37E-01	CACNA1C
Wnt signaling pathway	2.39E-01	CDH8,HELLS
APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins	2.39E-01	BUB1B
Signaling by FGFR	2.39E-01	HNRNPA1
Regulation of mitotic cell cycle	2.39E-01	BUB1B
Cell junction organization	2.39E-01	CDH8
Dilated cardiomyopathy	2.41E-01	CACNA1C
G alpha (12/13) signalling events	2.41E-01	PLEKHG2
Protein digestion and absorption	2.41E-01	SLC36A1
Adaptive Immune System	2.43E-01	CLEC2D,KLC2,KIF2A,FBXL19
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	2.44E-01	CACNA1C
RAB GEFs exchange GTP for GDP on RABs	2.44E-01	ANKRD27
GnRH signaling pathway	2.46E-01	CACNA1C
Glycerophospholipid metabolism	2.53E-01	AGPAT4
Chaperonin-mediated protein folding	2.62E-01	CCT6A
Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	2.62E-01	COPS7B
Signaling by Insulin receptor	2.62E-01	RRAGD,GRIN2A
p75 NTR receptor-mediated signalling	2.64E-01	PLEKHG2
Anchoring of the basal body to the plasma membrane	2.64E-01	KIF24
Retrograde endocannabinoid signaling	2.67E-01	CACNA1C
Apoptosis signaling pathway	2.69E-01	BAK1
Protein folding	2.76E-01	CCT6A
TNFR2 non-canonical NF-kB pathway	2.78E-01	TNFSF15
Organelle biogenesis and maintenance	2.79E-01	KIF24,MEF2D
UCH proteinases	2.80E-01	FOXK1
Integration of energy metabolism	2.89E-01	CACNA1C
Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)	2.89E-01	CDKN2B
Nucleotide Excision Repair	2.91E-01	COPS7B
Cholinergic synapse	2.91E-01	CACNA1C
Serotonergic synapse	2.93E-01	CACNA1C

Hemostasis	3.10E-01	KLC2,KIF2A,SLC7A11
Vascular smooth muscle contraction	3.10E-01	CACNA1C
Huntington disease	3.15E-01	GRIN2A
PPARA activates gene expression	3.17E-01	TEAD2
Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors	3.19E-01	PDXK
Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)	3.23E-01	TEAD2
Oxidative Stress Induced Senescence	3.23E-01	CDKN2B
Autophagy - animal	3.25E-01	RRAGD
Glycerophospholipid biosynthesis	3.29E-01	AGPAT4
FoxO signaling pathway	3.34E-01	CDKN2B
Systemic lupus erythematosus	3.36E-01	GRIN2A
Cell-Cell communication	3.38E-01	CDH8
Spliceosome	3.38E-01	HNRNPA1
Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	3.42E-01	CLEC2D
Clathrin-mediated endocytosis	3.44E-01	COPS7B
Apelin signaling pathway	3.46E-01	MEF2D
Apoptosis	3.46E-01	BAK1
Homology Directed Repair	3.50E-01	POLQ
Cardiac conduction	3.54E-01	CACNA1C
Cell surface interactions at the vascular wall	3.56E-01	SLC7A11
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	3.58E-01	CACNA1C
Mitotic G1-G1/S phases	3.60E-01	CDKN2B
Rho GTPase cycle	3.60E-01	PLEKHG2
Phospholipase D signaling pathway	3.62E-01	AGPAT4
Neurotransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell	3.64E-01	GRIN2A
mTOR signaling pathway	3.72E-01	RRAGD
Oxytocin signaling pathway	3.75E-01	CACNA1C
Hippo signaling pathway	3.77E-01	TEAD2
Ensemble of genes encoding extracellular matrix and extracellular matrix-associated proteins	3.85E-01	FBLN7,CLEC2D,CRELD2,TNFSF15
Cadherin signaling pathway	3.87E-01	CDH8
Protein processing in endoplasmic reticulum	4.00E-01	BAK1
DNA Double-Strand Break Repair	4.06E-01	POLQ
Cellular responses to stress	4.06E-01	CDKN2B,RRAGD
Genes encoding proteins affiliated structurally or functionally to extracellular matrix proteins	4.09E-01	CLEC2D
Metabolism of vitamins and cofactors	4.20E-01	PDXK
Alcoholism	4.26E-01	GRIN2A
Signalling by NGF	4.37E-01	GRIN2A,PLEKHG2
Cilium Assembly	4.47E-01	KIF24
Cellular Senescence	4.55E-01	CDKN2B
Muscle contraction	4.67E-01	CACNA1C

Cell Cycle Checkpoints	4.67E-01	BUB1B
Phospholipid metabolism	4.73E-01	AGPAT4
Rap1 signaling pathway	4.77E-01	GRIN2A
Transmission across Chemical Synapses	4.90E-01	GRIN2A
Ras signaling pathway	5.04E-01	GRIN2A
Generic Transcription Pathway	5.09E-01	CDKN2B,TEAD2,RRAGD
Axon guidance	5.09E-01	CACNA1C,GRIN2A
GRB2 events in EGFR signaling	5.35E-01	GRIN2A
SHC1 events in EGFR signaling	5.35E-01	GRIN2A
SOS-mediated signalling	5.35E-01	GRIN2A
RAF/MAP kinase cascade	5.35E-01	GRIN2A
ARMS-mediated activation	5.41E-01	GRIN2A
Signalling to p38 via RIT and RIN	5.41E-01	GRIN2A
Frs2-mediated activation	5.42E-01	GRIN2A
MAPK1/MAPK3 signaling	5.44E-01	GRIN2A
Prolonged ERK activation events	5.45E-01	GRIN2A
MAPK signaling pathway	5.45E-01	CACNA1C
Signaling by Leptin	5.47E-01	GRIN2A
Interleukin receptor SHC signaling	5.49E-01	GRIN2A
Signalling to RAS	5.51E-01	GRIN2A
VEGFR2 mediated cell proliferation	5.54E-01	GRIN2A
Interleukin-2 signaling	5.59E-01	GRIN2A
Signalling to ERKs	5.60E-01	GRIN2A
Cytokine-cytokine receptor interaction	5.66E-01	TNFSF15
RET signaling	5.70E-01	GRIN2A
Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling	5.71E-01	GRIN2A
FCERI mediated MAPK activation	5.71E-01	GRIN2A
Neuroactive ligand-receptor interaction	5.77E-01	GRIN2A
Chromatin organization	5.78E-01	NSD1
Chromatin modifying enzymes	5.78E-01	NSD1
MAPK family signaling cascades	5.96E-01	GRIN2A
MicroRNAs in cancer	6.04E-01	BAK1
Deubiquitination	6.09E-01	FOXK1
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	6.22E-01	FBXL19
Transmembrane transport of small molecules	6.22E-01	SLC36A1,SLC7A11
VEGFA-VEGFR2 Pathway	6.44E-01	GRIN2A
Signaling by SCF-KIT	6.51E-01	GRIN2A
Signaling by VEGF	6.53E-01	GRIN2A
Developmental Biology	6.53E-01	CACNA1C,GRIN2A,MEF2D
Genes encoding secreted soluble factors	6.56E-01	TNFSF15
Neuronal System	6.63E-01	GRIN2A
Downstream signal transduction	6.67E-01	GRIN2A
DAP12 signaling	6.72E-01	GRIN2A
Ensemble of genes encoding ECM-associated	6.79E-01	CLEC2D,TNFSF15

