

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO lincRNA PVT1 NA LINHAGEM
CELULAR LNCaP DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

Gabriel Nakanishi Fortes

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Orientadora:

Dra. Maria Gabriela Berzoti Coelho

Coorientador:

Dr. Sergio Verjovski-Almeida

São Paulo
2024

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	<i>Actina Beta</i>
AR	Receptor de Andrógeno (<i>Androgen Receptor</i>)
cDNA	DNA complementar
CRPC	Câncer de próstata resistente � castração (<i>castration resistant prostate cancer</i>)
CTRL	Controle
ESTAURO	Estaurosporina
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
lincRNA	RNA longo não codificador intergênico
lncRNA	RNA longo não codificador
MOI	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
mRNA	RNA mensageiro
PCa	Câncer de próstata
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
<i>PVT1</i>	<i>Plasmacytoma Variant Translocation 1</i>
qPCR	PCR quantitativo (em tempo real)
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativo
sgRNA	RNA gu�ia

RESUMO

FORTES, G.N. **Caracterização funcional do lincRNA *PVT1* na linhagem celular LNCaP de câncer de próstata.** 2024. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Palavras-chave: Câncer de Próstata; RNAs longos não codificadores; *PVT1*.

O câncer de próstata (PCa) é um dos tumores mais diagnosticados no mundo e possui alta taxa de mortalidade dentre os acometidos pela doença. Seu desenvolvimento é altamente dependente do receptor de andrógeno, um receptor nuclear que medeia a sinalização promovida pelos hormônios androgênicos, controlando a transcrição de genes por meio de sua ativação ou inibição nas células da próstata. Além disso, sabe-se que outros fatores biológicos estão relacionados ao PCa, como a reprogramação epigenética não mutagênica, sendo que essas mudanças desempenham papéis no início e na progressão de diversos cânceres, inclusive o PCa. Um dos possíveis mecanismos envolvidos nessa reprogramação são os RNA longos não codificadores (lncRNAs), ácidos nucleicos com pelo menos 200 nucleotídeos que, embora não sejam traduzidos em proteínas, estão associados ao desenvolvimento de câncer pelo aumento de resistência a terapias, diminuição de apoptose, entre outros fatores. Dessa forma, o presente estudo busca investigar os mecanismos celulares do câncer de próstata que são possivelmente afetados pelo *PVT1*, um lncRNA cuja associação com o receptor de andrógeno já foi demonstrada. Para isso, o *PVT1* foi silenciado na linhagem LNCaP de câncer de próstata, por meio da técnica de edição gênica CRISPR-Cas13d. Em seguida, foram avaliadas as respostas das células com relação aos processos celulares de proliferação, apoptose e invasão. Os testes de proliferação celular demonstraram diferença significativa na taxa de replicação das células com o lncRNA silenciado, comparadas ao grupo controle. Os experimentos de Western Blot indicaram uma maior sensibilização à apoptose em células com *knockdown* do *PVT1*. Por fim, resultados preliminares não mostraram diferenças significativas nas taxas de invasão entre as células controle e *knockdown*. Tais achados experimentais poderão auxiliar na descrição do *PVT1* como um novo potencial alvo farmacológico.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Próstata

O câncer de próstata (PCa) é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado entre o sexo masculino e a quinta causa de morte relacionada a câncer no mundo (SUNG et al., 2021). Dentre os fatores de risco, o principal é a idade, sendo que cerca de 85% dos casos são diagnosticados em pessoas acima de 65 anos, seguidos por descendência afro-americana, histórico familiar, níveis de hormônios androgênicos, dieta, entre outros (GANDAGLIA et al., 2021; PATEL; KLEIN, 2009).

O desenvolvimento do câncer de próstata é altamente dependente do receptor de andrógeno (AR), um fator de transcrição que induz a ativação ou inibição da expressão de genes específicos da próstata por meio de sua interação com centenas de coativadores ou correpressores (HEEMERS; TINDALL, 2007).

Em situações fisiológicas, a testosterona é convertida em di-hidrotestosterona pela enzima 5 α -redutase nas células da próstata. A ligação de di-hidrotestosterona ao receptor de andrógeno induz a dimerização do AR, o que permite sua ligação às regiões promotoras de genes alvos. Moléculas coativadoras e correpressoras se associam ao dímero do receptor de andrógeno, facilitando ou impedindo, respectivamente, a transcrição dos genes alvo. A ativação ou repressão de genes leva a respostas biológicas como crescimento e sobrevivência celular (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

O PCa pode ser inicialmente assintomático, sendo que, em alguns casos, não é necessário tratamento. No entanto, quando presentes, os sintomas apresentados podem ser: dificuldade em urinar e aumento da frequência e vontade de urinar durante à noite. Na fase mais avançada, podem ocorrer retenção urinária e dor nas costas, uma vez que o local mais comum de metástase são os ossos (RAWLA, 2019).

Dentre os tratamentos mais recorrentes para o PCa, estão a privação androgênica com agonistas ou antagonistas do hormônio, castração cirúrgica ou farmacológica (terapia hormonal); remoção parcial ou total da próstata (prostatectomia); radioterapia e quimioterapia (SEKHOACHA et al., 2022). A

terapia de privação androgênica é a primeira linha de tratamento, sobretudo para câncer metastático. Porém, em diversos casos há progressão gradual para o fenótipo resistente à castração (*Castration-Resistant Prostate Cancer* - CRPC) (LITWIN; TAN, 2017).

No CRPC, muitos pacientes param de responder à terapia convencional com os inibidores de andrógeno devido às mutações genômicas no AR (SEKHOACHA et al., 2022), como amplificações ou mutações do gene do AR, superexpressão da proteína do AR, variantes de *splicing* do AR, alteração das funções de correguladores do AR, mutações aberrantes pós traducionais no AR e aumento da síntese do hormônio (HUANG et al., 2018).

