



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Karen Cristina Cordeiro dos Santos

Caracterização funcional do miR-200c-3p e miR-144-3p e validação de alvos moleculares em linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo

FLORIANÓPOLIS

2024

Karen Cristina Cordeiro dos Santos

**Caracterização funcional do miR-200c-3p e miR-144-3p e validação de alvos
moleculares em linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra

dos Santos, Karen Cristina Cordeiro
Caracterização funcional do miR-200c-3p e miR-144-3p e validação de alvos moleculares em linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo / Karen Cristina Cordeiro dos Santos ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, 2024.

131 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. câncer de mama triplo-negativo. 3. miR-200c-3p.miR-144-3p. 5. morte celular. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Karen Cristina Cordeiro dos Santos

Caracterização funcional do miR-200c-3p e miR-144-3p e validação de alvos moleculares em linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de agosto de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Lilian Sibelle Campos Bernardes, Dra
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Ionara Rodrigues Siqueira, Dra
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmácia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, Dra
Orientadora

Florianópolis, 2024

Este trabalho é dedicado à minha família: Albani, Fernanda e Nicoly.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, Albani, Fernanda e Nicolý, por toda a força, incentivo e amor. Vocês são tudo para mim. Obrigada por cada conselho, por cada colo nos momentos difíceis e por estarem sempre comigo. Esse trabalho não seria possível sem vocês.

À Professora Tânia B. Creczynski-Pasa, orientadora deste trabalho, por todo o apoio e incentivo. Sua expertise e entusiasmo foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa. Sou eternamente grata pelos ensinamentos que permitiram que o amor pela pesquisa se desenvolvesse em mim também.

Aos meus anjinhos de quatro patas, Bonnie e Esther. Obrigada por tanto amor e companhia.

Aos meus amigos presentes em todas as horas, Ana e Douglas. Vocês são como família para mim. Obrigada por todos os momentos de alegria, apoio e cumplicidade.

Às colegas do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas-GEIMM por todo o apoio e momentos de descontração. Agradeço especialmente à Adny, pelo suporte imprescindível nas etapas iniciais de desenvolvimento desse trabalho, e à Mariana, por todos os cafés repletos de ciência e amizade.

À Maria Vitória Issler e ao professor André Avelino Pasa, que foram responsáveis pela elaboração do modelo matemático que originou esse projeto. Agradeço pela confiança e por todo o apoio fornecido em cada etapa.

Aos colegas e professores dos laboratórios vizinhos que nunca hesitaram em nos ajudar sempre que necessário. Agradeço especialmente à Beatriz, pela disponibilidade com todos os agendamentos do *StepOne*; Lisandra, pela ajuda com o citômetro, e Nicole, por oferecer auxílio com a sua grande experiência na técnica de imunofluorescência.

Às professoras Lilian Bernardes, Ionara Siqueira e Claudriana Locatelli por terem gentilmente aceitado o convite para avaliar este trabalho, e pelas inestimáveis contribuições.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC, pelo apoio técnico e disponibilização de equipamentos.

Às agências de fomento que permitiram o desenvolvimento desse trabalho, FAPESC e CAPES.

À Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de excelência, por todas as oportunidades, e por ter se tornado casa.

A todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada.

“O ponto de partida deve ser “não sei”. O que é uma entrega total”

Clarisse Lispector

RESUMO

Entre todas as formas de câncer, exceto pele não-melanoma, o câncer de mama é o segundo mais incidente em mulheres em nível mundial. O subtipo triplo-negativo (TNBC) da doença, apesar de ser diagnosticado com menor frequência, é conhecido pelo prognóstico desfavorável e escassez de tratamentos eficazes.

Nesse sentido, microRNAs (miRNA) consistem em sequências nucleotídicas endógenas curtas, capazes de modular a expressão gênica em nível pós-transcricional. Essas moléculas fazem parte da regulação de distintos processos celulares, como: crescimento, proliferação, autofagia, apoptose, entre outros; e tem apresentado relevância no desenvolvimento de novas terapias, já havendo estudos que demonstram a aplicação desta abordagem no tratamento de diversas formas de câncer. Com base nesse pretexto, um sistema de modelagem matemático foi previamente elaborado por nosso grupo de pesquisa, visando prever a atividade de moléculas de miRNA com expressão desregulada no TNBC nos processos de apoptose, autofagia e crescimento celular.