proteins including ECM-affiliated proteins, ECM regulators and secreted factors		
Signaling by EGFR	6.80E-01	GRIN2A
Gene Expression	6.82E-01	CDKN2B,TEAD2,RRAGD,CD2BP2,HNRNP A1
Cytokine Signaling in Immune system	6.86E-01	GRIN2A,TNFSF15
Transcriptional Regulation by TP53	6.87E-01	RRAGD
DAP12 interactions	6.87E-01	GRIN2A
Class I MHC mediated antigen processing & presentation	6.89E-01	FBXL19
Signaling by PDGF	6.92E-01	GRIN2A
Fc epsilon receptor (FCER1) signaling	6.94E-01	GRIN2A
NGF signalling via TRKA from the plasma membrane	7.02E-01	GRIN2A
Pathways in cancer	7.07E-01	CDKN2B
Metabolism of lipids and lipoproteins	7.22E-01	TEAD2,AGPAT4
Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK	7.51E-01	GRIN2A
Neutrophil degranulation	7.84E-01	PDXK
Signaling by Interleukins	8.10E-01	GRIN2A
Metabolic pathways	9.12E-01	AGPAT4,PDXK
Innate Immune System	9.21E-01	GRIN2A,PDXK
Signaling by GPCR	9.29E-01	GRIN2A,PLEKHG2
GPCR downstream signaling	9.62E-01	PLEKHG2
Post-translational protein modification	9.64E-01	FOXK1
Metabolism of proteins	9.68E-01	CCT6A,FOXK1

SPC25 3'UTR	*****
Sequencing vector	CATACAAATAGGTATATAAAACGGTTTATTTTCTCTCTATTAATATCTCTTTTTCCTGTTTTTATTATTATTAACCTTTAAGTTTAGGGTACATG
SPC25 3'UTR	*****
Sequencing vector	GTTTTATTATTATTAACCTTTAAGTTTAGGGTACATGTCACAAATCTGCAGGTTTGTTACATATGTATACATGTCCTATTTGGTGTGTCACCCATTAA
SPC25 3'UTR	*****
Sequencing vector	AACTCGTCATTTCATTAGGTATATCTCCTAATGCTATCCCTCCCCCTCCCCAACCCCAACAGTCCCCGTTGTGTGATGTTCCCTTCCTGTGTCCATGTG
SPC25 3'UTR	*****
Sequencing vector	GGTGTCTCATTTGTTCAATTCCCACTAGGAGTGAGAAATATGTTGGTTTGGTTTGGTCTTTCGATAGTTTGTGAGAAATGATGGTTTCCAGCTTCATCC
SPC25 3'UTR	*****
Sequencing vector	CCAGCTTCATCCATGTTCCACAAAGGACATGAACTCATCCTTTTTATGGCTGCATAGTATCCATGGTGATATGTGCCACATTTTCTTAATCCAGTCTAT
SPC25 3'UTR	*****
Sequencing vector	ATCATTTGTTGGACATTTGGGTTGGTTCCAAAGTCTTGTGCTATTCGAATAGTCCGAAATAAACATAGCTGTGCTTTA

Supplementary Figure 1. Alignment of the 3'UTR sequence of the *SPC25* gene and the sequence resulting from the sequence performed after cloning the 3'UTR region of the *SPC25* gene in the pmiRGLO vector. Program used: Clustal X.

OBJETIVOS ALCANÇADOS E CONCLUSÃO

O miR-451a foi escolhido para validação funcional por estar diminuído em três bancos de dados (tumores primários de pacientes, meta-análise e TCGA) e agir como supressor tumoral no CHC, sendo relacionado com metástase, estágio clínico avançado e pior sobrevida livre de doença. Os genes-alvos do miR-451a identificados como relevantes na tumorigênese e ainda sem validação experimental foram: *FMNL3*, *BUB1B*, *SPC25*, *KIF2A*, *PLEKHG2*, *BAK1*, *HMGB2*, *MEF2D*, *CDKN2B*, *HELLS*, *RRAGD*, *CSE1L*. Apenas os genes *SPC25* e *MEF2D* tiveram uma diminuição significativa da expressão após a transfecção do mimético do miR-451a (RT-qPCR) nas duas linhagens de CHC. Como essa diminuição foi mais significativa ($p < 0.01$) no gene *SPC25*, ele foi selecionado para o ensaio de luciferase, uma vez que um alvo direto do miR-451a irá levar a inibição da tradução ou degradação RNAm. O ensaio de luciferase demonstrou que o gene *SPC25* é alvo direto do miR-451a, visto que a co-transfecção do plasmídeo com a região 3'UTR do gene *SPC25* e do mimético do miR-451a levou a uma diminuição da luminescência. Além disso, a restauração da expressão do miR-451a levou ao aumento da expressão do gene *SPC25*, à diminuição do potencial de proliferação, migração e invasão nas linhagens celulares Hep 3B e PCL/PRF/5.

Conclusão: O gene *SPC25* é alvo direto do miR-451a. Além disso, a expressão do miR-451a diminuiu o potencial de proliferação, migração, invasão celular nas linhagens Hep 3B e PCL/PRF/5. Esses achados sugerem que o miR-451a está relacionado ao processo de tumorigênese e progressão do carcinoma hepatocelular e pode ser um potencial alvo terapêutico por meio da regulação do gene *SPC25*.

CAPÍTULO II

Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior-BEPE (FAPESP 2019/17003-9)

No período de 21/10/2019 a 20/01/2020 foi executado o projeto intitulado “*Effect of miR-451a on metabolomic profiles of hepatocellular carcinoma cell lines*” na Universidade de Aberystwyth, no *Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences (IBERS)* junto ao grupo de pesquisa *Aber Systems Biology*, liderado pelo Professor Luis A. J. Mur. O Professor Mur é um colaborador ativo do nosso grupo de pesquisa e o desenvolvimento desse projeto reforçou ainda mais os laços de colaboração entre os grupos. O objetivo do estudo foi avaliar a relação entre o miR-451a e alterações na expressão gênica e metabólica em vias biológicas associadas à tumorigênese no CHC. Para isso, o miR-451a *mimic* (Life Technologies, mirVana™ miRNA Mimic) ou o seu controle negativo (Life Technologies, mirVana™ miRNA Mimic Negative Control) foram transfectados nas linhagens celulares de CHC (Hep 3B e PCL/PRF/5) utilizando o reagente *Lipofectamine RNAiMAX* (Life Technologies, USA). As células foram coletadas utilizando o *cell scraper* e os metabólitos foram extraídos usando metanol/clorofórmio/H₂O, e analisados método de *Flow Infusion Electrospray Ionization High Resolution Mass Spectrometry (FIE-HRMS)*. A análise estatística dos dados foi realizada pelo MetaboAnalyst 4.0 utilizando os pacotes do R e Bioconductor e a indentificação dos metabólitos e vias moleculares foi feita no *Human Metabolomics Database* e no *KEGG database*. Ao integrar resultados de perfis metabolômicos, expressão de miRNA e RNAm, foi possível gerar um maior entendimento do processo de tumorigênese do câncer de fígado como um todo. Os resultados estão mostrados na forma de artigo científico ainda em preparo para publicação, uma vez que experimentos adicionais deverão ser realizados para finalização do manuscrito.