1.2. RNAs longos não codificadores

Com relação aos estudos do câncer, desde 2000 são conhecidas as “Marcas do Câncer” (*The hallmarks of cancer*), evidenciando características celulares comuns e de extrema importância entre os tumores, sendo elas: escape da apoptose, promoção da angiogênese, potencial de replicação ilimitado, invasão de tecidos e metástase, proliferação independente dos estímulos propagados por fatores de crescimento e insensibilidade aos sinais anticrescimento (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

Com o passar dos anos, outras características foram exploradas, como a reprogramação epigenética não mutagênica. As mudanças genéticas (mutações) no DNA sempre foram consideradas os iniciadores de transformações nas células cancerígenas. Porém, o que se conhece hoje, é que as mudanças epigenéticas também desempenham um papel fundamental no início e na progressão de diferentes tipos de câncer (HANAHAHAN, 2022).

Dentre um dos possíveis mecanismos envolvidos entre as modificações epigenéticas estão os RNAs longos não codificadores (lncRNAs). Esses ácidos nucléicos são transcritos a partir de regiões amplamente difundidas no genoma humano (DERRIEN et al., 2012), possuem 200 ou mais nucleotídeos e não são traduzidos em proteínas (ESTELLER, 2011).

A função dos lncRNAs ainda é pouco entendida. Atualmente, são conhecidos mais de cem mil lncRNAs humanos, mas apenas um pequeno número de lncRNAs, cerca de dois mil, foram funcionalmente estudados, e

apenas uma pequena fração destes foi caracterizada em detalhe (MATTICK et al., 2023) (RANSOHOFF; WEI; KHAVARI, 2018).

Dentre as funções já descritas, estão o controle da expressão de genes próximos, alterações da cromatina - impactando na replicação do DNA ou na resposta ao dano e reparo do DNA, - regulação de RNAs mensageiros (mRNA) - impactando *splicing* - e a tradução, entre outras. Além disso, os lncRNAs também vêm sendo apontados como potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos (STATELLO et al., 2021).

Muitos lncRNAs têm sido funcionalmente associados a doenças humanas, em particular o câncer (GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012). A participação de lncRNAs na fisiopatologia de diversos tipos de câncer já foi relatada, incluindo glioblastoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de fígado e leucemias (FANG; FULLWOOD, 2016).

A desregulação na expressão de lncRNAs parece impactar importantes processos celulares durante a tumorigênese, desencadeando aumento da proliferação, resistência à apoptose, indução de angiogênese, promoção de metástases e evasão à repressores tumorais (BRUNNER et al., 2012; GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012).

1.2.1. PVT1

O *PVT1* (*Plasmacytoma Variant Translocation 1*) é um RNA longo não-codificante intergênico (lincRNA) e oncogênico (COLOMBO et al., 2015) que está superexpresso em diferentes tecidos tumorais, como próstata, bexiga, mama e pâncreas (DERDERIAN et al., 2019; HE et al., 2018; XIAO et al., 2018).

O grande interesse no estudo desse lincRNA se dá pelas diversas e complexas interações dele com outras moléculas, a proximidade com o oncogene *MYC* - ambos localizados no cromossomo 8 (ARUNKUMAR et al., 2022) - e sua regulação positiva em diferentes tipos de câncer (DERDERIAN et al., 2019). Além disso, estudos com amostras clínicas de pacientes demonstraram que o aumento da expressão de *PVT1* está correlacionado com redução na sobrevida livre de doença no câncer de próstata (XIAO et al., 2018; YANG et al., 2017), e com resistência a quimioterápicos em câncer de mama triplo negativo, colorretal, pâncreas, pulmão, entre outros (JASIM et al., 2024).

Nosso grupo demonstrou recentemente que o *PVT1* age junto com o receptor de andrógeno promovendo uma reprogramação gênica *genome-wide* em células de PCa, suprimindo a expressão de uma centena de genes supressores de tumor e promovendo a expressão de outras centenas de oncogenes (VIDEIRA et al., 2021).

Dessa forma, decidimos estudar quais os impactos do lincRNA *PVT1* nos processos celulares de PCa, incluindo proliferação, apoptose e invasão. Os achados fornecidos poderão auxiliar na descrição do *PVT1* como um novo potencial alvo farmacológico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar a caracterização funcional do lincRNA *PVT1* em linhagem celular de câncer de próstata (LNCaP), por meio do silenciamento gênico desse lincRNA e subsequente análise dos mecanismos celulares que podem ser potencialmente afetados.

2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar a linhagem celular andrógeno dependente LNCaP para otimizar e confirmar o *knockdown* do *PVT1* utilizando o sistema CRISPR-Cas13d, ainda pouco descrito e não utilizado na literatura para a promoção do *knockdown* deste gene;
- Avaliar nas células que sofreram o *knockdown* do *PVT1* em comparação com as células controle-negativo:
 - A taxa de proliferação, através de ensaios com contagem e exclusão por trypan-blue;
 - A taxa de invasão das células, por meio de ensaios de invasão com a utilização de *fluoroblok inserts*;
 - O processo de apoptose por western blot para a detecção da expressão proteica de caspases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares e métodos de cultivo

As células andrógeno-dependentes LNCaP (ATCC CRL-1740™) foram cultivadas em meio RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific – EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific – EUA), 4,5 g/L de glucose, 1,5 g/L de carbonato de hidrogênio sódico, 2,4 g/L de HEPES, 1% de piruvato de sódio e solução de penicilina (100 U/ml) /estreptomicina (100 U/ml) (Gibco, Thermo Fisher Scientific – EUA).

A linhagem foi cultivada em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C e as manipulações foram realizadas em ambiente estéril. Os cultivos foram mantidos em frascos de cultura de 75 cm² (Corning, EUA) até que uma confluência de 70% a 100% fosse atingida, quando então as células foram tripsinizadas com solução de tripsina-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific – EUA) e repicadas em um novo frasco em uma razão que variou de 1:2 a 1:4, em média a cada 2 ou 3 dias.

3.2 Knockdown do PVT1

Para promover o silenciamento (*knockdown*) do lincRNA *PVT1*, foi utilizado o sistema CRISPR-Cas13d, um complexo de alta performance desenvolvido para a promoção de *knockdown* em nível pós transcricional. O mecanismo ocorre por meio da interferência em transcritos endógenos de RNA, com a atividade RNase efetora sendo desencadeada por uma endonuclease do tipo Cas (Cas13d), dirigida ao alvo por meio de um RNA guia (sgRNA) com correspondência a um RNA alvo complementar (KONERMANN et al., 2018).