Anexo 2. Manuscrito: “Restoration of miR-451a expression leads to calcitriol accumulation in the PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cell line.”

Restoration of miR-451a expression leads to calcitriol accumulation in the PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cell line.

Carolina Fazio Campos^{1,2}, Natália Bertoni², Larissa Carvalho Ferreira³, Márcio Carvalho⁴, Tainara F. Felix², Sandra A. Drigo^{1,2}, Manfred Beckmann³, Luis A. J. Mur^{3*}, Patricia P. Reis^{1,2*}.

1Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

2Experimental Research Unity (UNIPEX), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

3Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences (IBERS), Aberystwyth University, Aberystwyth, United Kingdom

4Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

*** Equal Corresponding Authors:**

Patricia P. Reis

patricia.reis@unesp.br

Luis A. J. Mur

lum@aber.ac.uk

ABSTRACT

Introduction: Liver cancer is the fourth most common cause of cancer death worldwide, being hepatocellular carcinoma (HCC) the most common type (~85%). Micro(mi)RNAs are gene expression regulators involved in cancer development and progression. miR-451a is downregulated in HCC and is associated with advanced staging, early recurrence, metastasis and poor prognosis. Here we investigated the role of miR-451a in metabolomic reprogramming using an in vitro model of HCC. **Material and Methods:** The PLC/PRF/5 HCC cell line was transfected with miR-451a mimic or negative control. RT-qPCR was used to confirm miR-451a differential expression upon transfection and to quantify target gene expression. Metabolite profiles were evaluated by using Flow Infusion Electrospray Ionization High Resolution Mass Spectrometry (FIE-HRMS) in HCC cell lines transfected with miR-451a mimic vs. control cells. **Results:** We observed the accumulation of calcitriol, the active form of vitamin D, in cell lines transfected with miR-451a compared to controls. The P450 enzyme CYP24A1 catalyzes the degradation of calcitriol, thus *CYP24A1* was investigated in these cells showing significantly downregulation ($p < 0.05$) in miR-451a-transfected cells. **Conclusion:** We demonstrated that restoration of miR-451a expression leads to increased calcitriol accumulation in the PLC/PRF/5 HCC cell line. Thus, deregulation of miR-451a leading to loss of calcitriol might be involved in liver tumorigenesis.

Keywords: hepatocellular carcinoma, microRNA, liver cancer cell line, metabolomics, target genes, calcitriol, keyword, *CYP24A1*.

INTRODUCTION

Liver cancer is the fourth most common cause of cancer death and the sixth most frequent type of cancer, with approximately 782,000 deaths each year, and 841,000 new cases worldwide (1). Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for ~ 85% of primary liver tumours. HCC is a complex disease involving a multistep biological process of malignant transformation. Patients are often diagnosed in advanced stages with poor prognosis, and accompanied by aggressive and drug-resistant tumours (2). Despite the advances in knowledge about tumour biology and biological behaviour of disease, the mechanisms of HCC development and progression are not fully elucidated.

miRNAs are small non-coding RNAs with ~ 22 nucleotides in length with a pivotal role in gene expression regulation. They bind mainly to the 3'-UTR region of messenger RNA (mRNA) through complete or partial sequence homology, leading to translational inhibition or mRNA degradation (3). miRNAs are indicated as biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and treatment (3,4), and play important role in tumorigenesis, as oncogenes and/or tumour suppressors, being associated with several tumour types, including HCC (5). miRNA-451a has attracted increasing attention due to its critical role in development and progression of several tumour types, including carcinomas of the breast (6,7), lung (8,9), stomach (10), colon (11), glioma (12,13) and HCC (14–17). In HCC, miR-451a is downregulated and associated with advanced clinical staging, early recurrence, metastasis and overall lower survival (18).

Metabolic reprogramming is a hallmark of cancer (19), therefore metabolomics is a useful tool for the identification, quantification, and characterization of metabolites produced within cells and biological systems (20). Flow Infusion Electrospray Ionization High Resolution Mass Spectrometry (FIE-HRMS) technology can provide a high-throughput, non-targeted “snap-shot” of the metabolism of a cell, organ, organism or interaction between organisms (21). The activation of oncogenes and/or the loss of tumour suppressor genes lead to alterations in the metabolic profile promoting uncontrolled proliferation and growth (20,22). Metabolomic studies in oncology led to major contributions; for instance, in the identification of octanoylcarnitine, 5-oxoproline, hypoxanthine and docosahexaenoic acid as diagnostic biomarkers in plasma of breast cancer patients (23).

The metabolic signature in HCC cells is well defined: the high glucose demand supports the pentose phosphate pathway, lactate production by anaerobic glycolysis, and fatty acid production by FASN - fatty acid synthase (24). The metabolic functions in the liver

undergo changes during HCC tumorigenesis, which can be detected before clinical manifestations of the disease. For example, increased serum lactate discriminates normal liver from HCC tissues (25). In addition, lactate dehydrogenase accumulation is significantly associated with poor prognosis in patients with HCC, which can be used to assess patient prognosis (26).

The effects of deregulated miRNAs in metabolic pathways in HCC have not been elucidated. Thus, this study aimed to investigate the effect of miR-451a on the metabolism of HCC cell line. The transfection of miR-451a in PLC/PRF/5 liver cancer cell line led to increased calcitriol levels as detected by FIE-HRMS. Interestingly, *CYP24A1* is a potential target of miR-451a and has an important role in regulation of calcitriol expression in HCC.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

HCC cell line PLC/PRF/5 (ATCC CRL-8024) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). Cells were cultured according to the recommended protocol, at 37 °C under 5 % CO₂, in Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific) and 1% antimycotic (100X) (Thermo Fisher Scientific). Cell line authentication was performed by Short Tandem Repeat (STR) DNA profiling using the GenePrint® 10 System- Promega, Madison, USA. In addition, cells were routinely tested to ensure the absence of mycoplasma contamination (Mycoplasma Venor™ GeM- Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (**as described in Supplementary Material**).

miRNA transfection

Cells were plated in twenty-four-well plates as 1x10⁵ cells/well. The transfection of miR-451a mimic (Life Technologies, mirVana98™miRNA Mimic, code: 4464066, MIMAT0001631) or negative control (Life Technologies, mirVana™ miRNA mimic negative control, code: 4464058) were performed for 24 h using lipofectamine RNA iMAX Reagent (Life Technologies, USA) diluted in Opti-MEM® Reduced Serum Medium

(Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. All experiments were performed in triplicate.