No presente estudo, o sistema CRISPR-Cas13d foi transduzido para as células de interesse por meio de plasmídeos lentivirais, de forma a permitir a inserção estável do material genético no genoma de células hospedeiras, com a expressão de Cas13d sendo controlada pela adição de doxiciclina ao meio de cultura (WESSELS et al., 2020).

Foi utilizado o plasmídeo pLentiRNACRISPR (Addgene #138149) para expressão de Cas13d e o pLentiRNAGuide (Addgene #138151) para expressão

dos sgRNAs, o qual já havia sido previamente clonado no laboratório com diferentes sequências de sgRNA que alvejam o lincRNA *PVT1*. Para produção das partículas virais, além dos plasmídeos do sistema CRISPR-Cas13d, foram utilizados os plasmídeos pMD2.G (Addgene #12259), que expressa as proteínas do envelope viral, e psPAX2 (Addgene #12260) como plasmídeo empacotador.

A produção do sobrenadante lentiviral foi realizada previamente no laboratório. Brevemente: o coquetel contendo pMD2.G, psPAX2 e o vetor para a produção da Cas13d ou do sgRNA foi transfectado em células da linhagem 293T (ATCC® CRL-3216), com a utilização de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Após 48h da entrega do coquetel de transfecção às células, o sobrenadante viral, no qual se concentram as partículas lentivirais formadas, foi recolhido e filtrado em filtros de 0,45µm para remoção de qualquer célula e *debris* celular.

O sobrenadante viral foi então entregue à linhagem celular objeto de estudo, LNCaP (ATCC® CRL-1740), para transdução do material genético viral contendo toda a maquinaria para expressão do sistema CRISPR-Cas13d no genoma celular e consequente *knockdown* do *PVT1*. As células foram transduzidas com partículas lentivirais contendo a maquinaria para a expressão de Cas13d em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,006. Após a devida seleção com a droga Blasticidina (10 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific – EUA), elas foram transduzidas com as partículas lentivirais contendo a maquinaria para a expressão dos sgRNAs em uma MOI de 15. Em seguida, foram selecionadas com a droga Puomicina (1 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific – EUA).

Duas sequências de sgRNAs, previamente clonadas e selecionadas como boas produtoras de *knockdown* do *PVT1*, denominadas sg 13.4 e sg 17.10, foram utilizadas nos ensaios funcionais. Além disso, uma sequência que não apresenta complementariedade com nenhuma região do genoma humano foi utilizada como controle, denominada CTRL. A expressão de Cas13d é dependente da indução pela droga Doxiciclina. Portanto, para promover expressão de Cas13d e, consequentemente, o *knockdown* de *PVT1*, doxiciclina foi adicionada ao meio de cultura a uma concentração final de 2 µg/mL por 96h, com reposição de dose às 48h.

3.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR

O RNA total foi extraído de aproximadamente 10^5 a 10^6 células, utilizando-se o RNeasy Mini-Kit (Qiagen, EUA) segundo as instruções do fabricante. Para síntese de cDNA, 250 ng a 1 μ g do RNA total foram utilizados em 20 μ L de reações de transcrição reversa (RT) com o *SuperScript IV First Strand Synthesis System* (Invitrogen, EUA) e primers random hexamer (Invitrogen, EUA). Ciclos de 23°C – 10 min, 50°C – 10 min, 80°C – 10 min foram aplicados.

As reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas para checar a eficiência do *knockdown* de *PVT1*. Foram usados primers específicos para o *PVT1* ou para os genes endógenos *GAPDH* e *ACTB* e 2,5 μ L de cDNA diluído 1:4. As reações foram feitas em 10 μ L finais de SYBR Green I Master Mix (Roche) no equipamento LightCycler 480 II (Roche), em três replicatas técnicas por amostra.

Tabela 1. Sequência dos primers que foram utilizados nas reações de qPCR

Primer		Sequência 5'-3'
ACTB	Forward	CTTCCTTCCTGGGCATGG
	Reverse	AGACAGCACTGTGTTGGCGTA
GAPDH	Forward	CTCTCTGCTCCTCCTGTTCTGA
	Reverse	ACGACCAAATCCGTTGACTCC
PVT1	Forward	TGGAATGTAAGACCCCGACTCT
	Reverse	GATGGCTGTATGTGCCAAGGT

3.4 Ensaios de Proliferação celular

Foram plaqueadas $3,5 \times 10^5$ células (LNCaP controle ou *knockdown*) por poço em placas de 6 poços, com 1,5 mL de meio por poço. Após 48 horas (dia zero), a proliferação foi avaliada pelo Teste de Exclusão por Trypan Blue, assim como nos 5 dias subsequentes, com intervalo de 24 horas entre eles. Em cada dia, um poço por amostra foi tripsinizado, as células foram coradas com *Trypan Blue Stain* 0,4% na proporção 1:1 e contadas em contador de células automático

(Countess™ II FL, Thermo Fisher Scientific).

Foram realizadas seis diferentes contagens de cada condição (controle ou *knockdown*) para garantir a acurácia do teste. Parte da amostra do último dia (dia 5) foi recolhida para extração de RNA e checagem do *knockdown*. As medidas das contagens geradas, nas quais se considerou somente as células viáveis (vivas), foram normalizadas por meio da divisão entre a contagem da amostra em determinado dia pela contagem da respectiva amostra no dia zero. Três réplicas biológicas foram realizadas.

3.5 Western Blot

As amostras (controle ou *knockdown*) foram incubadas *overnight* com DMSO (controle) ou 1 µg/mL de Estaurosporina para indução de apoptose. As células foram recolhidas em tampão de lise RIPA contendo Inibidor de Protease (*Protease Inhibitor Cocktail* – PIC, cOmplete™ Mini, Roche). A concentração proteica dos lisados celulares obtidos foi medida com o *Micro® BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, 50 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15% e separados em eletroforese SDS-PAGE. Após a finalização da corrida eletroforética, o conteúdo do gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose ou PVDF. Ao término da transferência, as membranas foram lavadas uma vez com tampão TBS-T, seguido de bloqueio em solução com 5% BSA por 3h em temperatura ambiente, com agitação.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-tubulina (controle endógeno), na proporção 1:1.000 (Cell Signaling #2146S) ou anti caspase-3 (Cell Signaling #9662), na proporção 1:500. Ao término da incubação, a membrana foi lavada três vezes por 10 min com TBS-T e incubada com o anticorpo secundário *anti-rabbit IgG-Peroxidase* na razão 1:10.000 (Sigma A6154) por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com ECL™ *Prime Western Blotting System* (Amersham, Cytiva) e foi realizada a imunodeteção por quimioluminescência.

3.6 Ensaio de Invasão Celular

O potencial de invasão das células cuja expressão do *PVT1* foi silenciada e das células controle foi avaliado por ensaios *transwell*, com a utilização de 24-well *Fluoroblok transwell inserts* (Becton Dickinson, poros de 8 μ m) revestidos de Geltrex (Gibco, Thermo Fisher Scientific) diluído na proporção 1:50 em tampão de revestimento (0.01M Tris-HCl pH 8, 0.7% NaCl).

Trezentos microlitros do revestimento de Geltrex foram aplicados por inserto, em duplicata técnica por amostra, seguido de incubação a 37°C por pelo menos 3h. Ao final da incubação, as células ($1,7 \times 10^5$) foram ressuspensas em 300 μ L de meio sem soro fetal bovino e dispensadas sobre o revestimento de Geltrex, enquanto na câmara inferior (espaço entre o fundo do poço e o fundo do inserto) foram adicionados 700 μ L de meio com 20% de soro fetal bovino. Além disso, $1,7 \times 10^5$ células de cada condição foram plaqueadas em triplicata técnica diretamente em outros poços da placa, para controle do plaqueamento (*input*).

Após 48h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células dos insertos foram coradas com calceína à 1 μ g/mL e então foram capturadas 19 imagens em posições pré-selecionadas (**Figura 1**) por microscópio de fluorescência. As células do input foram fixadas com metanol 100%, coradas com solução de 0,1% de Cristal Violeta (em 10% metanol) e lavadas 3 vezes com água. Após devida secagem a temperatura ambiente, o corante foi eluído com ácido acético 15% e a absorbância de cada poço foi medida (em triplicata) em leitor de placas a 595 nm (Molecular Devices SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader, USA).

As imagens obtidas com o microscópio de fluorescência foram analisadas no software ImageJ, para contagem automática do número de células. Os valores obtidos foram plotados na forma de gráficos, sempre se comparando células controle *versus knockdown*. Os valores foram normalizados por meio da divisão do número de células contadas em cada inserto pelo valor da absorbância média do *input* em cada amostra.



Figura 1: Esquema representativo de regiões que foram fotografadas (estrelas) em cada poço (círculo preto).

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram plotados na forma de gráficos através do software GraphPad Prism 8. A diferença entre os grupos analisados - controle *versus knockdown* - foi analisada aplicando-se o teste estatístico U de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de Proliferação celular

O trypan blue é um corante carregado negativamente que não penetra nas células a menos que a membrana plasmática esteja danificada. Desse modo, as células que excluem o corante são consideradas viáveis. O teste de proliferação celular com o trypan blue leva em conta a contagem de células coradas (mortas) e não coradas (vivas) (TRAN et al., 2011). Dessa forma, é possível aferir a proliferação celular ao longo do tempo.

No experimento realizado, a contagem normalizada de células viáveis está indicada no eixo y *versus* o tempo no eixo x. É possível perceber que há uma tendência maior de proliferação da amostra controle (CTRL) *versus* as amostras *knockdown* (KD - sg 13.4 e sg 17.10). Os resultados sugerem uma correlação entre o nível de *knockdown* e a taxa de proliferação, isso é, quanto menor a expressão do *PVT1*, menor é o nível de proliferação (**Figura 2A e 2B**).

No dia 5, último dia do experimento, parte das células foi recolhida para verificação do *knockdown* de *PVT1* por meio de RT-qPCR. É possível observar redução estatisticamente significativa na expressão de *PVT1* nas células KD (sg 13.4 e 17.10) em comparação com as células CTRL (**Figura 2B**). Entretanto, a redução na expressão de *PVT1* nas células KD sg 17.10 não foi tão pronunciada, em comparação com as células KD sg 13.4, o que poderia explicar a maior proliferação dessas células e a não significância estatística dos dados na comparação da curva de proliferação de sg17.10 com o controle (**Figura 2A**).