RNA extraction

Total RNA was extracted from the HCC cells by using TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, USA) as recommended by the manufacturer. RNA quantification and quality were determined with NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Quantitative Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

miR-451a detection and quantification were performed according to Gasic et al (27). Primer sequences are shown in **Table 1**. Stem-loop RT primers were designed as previously described by Chen et al (28).

In order to evaluate miR-451a expression, cDNA synthesis was conducted using the SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen) following the protocol: 10 µL of 100 ng RNA sample, 0.5 µl of 10 mM dNTP mix, and 1 µL of 1 µM Stem-loop RT primer. Samples were heated at 65 °C for 5 min and immediately placed on ice for 2 min. To this was added 4 µl of 5 × First-Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT, 0.1 µl RNaseOUT (40 units / µl), 0.5 µL SuperScript III (200 units / µl), and 1.9 µL of nuclease free water. From this a 20 µL aliquot was incubated for 30 min at 16 °C, followed by pulsed RT of 60 cycles at 30 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 50 °C for 1 s, and finally an incubation step at 85 °C for 5 min. The RT product was amplified using the forward miR-451a primer and the universal reverse primer.

Target genes were reverse transcribed into cDNA by High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) as described by the manufacturer. The primers were designed using Primer Express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) (**Table 1**).

Table 1. Primer sequences used for miR-451a and *CYP24A1* quantification by RT-qPCR.

Name	Sequence
Stem-loop RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTCA-3'
Forward miR-451a	5'-CGGCGGAACCGTTACCATAC-3'
Universal reverse primer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
Forward RNU6B	5'-GCAAATTCGTGAAGCGTTCC-3'
<i>CYP24A1</i> Forward	5'-GCAGCGGCTGGAGATCAA-3'
<i>CYP24A1</i> Reverse	5'-CGTAGCCTTCTTTGCGGTAGTC-3'
<i>B2M</i> Forward	5'-GTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3'
<i>B2M</i> Reverse	5'-TGAAACCCAGACATAGCAATTC-3'

miR-451a and *CYP24A1* expression data were assessed using primers described in **Table 1**, and the SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) in the QuantStudio™ 12K Flex System (Thermo Fisher Scientific, USA). Data were imported and analysed in Expression Suite Software v1.0.3 (Thermo Fisher Scientific, USA), as described by the manufacturer. The small RNA MammU6 (RNU6B) and B2M were used as internal controls to normalize miR-451a and *CYP24A1* expression, respectively. Relative quantification of miR-451a and *CYP24A1* expression were evaluated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and significance was accepted at p-value < 0.05 (27).

Metabolite extraction and fingerprinting

After 24 h of transfection, cell culture growth medium was removed and cells were rinsed twice using 1 mL of phosphate buffered saline (PBS), following the addition of 300 µl of PBS. Cells were detached using a rubber tipped cell scraper (BD Biosciences, Bedford, MA). Cell suspensions were lysed by two cycles of freeze–thaw (fresh frozen in liquid nitrogen and thawed at 37 °C for 10 min), followed by 30 seconds (s) of sonication on ice.

To this, 900 µL of chilled extraction solvent of methanol: chloroform: H₂O (1:1:0.1) was added to 300 µL of cell suspension. Samples were placed in a vortex for 5 s to homogenize the mixture following by incubation on a shaker for 20 min at 4 °C. Samples were stored at -20 °C for 20 min to precipitate proteins. Samples were centrifuged at 11,000 x *g* for 6 min at 4 °C. The supernatant was transferred to a new tube, from which 100 µl were transferred to a glass vial and sealed. Samples were stored at -20 °C until run. FIE-HRMS was used to generate *m/z* in positive and negative ionization modes (29).

Statistical and bioinformatics analysis

RT-qPCR statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. All data was normally distributed and were expressed by mean ± standard deviation. Statistical differences between miR-451a transfected cells vs. control cells were assessed using Student's t-test with p < 0.05. Statistical analyses of metabolomics data were performed with MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), using R and Bioconductor packages (29). Data were filtered by Interquartile Range (IQR), normalized by log₁₀ transformation and

Pareto scaled (30). Significant features were determined based on *t*-test with *p*-value < 0.05. Principal Component Analysis (PCA) was used to distinguish the differences between mimic miR-451a transfected cells vs. controls. Metabolites significantly contributing to the variation were displayed using a heatmap (31). The *mummichog* algorithm was used to identify the *m/z* in the MS Peaks to Pathways module in MetaboAnalyst 4.0. The significant compounds were annotated using KEGG, based on mass-to charge (*m/z*) with an accuracy of < 5ppm and ionisation patterns. Biomarker analysis was performed using classical univariate ROC curve (32). Prediction of miR-451a target genes was performed using mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (33). Associations between identified metabolites and miR-451a target-genes were identified using OmicsNet (<https://www.omicsnet.ca/>) (34).

RESULTS

The PCL/PRF/5 cell line was successfully transfected with miR-451a mimic as demonstrated by an increase of miR-451a in PCL/PRF/5 cell line but not in control cells (**Figure 1A**). The metabolomic profiles of PCL/PRF/5 transfected cell lines were assessed by FIE-HRMS. The negative and positive ionization was performed in all samples, however the negative ionization patterns failed to identify any metabolites which significantly differed between transfected and control cells. Therefore, all subsequent results were derived following positive ionization. PCA of these data showed a marked difference with PC1 describing 96.9% of the variation between miR-451a restored compared to control cells (**Figure 1B**). The major sources of variation between miR-451a and control cells were identified using a *t*-test based on false discovery rates (FDR) and *p*. values of <0.05 (**Table 2**).

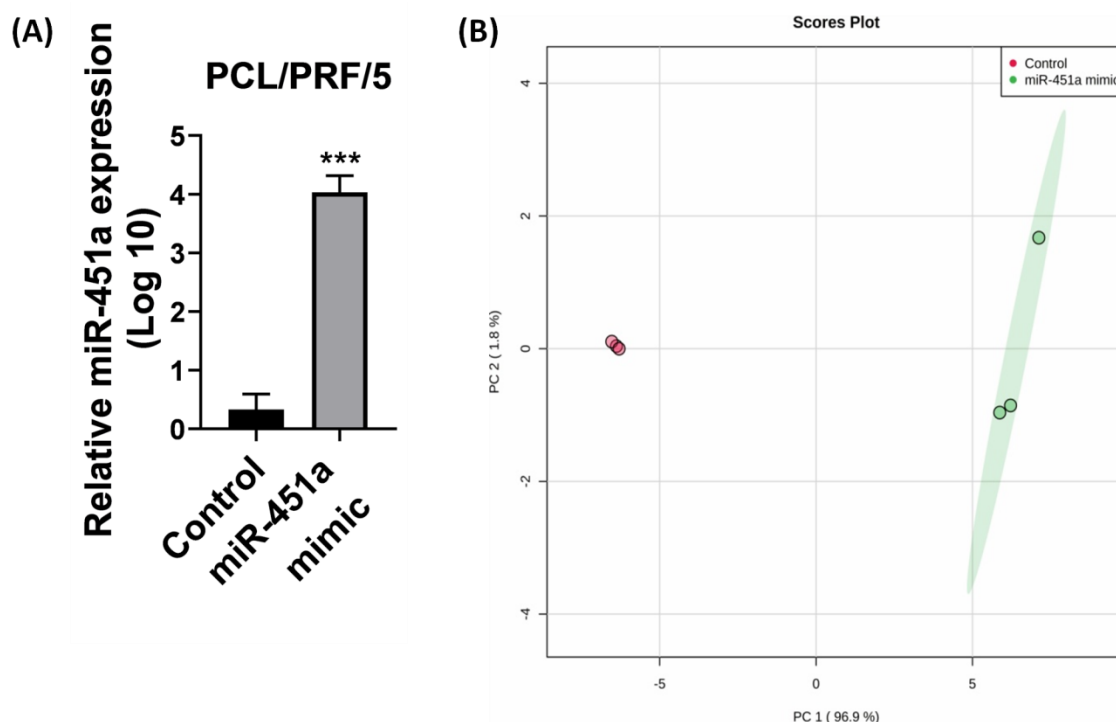


Figure 1. (A) Relative miR-451a expressions, after 24h of miR-451a mimic and control transfection, quantified by RT-qPCR. Expression of miR-451a is presented as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relative to U6. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance was analysed by the Student's t-tests. $^{**}P < 0.01$. **(B)** Principal Component Analysis showing the definite distinction between the control group and the transfected cell lines with miR-451a mimic. The variation in the positive ionization mode across PC1 was 96.9 %, and the areas in red and green indicate 95% confidence interval for the experimental class.

Table 2. Annotated compounds with their correspondent m/z, p. value, FDR, and their relative abundance (higher or lower) in miR-451a mimic transfected lines compared to control PCL/PRF/5 HCC cell lines.

Compound	m/z	p.value	FDR	miR-451a mimic vs control
3-Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate	773.58838	1.95E-10	1.34E-06	Higher
Coniferol	137.09567	6.85E-07	0.00036259	Higher
Pregnane	373.24698	9.16E-07	0.00042822	Higher
Oleoyl-CoA	1070.32935	9.34E-07	0.00042822	Higher
Farnesoyl-CoA	1044.255	2.68E-06	0.00080128	Higher
Phenylhydrazine	147.03233	3.67E-06	0.00095028	Lower
Indole-5,6-quinone	147.03233	3.67E-06	0.00095028	Lower
Calcitriol	455.2962	4.01E-06	0.00095028	Higher
Nicotinamide riboside	212.11761	9.96E-06	0.0014937	Lower
Stearoyl-CoA	950.41772	1.32E-05	0.0016652	Higher
D-Mannitol 1-phosphate	219.06209	2.29E-05	0.00232	Higher

Testolate	339.21399	2.66E-05	0.0026132	Higher
Prostaglandins	309.24033	3.03E-05	0.0029042	Higher
N-Acetylimidazole	93.04456	3.04E-05	0.0029042	Higher
beta-Carotene	536.43683	9.85E-05	0.0067059	Higher
1,2-Dihydrosantonin	248.14246	0.00027335	0.016495	Higher
Discadenine	323.18289	0.00028467	0.017028	Higher
N-Acetylmuramoyl-Ala	337.16229	0.00037521	0.022061	Lower
Prephenate	249.03529	0.00057103	0.031503	Higher
Phosphoagmatine	229.10408	0.00062562	0.034156	Higher
Propylmalate	199.05711	0.00075616	0.040638	Higher

Metabolites with significant variation between transfected and control cells are displayed using a heatmap (**Figure 2A**). To highlight biological function, these metabolites were mapped onto a global map, indicating the predominance of the following pathways: lipid metabolism, amino acid metabolism and metabolism of cofactors and vitamins (**Figure 2B**). The most important feature in the amino acid pathways was indole-5,6-quinone, which is related to tyrosine metabolism and was downregulated in miR-451a transfected cells compared to control cells. In cofactors and vitamin metabolism, miR-451a transfected cells showed a decrease of nicotinamide riboside (NR), associated with redox reactions; and an increase of beta-carotene and calcitriol, related with antioxidant properties and the regulation of many physiological processes, respectively (**Figure 2**).

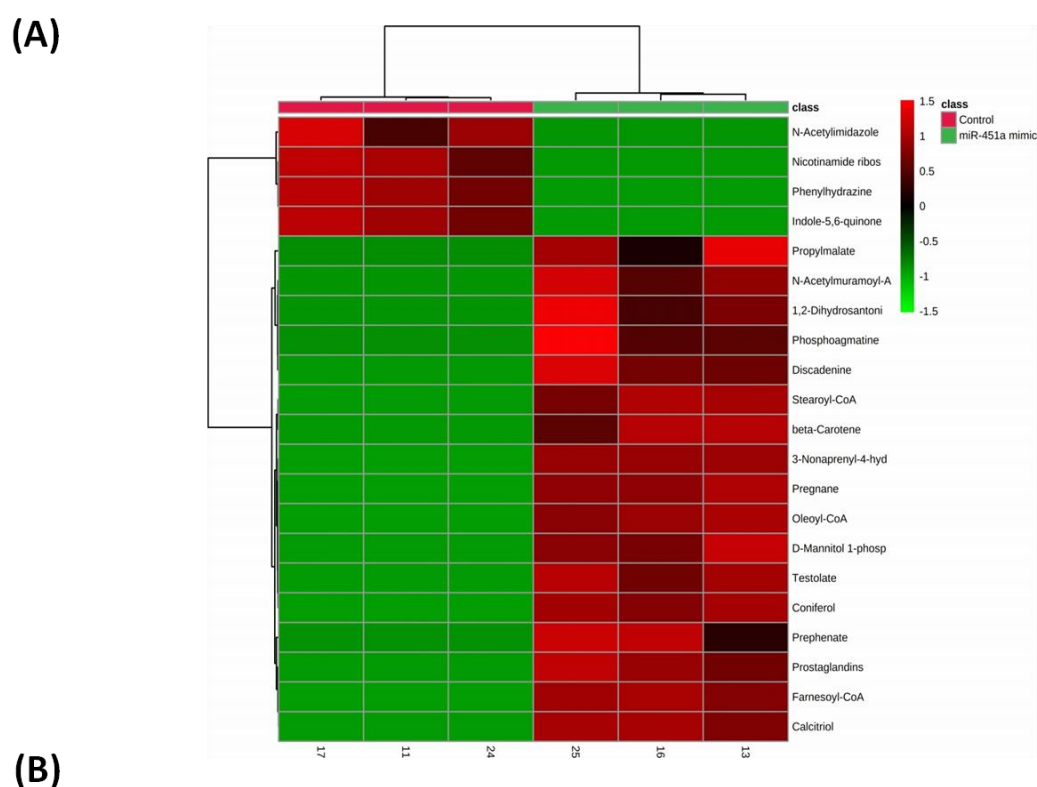


Figure 2. (A) Heatmap illustrating the relative accumulation of significant altered metabolites (positive ionisation) between control and miR-451a-transfected cells. **(B)** Metabolites indicated by FIE-HRMS in positive ionisation mode that discriminate PCL/PRF/5 cell line transfected with miR-451a and control mapped onto KEGG Atlas global metabolism map. The most significant compounds are indicated with light yellow nodes.