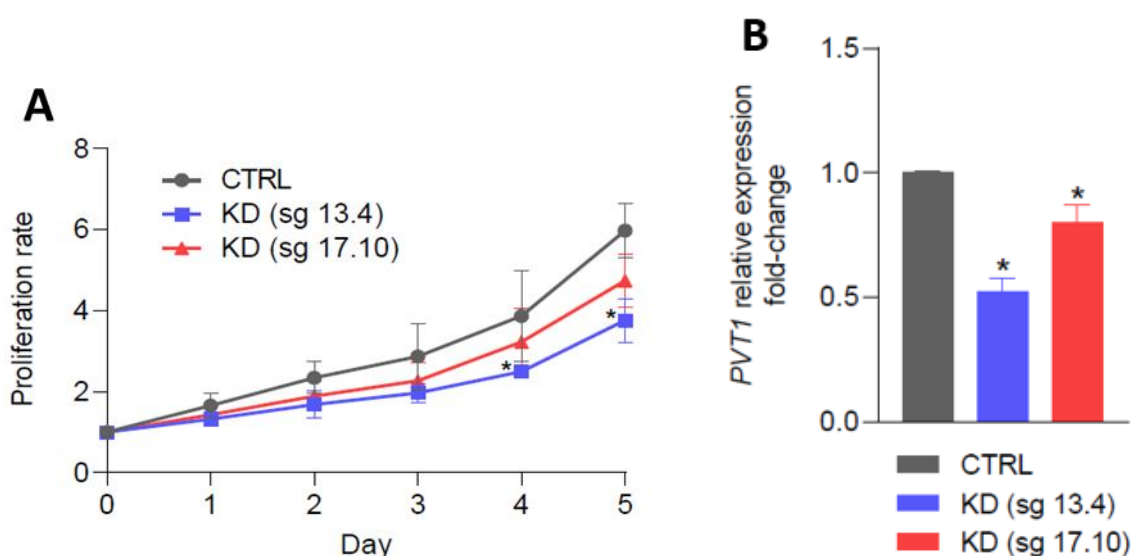


Figura 2. Proliferação das células LNCaP após o *knockdown* do *PVT1*. (A) Curvas de proliferação de acordo com a contagem do número de células viáveis. Os dados foram normalizados pela contagem das células viáveis no dia zero. Pontos e barras de erros são representativos da média $\pm$ desvio padrão. (B) Expressão relativa do *PVT1* em células LNCaP CTRL e KD (sg 13.4 ou sg 17.10). As barras e barras de erro são representativas da média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizada pelo teste Mann-Whitney. Os gráficos são representativos de replicatas biológicas (n = 3); * = p < 0,05.

4.2. Western Blot

As caspases são as efetoras principais da via de apoptose. A Caspase-3 inativa (pró-caspase-3) é processada por clivagem auto proteolítica ou clivagem por outras proteases dando origem à forma ativa da enzima (PORTER; JÄNICKE, 1999).

Conforme apresentado na Figura 3, que demonstra a revelação das amostras transferidas para membrana de nitrocelulose, as bandas referentes à expressão de β -tubulina apresentaram o tamanho esperado de 55 kDa e estão homogêneas entre as amostras. Já com relação as bandas da pró-caspase-3 (35 kDa), é possível perceber uma diminuição de expressão na amostra KD (sg 13.4) + ESTAURO em comparação com todas as outras amostras. As bandas referentes à caspase-3 clivada não foram detectadas (**Figura 3**).

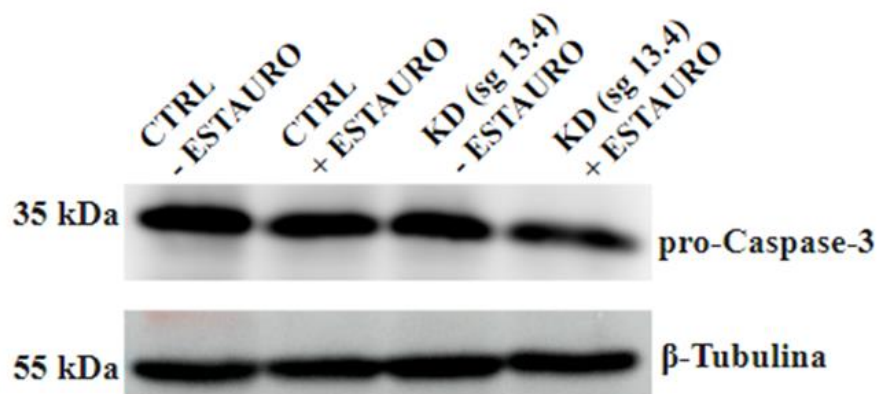


Figura 3. Expressão de pro-caspase-3 em membrana de nitrocelulose. Detecção da expressão de β -tubulina (55kDa) e pró-caspase-3 (35 kDa) nas amostras LNCaP CTRL e KD (sg 13.4) após o tratamento com estaurosporina (ESTAURO).

Um novo experimento de western blot foi realizado com as mesmas amostras, mas dessa vez em membrana de PVDF, visto que esta possui uma força de retenção maior, e consequentemente, mais afinidade com proteínas (GOLDMAN; HARPER; SPEICHER, 2016). A expressão da proteína controle β -tubulina (55 kDa) foi novamente homogênea entre as amostras. A pro-caspase-3 (35 kDa) demonstrou o mesmo padrão observado anteriormente, com diminuição de expressão na amostra KD (sg 13.4) + ESTAURO em comparação à todas as outras amostras. As bandas da caspase-3 clivada (17 kDa) foram detectadas, com maior expressão nas amostras ESTAURO em relação às amostras CTRL. Na amostra KD (sg13.4) + ESTAURO, no entanto, esse aumento foi mais evidente (**Figura 4**).

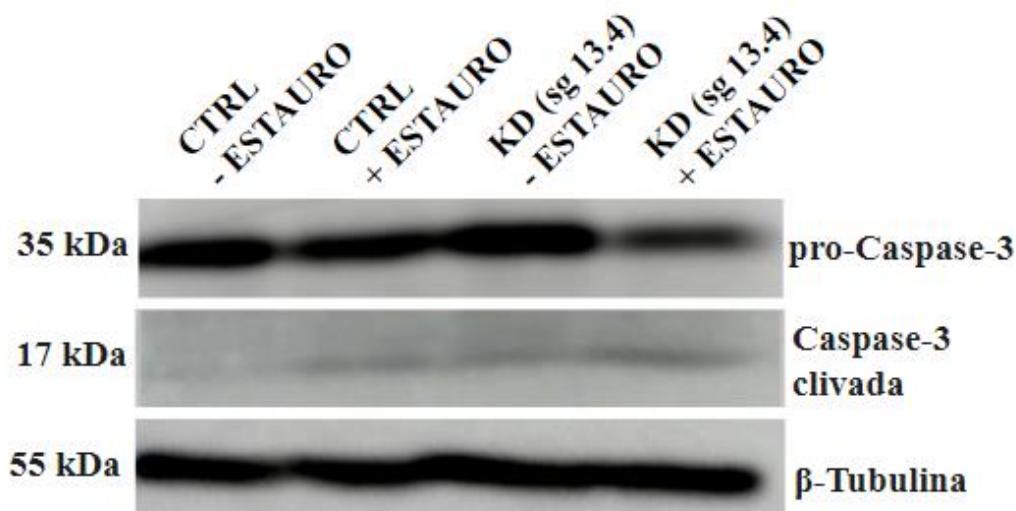


Figura 4. Expressão de pro-caspase-3 e caspase-3 clivada em membrana de PVDF. Detecção da expressão de β -tubulina (55kDa), pró-caspase-3 (35 kDa) e caspase-3 clivada (17 kDa) nas amostras LNCaP CTRL e KD (sg 13.4) após o tratamento com estaurosporina (+ESTAURO).