To assess the metabolites as potential biomarkers, the discriminatory metabolites were ranked based on ROC curve. Calcitriol, indole-5,6-quinone, nicotinamide riboside, and

beta-carotene were suggested as potential biomarkers based on their area under the curve (AUC) values (**Table 3**). Notably, calcitriol was shown as the best biomarker to HCC with AUC equal to 1 (100 % accuracy) but also (t-test p value of 1.55×10^{-5} and Log2 fold change (FC) of -6.5131) (**Figure 3A**). Metabolites and microRNA target genes can together regulate important mechanisms and these relationships were investigated using the OmicsNet platform, which provides a network analytics for multi-omics integration. miR-451a target genes (predicted by mirDIP), and metabolites with statistically significant variation were assessed using the OmicsNet. We found networks between calcitriol and miR-451a target-genes, CP24A1 and CYP27B1, both of which are related to degradation and activation of calcitriol, respectively (**Figure 3B**). To experimentally confirm this relationship, RT-qPCR assessments were used. A decrease in *CYP24A1* target gene expression upon miR-451a mimic transfection compared to control cells was observed. This result indicates that *CYP24A1* is likely targeted by miR-451a in the HCC cell line (**Figure 3C**).

Table 3. ROC analysis for individual biomarkers. Area under the curve (AUC).

Compound	AUC	T-test	Log2 FC
Calcitriol	1.0	1.5563E-5	-6.513
Indole-5,6-quinone	1.0	1.1817E-4	1.8856
Nicotinamide riboside	1.0	3.9131E-4	1.7173
Beta-carotene	1.0	4.8648E-4	-5.2471

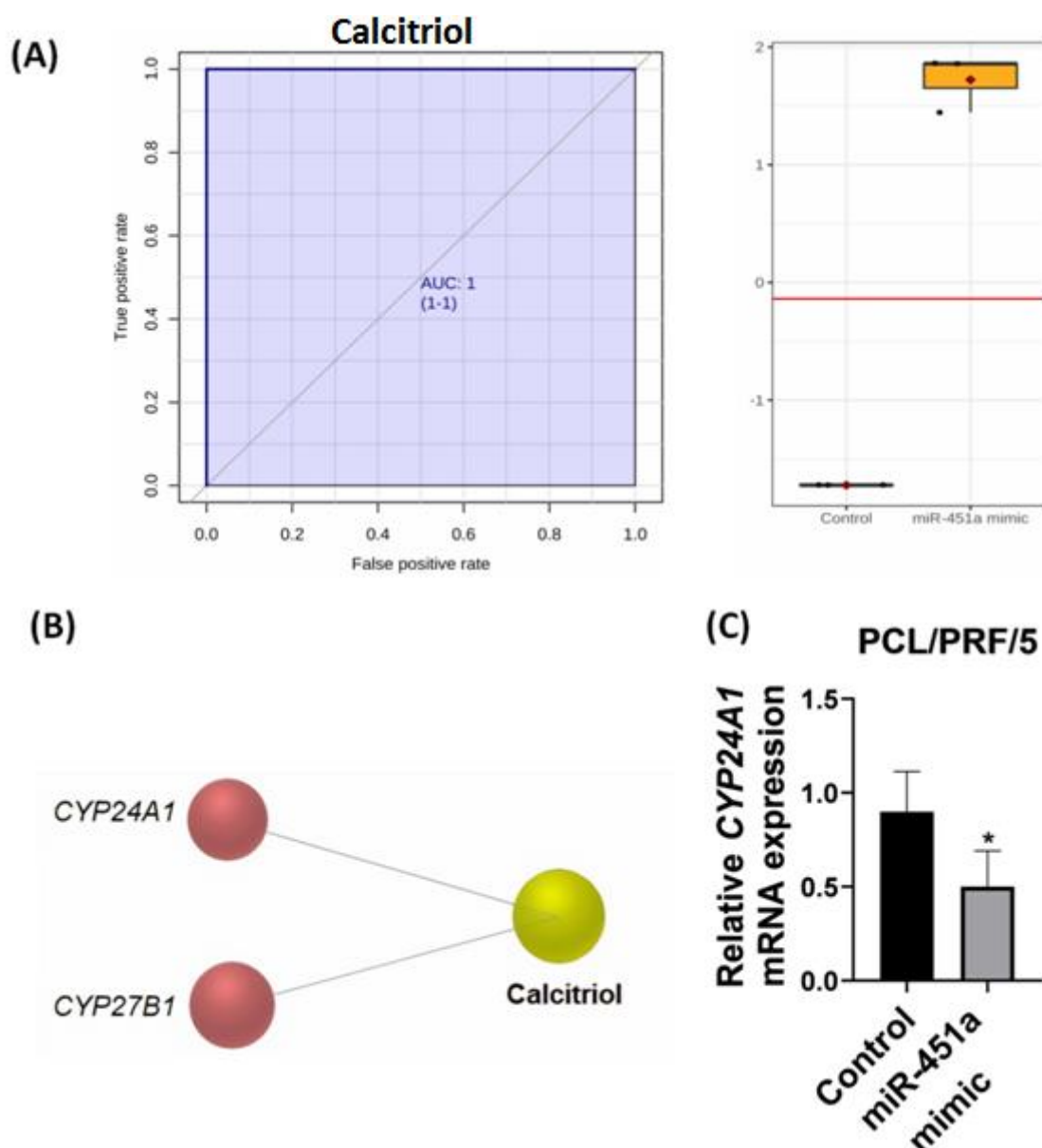


Figure 3. (A) Classical univariate receiver operator curve (ROC) analysis of the calcitriol compound and the corresponding box plots comparing miR-451-treated and control cells (y axis = log₁₀ relative abundance). AUC = area under the curve. **(B)** miR-451a target genes related to calcitriol using the OmicsNet platform. The metabolite is indicated as a yellow node. miRNA-targeted genes are represented by the pink nodes. **(C)** Relative CYP24A1 expressions, after 24h of miR-451a mimic or control transfection, by RT-qPCR. mRNA RT-qPCR data are presented as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relative to B2M; the internal control. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance was analysed by the Student's t-tests. *P < 0.05.

DISCUSSION

miR-451a is deregulated in several types of cancer. It acts as a tumour suppressor gene modulating multiple pathways involved in cell cycle and proliferation, cell survival and apoptosis, angiogenesis, metastasis and drug resistance. miR-451a has been suggested as a biomarker for the diagnosis and prognosis in diverse types of cancer (35). In HCC, miR-451a expression is downregulated in tissues and cell lines (15,16,36), and correlated with TNM grade, vascular invasion, and lower overall survival (14). It was reported that miR-451a inhibits proliferation, migration, and invasion by targeting *YWHAZ* (36) and the exosomal miR-451a regulates tumour cell apoptosis and angiogenesis by targeting *LPIN1* (37).