Os resultados mostram que sob tratamento com estaurosporina, as células *knockdown* (KD sg 13.4 + ESTAURO) apresentam menores níveis de pró-caspase-3 e mais caspase-3 clivada que as células *knockdown* sem tratamento (KD sg 13.4 - ESTAURO). As células *knockdown* tratadas (KD sg 13.4 + ESTAURO) também apresentam menos pró-caspase-3 e mais caspase-3 clivada que as células controle tratadas (CTRL + ESTAURO). No entanto, os resultados são mais pronunciados nas amostras que tem a expressão de *PVT1* silenciada em comparação as amostras CTRL. Esses resultados indicam que o *knockdown* de *PVT1* parece tornar as células de PCa mais suscetíveis à apoptose.

Além disso, nas amostras sem o estímulo pró-apoptótico da estaurosporina, a expressão da caspase-3 clivada foi maior nas células *knockdown* (KD sg13.4 - ESTAURO) em comparação com as células controle (CTRL - ESTAURO), indicando que o *knockdown* de *PVT1* por si só, mesmo na ausência de um estímulo pró-apoptótico, parece causar alguma ativação da via de apoptose nas células LNCaP.

O *knockdown* de *PVT1* foi avaliado nas amostras por meio de RT-qPCR. É possível se observar redução na expressão de *PVT1* em todas as amostras KD (sg 13.4), sobretudo no tratamento com estaurosporina (**Figura 5**).

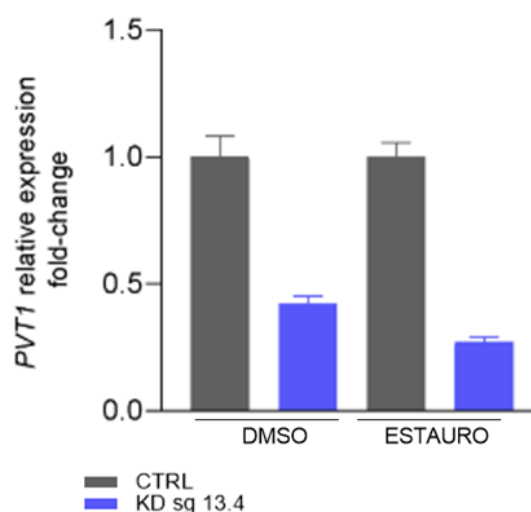


Figura 5. Expressão relativa do *PVT1* nas amostras tratadas com estaurosporina. Cada coluna se refere à média de três replicatas técnicas.

4.3. Teste de invasão celular

O ensaio de migração e invasão celular avalia o potencial metastático da célula pela migração da célula em câmaras separadas por meio de uma membrana porosa (KRAMER et al., 2013).

Foram realizados testes com diferentes tempos para avaliar a invasão das células da linhagem LNCaP e, por fim, optou-se por utilizar o tempo de 48 horas. Além disso, foram selecionados 19 campos a serem fotografados para garantir que todo o poço seria analisado, evitando-se analisar regiões com maiores concentrações de células de maneira tendenciosa e, assim, diminuir a exatidão do teste.

Os resultados mostram que não houve diferença na invasão do poço inferior entre as células *knockdown* (sg 13.4 e sg 17.10) e as células controle (CTRL) (Figura 6).

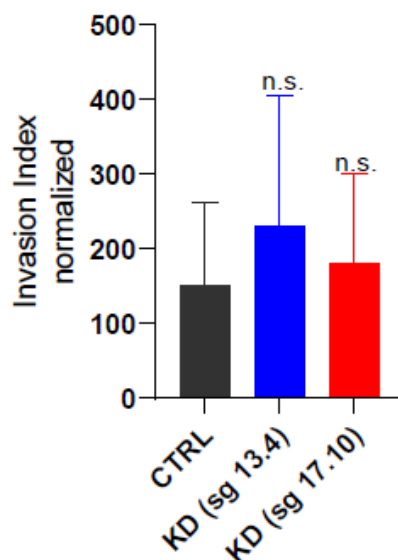


Figura 6: Invasão das células LNCaP após o *knockdown* de *PVT1*. Os dados foram normalizados pela absorbância média do input (células plaqueadas e coradas com cristal violeta). Barras e barras de erro são representativas da média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste Mann-Whitney. As barras são representativas de replicatas biológicas ($n = 3$); n.s. = não significativo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Câncer de próstata e *PVT1*

Sabe-se que células LNCaP possuem o AR significativamente associado com mais de 600 lncRNAs, inclusive com o lncRNA *PVT1* (DASILVA et al., 2018), cuja atuação como esponja de miRNAs no citoplasma (DERDERIAN et al., 2019), ação na metilação de genes específicos (LIU et al., 2016), bem como atuação em outros mecanismos oncogênicos já foram demonstradas.

Videira et al. (2021) mostraram que nas células LNCaP, o *PVT1* se associa tanto ao AR, quanto ao EZH2, um dos componentes do complexo PRC2. O *knockdown* de *PVT1* promoveu um aumento da expressão de genes que são reprimidos por andrógenos, incluindo um conjunto de genes supressores de tumor (VIDEIRA et al., 2021). Esses resultados indicam que o *PVT1* está envolvido em uma regulação transcricional a nível *genome-wide* e justifica o interesse de nosso grupo em continuar estudando os efeitos desse lncRNA no PCa.

5.2. Teste de proliferação celular

O teste de proliferação com trypan blue leva em conta a diferenciação entre células viáveis (vivas) e mortas. Desse modo, as células vivas possuem membranas celulares intactas que não permitem a internalização do corante, enquanto as células mortas permitem e são, portanto, coradas (STROBER, 1997). Esse teste se mostrou eficiente para a linhagem LNCaP pois, embora essa linhagem seja aderente, as células se soltam facilmente da superfície do frasco de cultura, o que torna a utilização de outras metodologias para o teste de proliferação inviáveis, como por exemplo a fixação e coloração seguida de medida de absorbância. A utilização da metodologia de contagem pelo trypan blue se demonstrou ideal para a linhagem LNCaP, conferindo maior confiabilidade na quantidade de células analisadas e, conseqüentemente, no resultado final do experimento.

Sendo o *PVT1* um oncogene, seria esperado uma redução na proliferação celular das células com *knockdown* desse gene, como já foi demonstrado em diversos tipos de câncer (ONAGORUWA et al., 2020), bem como no próprio câncer de próstata *in vitro* (LIU et al., 2016) e *in vivo* (ZHU; DU; GU, 2020), onde o silenciamento de *PVT1* foi obtido com outra técnica, usando siRNA.

Nesse sentido, os nossos dados de silenciamento de *PVT1* com CRISPR-Cas13d corroboram os da literatura, pois indicam essa redução de proliferação nas células que sofreram o *knockdown* de *PVT1*. É possível observar também uma relação entre taxa de expressão de *PVT1* e taxa de proliferação: quanto maior o *knockdown* produzido e, portanto, menor a expressão de *PVT1*, menor é a proliferação celular.

5.3. Detecção da apoptose

As caspases se encontram na forma de proenzimas inativas, sendo ativadas pela clivagem proteolítica em um resíduo de aspartato após receberem um sinal de apoptose. Algumas caspases são iniciadoras da morte celular e, após sua ativação, elas ativam as caspases executoras, como a caspase-3 (pro-caspase-3, 35 kDa), que se converte em caspase-3 ativada (19 kDa e 17 kDa) e que irá

efetuar o processo de apoptose pela clivagem de substratos celulares essenciais para a sobrevivência (BELMOKHTAR; HILLION; SÉGAL-BENDIRDJIAN, 2001).

A estaurosporina é um alcaloide microbiano e um potente inibidor da proteína-quinase C (TAMAOKI et al., 1986). Essa molécula já foi descrita como uma estimuladora da via de apoptose em diversas linhagens celulares. Embora o mecanismo exato não seja totalmente esclarecido, ele parece estar relacionado com a via de apoptose mitocondrial com envolvimento das caspases (ZHANG; GILLESPIE; HERSEY, 2004).

Nesse sentido, a maior detecção de caspase-3 clivada na amostra *knockdown* tratada com estaurosporina indica que o silenciamento de *PVT1* promove um aumento de sensibilidade das células à apoptose. Além disso, nas amostras sem o estímulo pro-apoptótico, a detecção da caspase-3 clivada foi maior nas células *knockdown* em comparação com as células controle, indicando que o *knockdown* de *PVT1* por si só, mesmo na ausência de um estímulo pró-apoptótico, parece causar alguma ativação da via de apoptose nas células de PCa LNCaP.

Tais resultados são semelhantes a relatos da literatura que demonstram que o silenciamento do *PVT1* levou a uma regulação positiva de caspase-3 clivada em câncer de próstata *in vitro* (YANG et al., 2017) e aumento da atividade da caspase-3 em câncer de bexiga *in vitro* (ZHOU et al., 2015). Além disso, a superexpressão do *PVT1* regulou negativamente a apoptose em linhagem celular de câncer gástrico (ZHANG et al., 2015) e câncer de ovário (LIU et al., 2015).

Embora tenha sido possível detectar a expressão de caspase-3 íntegra e clivada no experimento realizado com a membrana de PVDF, a expressão da forma clivada poderia ficar mais evidente aumentando-se a quantidade total de proteína aplicada e/ou aumentando-se o gradiente de concentração do gel, de forma a reter proteínas de menor tamanho (O'DONOVAN et al., 2003), como os fragmentos da caspase-3 de 19 kDa e 17 kDa. Poderia, ainda, se utilizar um anticorpo específico para a detecção da caspase-3 na forma clivada, uma vez que o anticorpo utilizado nos experimentos foi mais sensível para a pro-caspase.

5.4. Teste de migração e invasão celular

Nos ensaios de migração e invasão celular, as células são analisadas por um processo *in vitro* que mimetiza a ação *in vivo* do processo fisiopatológico de metástase. Para isso, duas câmaras são separadas por um gel e um quimioatrativo (por exemplo, o soro fetal bovino) é adicionado na câmara inferior. Essa mimetização é válida pois um tumor invasivo precisa degradar a matriz extracelular para se desprender do local de origem e metastatizar. A invasão do teste é quantificada pela contagem das células que atravessaram a membrana permeável em direção ao quimioatraente (MARSHALL, 2011).

Uma vez que o *PVT1* é um oncogene, esperava-se que o *knockdown* dessa molécula promoveria redução na taxa de invasão celular em relação às células controle. No entanto, o resultado encontrado não aponta diferença na invasão das células *knockdown* em relação às células controle.

O processo de metástase é complexo e envolve diversos fatores, vias e genes, envolvendo processos como angiogênese, falta de adesão ao sítio primário, invasão, entre outros, sendo considerado fenotipicamente heterogêneo (BRODLAND; ZITELLI, 1992).

Além disso, a linhagem celular LNCaP possui uma baixa taxa de invasão e é considerada minimamente invasiva, quando comparada com outras linhagens de próstata, como a PC-3, por exemplo. Parte desse comportamento se deve ao fato da LNCaP possuir expressão da molécula de adesão E-caderina, responsável por manter a união das células, enquanto a PC-3 não possui (KIM; WIRTZ, 2011).

Nesse sentido, uma investigação mais profunda em relação a genes e/ou vias afetados pelo *knockdown* do *PVT1* poderia explicar os resultados encontrados. Soma-se a isso a possibilidade de estudar linhagens celulares de câncer de próstata que são consideradas mais invasivas como a PC-3 e DU-145 (HOLLAS et al., 1992).

6. CONCLUSÃO

O *knockdown* do lncRNA *PVT1* estabelecido pela metodologia de CRISPR-Cas13d se mostrou eficiente para os processos que foram analisados e é uma metodologia nova na literatura para esse gene e linhagem celular.

Os resultados de proliferação celular e apoptose confirmam dados da literatura, demonstrando que o *PVT1* é um oncogene. Os resultados de invasão celular, por outro lado, demonstraram as dificuldades desse tipo de teste com a linhagem LNCaP e não apontam para uma tendência de menor invasão após o *knockdown* de *PVT1*, como era de se esperar para um oncogene. Novos caminhos necessitam ser explorados, como por exemplo a análise das mudanças nos níveis de expressão de diferentes genes envolvidos no processo de metástase.