In the current study, PCL/PRF/5 cells transfected with miR-451a mimic led to a decreased of indole-5,6-quinone, compound related with tyrosine metabolism. Tyrosine metabolism has been linked to many forms of cancer (38) and its deregulation may be expected in HCC, since the enzyme phenylalanine hydroxylase that produces tyrosine from phenylalanine is functional in the liver (39). Nicotinamide riboside (NR), the precursor of nicotinamide adenine dinucleotide or NAD^+ was significant decreased in miR-451a-transfected cells. NAD^+ is a co-enzyme that mediates redox reactions and is involved in energy metabolism, DNA repair, gene expression, and stress response (40). NAD^+ is also involved in cancer development and progression and is considered a promising therapeutic target in cancer treatment (41). β -carotene, which is a precursor of vitamin A, has potent antioxidant properties (42). In consequence, β -carotene has received a lot of attention as a potential chemopreventive agent. According to Paolini et al., individuals with low tissue levels of β -carotene usually are more predisposing to develop different types of cancer (43).

One of our most significant observations was the impact of miR-451a on 1, 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)₂D₃) or calcitriol; the bioactive form of vitamin D. Calcitriol is a fat-soluble hormone obtained from exposure to sunlight, diet and some health supplements (44). Calcitriol is involved in a wide variety of biological processes including bone metabolism, intestinal absorption of calcium and regulation of calcium-phosphate metabolism. More recent data indicate that calcitriol regulates cell differentiation, proliferation, angiogenesis and apoptosis. Thus, a potential application of vitamin D in the treatment of differences diseases, including cancer has being explored (45). In cancer development, calcitriol acts in cell proliferation and inhibition by regulating p21 and p27, increasing apoptosis by the reduction of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 and the induction

of pro-apoptotic molecule BAX. Furthermore, calcitriol can decrease the expression of important oncogenes such as hypoxia-inducible factor 1a (HIF1a) and c-Myc, whilst the vitamin D receptor (VDR) can regulate the tumour suppressor p53 (46). Therefore, calcitriol deficiency can be considered as a risk factor in cancer.

In HCC, vitamin D deficiency has been correlated with increased risk of HCC development, an advanced stage of HCC and a poor prognostic indicator (47,48). Furthermore, the relationship between VDR and HCC has been received a lot of attention (49). Specific VDR genetic polymorphisms have been associated with HCC (50). Moreover, VDR is targeted by miR-125a-5p, and the inhibition of this miRNA and consequently the upregulation of VDR enhances the anti-tumour impact of astemizole with Vitamin D on HCC. These effects have been linked to decrease of cell proliferation and viability, increase of apoptosis, decrease of cell migration and invasion in HepG2 and SMMC-7221 cell lines (51).

Other studies have shown the potential role of vitamin D in prevention and treatment of HCC. Pourgholami et al. showed that 1,25-(OH)₂D₃ inhibited cell proliferation *in vitro* (Hep-3B, PLC/PRF/5) and retarded tumour growth *in vivo* (SKHEP-1 tumour-bearing nude mice) (52). Additionally, p62/SQSTM1, found to be downregulated in HCC-associated hepatic stellate cells (HSC), decreases the liver inflammation and fibrosis in non-HCC tissue by promoting VDR signalling (53). It was also reported that 1,25(OH)₂D₃ inhibited tumour growth in HepG2 cell xenograft model in nude mouse and induced apoptosis by down-regulating *HDAC2*, up-regulating p53, increasing DR5 and cleaved caspase 8 (54). Moreover, a HepG2 cell line treated with 1,25(OH)₂D₃ and Notch inhibitor showed decreased cell proliferation, migration and invasion and increased apoptosis (55).

Everolimus (EVE) is a rapamycin (mTOR) inhibitor (mTORi) and has been evaluated as a second-line treatment in HCC patients. However, the drug resistance is observed in almost cases and is the cause of treatment failure. Vitamin D can re-induces EVE sensitivity through the upregulation of miR-375 and consequently downregulating *MTDH*, *YAP-1*, and *c-MYC* oncogenes, which are responsible for epithelial to mesenchymal transition (EMT) and drug resistance (56). All these data aligned with ours suggest that calcitriol can be involved in HCC development.

We also verified the predicted miR-451a target genes related to calcitriol, cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (*CYP24A1*) and cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1 (*CYP27B1*). *CYP24A1* encodes the enzyme that catalyses the conversion of 25(OH)D₃ and 1 α 25(OH)₂D₃ into 24-hydroxylated products, which are

inactive forms of vitamin D. In contrast, the *CYP27B1* encodes the enzyme 1- α -hydroxylase (1 α -hydroxylase) that converts vitamin D to the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, also known as calcitriol (46). Crucially, when we restored miR-451a expression in HCC cell line, significant decrease of *CYP24A1* expression was detected. Thus, increased production of calcitriol and decreased expression of *CYP24A1* induced upon miR-451a transfection suggests that *CYP24A1* is likely targeted by miR-451a.

Altered expression of *CYP24A1* has been related with several types of cancer, promoting resistance to the effects of calcitriol (57). High *CYP24A1* expression has been associated with worse prognosis and may be a predictive marker of calcitriol efficacy in patients with cancer as an adjunctive therapy (58). Furthermore, *CYP24A1* has been reported as an oncogene and may contribute to tumour aggressiveness (59). *CYP24A1* expression was also associated with poor prognosis in patients with lung (60) and colon (61) carcinoma. Together, these studies suggest that cancer cells can decrease the effects of calcitriol by overexpression of *CYP24A1*, which reduces calcitriol concentration (46). Deregulation of *CYP24A1* mediated by altered miRNA expression has been supported by different studies. It was demonstrated that miR-125b, which is normally downregulated in cancer, targets *CYP24* in breast cancer cell line. Thus, decreased miR-125b may be a mechanism of *CYP24* upregulation (62). Inactivation of the miR-17~92 cluster also leads to a decrease of vitamin D accumulation by suppression of *CYP24A1* (63).

CONCLUSION

By using multiple experimental approaches in HCC line model, we showed that restoration of miR-451a expression leads to increased calcitriol metabolite expression, likely mediated by targeting *CYP24A1*. Further studies are needed to confirm the relevance of these findings in human HCC.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CFC, PPR, LAJM, SAD and NB designed the study, performed data interpretation and wrote the manuscript. CFC and TFF performed cell line authentication, mycoplasma contamination test and cell culture. CFC, NB and MC performed metabolite extraction and fingerprinting. MB performed Flow Infusion Electrospray Ionization High Resolution Mass Spectrometry. CFC, NB and LCF helped with data analysis, statistical analysis and bioinformatics analysis. All authors read and approved the final version of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

FUNDING

Research funds were obtained from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant #2016/03905-2 to P. P. Reis). C.F.C. was additionally funded through the Coordination for the Improvement of Higher Level Education (CAPES) and FAPESP: fellowship #2018/06354-2 and #2019/17003-9.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible through infrastructure at the IBERS, UK and the and Experimental Research Unity (UNIPEX), São Paulo State University (UNESP), Brazil.

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

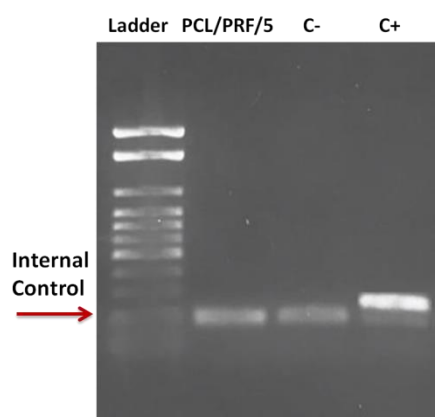
- and EMT via targeting YWHAZ in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(12):5158–67.
37. Zhao S, Li J, Zhang G, Wang Q, Wu C, Zhang Q, et al. Exosomal MIR-451a functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by targeting LPIN1. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(1):19–35.
 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.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Detection of Mycoplasma Contamination

Mycoplasma detection was performed using the Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), according to the manufacturer's instructions. This kit utilizes the polymerase chain reaction (PCR) in the detection of Mycoplasma and Acholeplasma contamination in cell cultures. The result was visualized on a 1.5% agarose gel. In **Supplementary Figure 1**, it is possible to observe that the PCL/PRF/5 cell line had amplification in 191bp, internal control (red arrow), and only the positive control had amplification in 270bp, band which indicates contamination.



Supplementary Figure 1. The internal amplification control (191bp) is detected in all reactions (red arrow). The band at 270 bp only in the positive control indicates that the PCL/PRF/5 cell line do not have contamination. **Ladder** 100bp; Negative Control (C-); and Positive Control (C+).

STR Analysis for Human Cell Line Authentication

STR Analysis for Human Cell Line Authentication was performed by GenePrint® 10 System- Promega, Madison, USA, according to the manufacturer's instructions. This kit allows the co-amplification and detection of nine human loci (TH01, TPOX, vWA, Amelogenin, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, and D5S818) and includes the D21S11 internal control. The first step was the amplification of the region of interest by PCR using the Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler- Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, with the following cycling conditions: 96 ° C - 1 min., 30 cycles of 94 ° C- 10 s, 59 ° C- 1 min., 72 ° C - 30 s, followed by a cycle of 60 ° C for 10 min. The second step was the detection of amplified fragments, using Internal Lane Standard 600 and Hi-Di™ formamide, followed by samples denaturation at 95 ° C for 3 min., and ice (~ 4 °C) for 3 min. The samples were

denatured and analyzed in the Applied Biosystems® 3500 capillary sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The data were exported and analyzed using GeneMarker® (<https://softgenetics.com/GeneMarker.php>). The DNA-STR profile was analyzed in the DSMZ database (<https://www.dsmz.de/fp/cgi-bin/str.html>), in order to compare our result with previously established STR profile. **Supplementary Table 1** shows the results obtained from the sequencing data analyzed in the GeneMarker for each locus of the PCL/PRF/5 cell line. The results of **Supplementary Table 1** were compared to the profile in DMSZ STR database, and PCL/PRF/5 showed 89% authenticity (**Supplementary Figure 2**).

Supplementary Table 1. PCL/PRF/5 profile with the number of STR repetitions detected at each locus.

Locus	PCL/PRF/5
D5S818	12,12
D13S317	11,12
D7S820	9,11
D16S539	13,13
VWA	16,16
TH01	8,8
AM	X,X
TPOX	5,8
CSF1PO	10,10
Authenticity	89%

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TP OX	CSF1PO
	Query (Your Cell)		12,12	11,12	9,11	13,13	16,16	8,8	X,X	5,8	10,10
0.89(32/36)	CRL-8024	PLC/PRF/5	12,12	11,12	9,11	13,13	15,16	8,8	X,X	8,8	10,10
0.83(30/36)	IFO50069	Alexander cells	12,12	11,12	9,11	13,13	15,16	7,8	X,X	8,8	10,10
0.83(30/36)	JCRB0406	PLC/PRF/5	12,12	11,12	9,11	13,13	15,16	7,8	X,X	8,8	10,10
0.67(24/36)	CRL-1611	ACHN	12,12	12,12	9,11	12,13	16,17	8,8	X,X	8,11	11,11
0.67(24/36)	RCB1962	ACHN	12,12	12,12	9,11	12,13	16,17	8,8	X,X	8,11	11,11
0.61(22/36)	15	ML-2	12,12	9,12	9,11	9,12	16,16	7,9,3	X,X	8,10	10,11
0.61(22/36)	86	SPI-801	12,12	8,8	9,11	11,12	16,16	9,3,9,3	X,X	8,9	10,10

0.61(22/36)	92	SPI-802	12,12	8,8	9,11	11,12	16,16	9,3, 9,3	X,X	8,9	10,10
0.61(22/36)	363	KYSE-70	12,12	11,12	8,11	13,13	16,18	7,7	X,X	8,8	12,12
0.61(22/36)	752	1618-K	12,12	11,11	7,7	13,13	16,19	9,9, 3	X,X	8,8	10,10
0.61(22/36)	CCL-84	Detroit 539	11,13	11,13	9,11	13,13	16,18	8,9	X,X	8,10	9,10
0.61(22/36)	CRL-1848	NCI-H292 [H292]	13,13	11,12	10,10	9,13	16,17	8,8	X,X	8,11	10,10
0.61(22/36)	CRL-1999	T/G HA-VSMC	12,13	11,12	9,10	12,12	16,16	7,8	X,X	8,8	10,11
0.61(22/36)	CRL-2126	PCI:SG231	12,12	9,10	11,11	14,14	16,16	8,9	X,X	8,11	10,10
0.61(22/36)	CRL-2871	HCC4006	12,12	11,12	9,12	11,12	16,17	7,7	X,X	8,9	10,10
0.61(22/36)	CRL-9267	W5-6	10,12	11,12	9,10	11,11	16,16	9,9, 3	X,X	8,8	10,10
0.61(22/36)	IFO5002 2	HL-60	12,12	8,11	11,12	11,11	16,16	8,8	X,X	8,11	13,14
0.61(22/36)	JCRB00 06	HL60RG	12,12	8,11	11,12	11,11	16,16	8,8	X,X	8,11	13,14
0.61(22/36)	JCRB01 90	KYSE-70	12,12	11,12	8,11	13,13	16,18	7,11	X,X	8,8	12,12
0.61(22/36)	RCB074 9	MFH-ino	12,12	11,11	9,11	11,11	16,19	7,9	X,X	8,11	10,10
0.61(22/36)	RCB076 8	HP50-2	12,12	8,11	11,12	11,11	16,16	8,8	X,X	8,11	13,14
0.61(22/36)	RCB076 9	HP100-1	12,12	8,11	11,12	11,11	16,16	8,8	X,X	8,11	13,14

Supplementary Figure 2. Authentication result from the PCL/PRF/5 cell line for tested markers, showing 89% authenticity with the STR DNA profile deposited in the DSMZ database.

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.