Os achados aqui demonstrados poderão auxiliar na descrição de um novo potencial alvo farmacológico para o PCa e fortalecem a utilização já empregada do *PVT1* como biomarcador e como indicador de mau prognóstico do câncer de próstata.

7. REFERÊNCIAS

ARUNKUMAR, G. et al. Oncogenic lncRNAs alter epigenetic memory at a fragile chromosomal site in human cancer cells. **Science Advances**, v. 8, n. 9, p. eabl5621, 4 mar. 2022.

BELMOKHTAR, C. A.; HILLION, J.; SÉGAL-BENDIRDJIAN, E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Oncogene**, v. 20, n. 26, p. 3354–3362, 7 jun. 2001.

BRODLAND, D. G.; ZITELLI, J. A. Mechanisms of metastasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 1–8, jul. 1992.

BRUNNER, A. L. et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. **Genome Biology**, v. 13, n. 8, p. R75, 2012.

COLOMBO, T. et al. PVT1: A Rising Star among Oncogenic Long Noncoding RNAs. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

DASILVA, L. F. et al. Chromatin Landscape Distinguishes the Genomic Loci of Hundreds of Androgen-Receptor-Associated lncRNAs From the Loci of Non-associated lncRNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 132, 25 abr. 2018.

DERDERIAN, C. et al. PVT1 Signaling Is a Mediator of Cancer Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 502, 12 jun. 2019.

DERRIEN, T. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1775–1789, set. 2012.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861–874, dez. 2011.

FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 42–54, fev. 2016.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 34–45, out. 2001.

GANDAGLIA, G. et al. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. **European Urology Oncology**, v. 4, n. 6, p. 877–892, dez. 2021.

GOLDMAN, A.; HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Detection of Proteins on Blot Membranes. **Current Protocols in Protein Science**, v. 86, n. 1, nov. 2016.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICH, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 703–719, jun. 2012.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HE, R. et al. Prognostic Significance of LncRNA PVT1 and Its Potential Target Gene Network in Human Cancers: a Comprehensive Inquiry Based Upon 21 Cancer Types and 9972 Cases. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 591–608, 2018.

HEEMERS, H. V.; TINDALL, D. J. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 7, p. 778–808, 1 dez. 2007.

HOLLAS, W. et al. Expression of urokinase and its receptor in invasive and non-invasive prostate cancer cell lines. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 68, n. 6, p. 662–666, 7 dez. 1992.

HUANG, Y. et al. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). **Oncology Letters**, 27 fev. 2018.

JASIM, S. A. et al. Long non-coding RNA (lncRNA) PVT1 in drug resistance of cancers: Focus on pathological mechanisms. **Pathology - Research and Practice**, v. 254, p. 155119, fev. 2024.

KIM, D.-H.; WIRTZ, D. Recapitulating cancer cell invasion in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, p. 6693–6694, 26 abr. 2011.

KONERMANN, S. et al. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. **Cell**, v. 173, n. 3, p. 665- 676.e14, abr. 2018.

KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10–24, jan. 2013.

LITWIN, M. S.; TAN, H.-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. **JAMA**, v. 317, n. 24, p. 2532, 27 jun. 2017.

LIU, E. et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 11, p. 20565–20572, 2015.

LIU, H. et al. LncRNA PVT1 regulates prostate cancer cell growth by inducing the methylation of miR-146a. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 12, p. 3512–3519, dez. 2016.

MARSHALL, J. Transwell® Invasion Assays. Em: WELLS, C. M.; PARSONS, M. (Eds.). **Cell Migration**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 769p. 97–110.

MATTICK, J. S. et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 6, p. 430–447, jun. 2023.

O'DONOVAN, N. et al. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 738–742, fev. 2003.

ONAGORUWA, O. T. et al. Oncogenic Role of PVT1 and Therapeutic Implications. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 17, 4 fev. 2020.

PATEL, A. R.; KLEIN, E. A. Risk factors for prostate cancer. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 6, n. 2, p. 87–95, fev. 2009.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99–104, fev. 1999.

RANSOHOFF, J. D.; WEI, Y.; KHAVARI, P. A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 143–157, mar. 2018.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019.

SEKHOACHA, M. et al. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5730, 5 set. 2022.

STATELLO, L. et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 96–118, fev. 2021.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 1, mar. 1997.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

TAMAOKI, T. et al. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa⁺⁺-dependent protein kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 135, n. 2, p. 397–402, mar. 1986.

TRAN, S.-L. et al. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e22876, 6 set. 2011.

VIDEIRA, A. et al. PVT1 signals an androgen-dependent transcriptional repression program in prostate cancer cells and a set of the repressed genes predicts high-risk tumors. **Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, p. 5, dez. 2021.

WESSELS, H.-H. et al. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide RNA design. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 722–727, jun. 2020.

XIAO, M. et al. Prognostic values of long noncoding RNA PVT1 in various carcinomas: An updated systematic review and meta-analysis. **Cell Proliferation**, v. 51, n. 6, p. e12519, dez. 2018.

YANG, J. et al. LncRNA PVT1 predicts prognosis and regulates tumor growth in prostate cancer. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 12, p. 2301–2306, dez. 2017a.

ZHANG, X. et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, n. 3, p. 227–232, jul. 2015.

ZHANG, X. D.; GILLESPIE, S. K.; HERSEY, P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 187–197, fev. 2004.

ZHOU, W.-J. et al. Angelica sinensis polysaccharides promotes apoptosis in human breast cancer cells via CREB-regulated caspase-3 activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 3, p. 562–569, nov. 2015.

ZHU, X.; DU, J.; GU, Z. Circ-PVT1/miR-106a-5p/HK2 axis regulates cell growth, metastasis and glycolytic metabolism of oral squamous cell carcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 474, n. 1–2, p. 147–158, nov. 2020.

15/05/2024 Gabriel Nakomishi Fortes

Data e assinatura do aluno

15/05/2024 Maria Gabriela B. Coelho

Data e assinatura da orientadora