Os miRNA miR-200c-3p e miR-144-3p tratam-se de importantes supressores tumorais no microambiente dessa forma de câncer de mama, ambos apresentando-se com expressão reduzida. O modelo matemático mencionado indicou que essas pequenas moléculas de RNA seriam capazes de atuar principalmente a partir de promoção da apoptose.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a validação experimental dos resultados obtidos *in silico* a partir do aumento ou diminuição do conteúdo dos miRNA selecionados, além da otimização da rede regulatório aplicada no modelo. Para este fim, a linhagem proveniente de TNBC, MDA-MB-231, foi submetida ao processo de transfecção de moléculas *mimics* ou inibidores de cada miRNA. Posteriormente, distintos ensaios foram realizados para a determinação de viabilidade e morte celular, além da avaliação de expressão de genes e proteínas sob modulação dos respectivos miRNA.

O aumento da concentração de cada miRNA no microambiente tumoral foi realizado de forma isolada, demonstrando capacidade de indução de apoptose, conforme indicado previamente pelo modelo. Neste contexto, a transfecção do *mimic* do miR-200c-3p promoveu morte celular por apoptose, principalmente a partir do aumento de expressão dos genes *BAX* e *CASP3*, além da redução de expressão dos alvos *AKT3* e *PI3K*, da via de crescimento celular. O miR-144-3p também promoveu essa forma de morte, conforme indicado pela presença de exposição de resíduos fosfatidilserina (PS) e picnose nuclear. Embora o mecanismo exato pelo qual isso ocorreu ainda não tenha sido completamente elucidado, a apoptose parece estar associada à redução de expressão de alvos promotores tumorais como *CFLAR*, *EGFR* e *IRS1*.

Adicionalmente, foi observado um fino balanço na regulação dos miR -200c-3p e -144-3p na linhagem celular MDA-MB-231, em que a redução da expressão desses miRNA, além do observado naturalmente no câncer de mama triplo-negativo, foi capaz de promover morte apoptótica. Nesse caso, a apoptose ocorreu possivelmente por meio de ativação excessiva de componentes da via de crescimento celular, como AKT3 e EGFR, para os inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p, respectivamente.

Em conclusão, os miR-200c-3p e miR-144-3p parecem tratar-se de importantes supressores tumorais no TNBC, sendo o aumento da expressão desses ácidos nucleicos capaz de promover morte celular por apoptose. Ainda, a redução da expressão de ambos os miRNA acima de um certo limiar parece estar relacionada à superativação de respostas oncogênicas que culminam em perda de viabilidade a partir da indução de estresse celular.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo-negativo; miR-200c-3p; miR-144-3p; apoptose; autofagia; crescimento celular; modelagem.

ABSTRACT

Breast cancer, excluding non-melanoma skin cancer, is the second most common cancer among women worldwide. The triple-negative subtype (TNBC) of the disease, although less frequently diagnosed, is known for its poor prognosis and the lack of effective treatments.

In this context, microRNAs (miRNA) are short endogenous nucleotide sequences capable of modulating gene expression at the post-transcriptional level. These molecules are responsible for regulating various cellular processes, such as growth, proliferation, autophagy, apoptosis, among others, and have shown significant relevance in the development of new therapies. Studies have already demonstrated the application of this approach in treating various forms of cancer. Based on this premise, a mathematical modeling system was previously developed by our research group to predict the activity of miRNA with dysregulated expression in TNBC in the processes of apoptosis, autophagy, and cell growth.

MiR-200c-3p and miR-144-3p are tumor-suppressor microRNAs downregulated in TNBC. The aforementioned mathematical model suggested that these small RNAs could primarily function by promoting apoptosis.

In this context, the objective of this study was to experimentally validate the predictions made by the mathematical model regarding the impact of miRNA upregulation or downregulation on apoptosis, autophagy and cellular growth. Additionally, we sought to optimize the regulatory network within the model to enhance its accuracy and predictive power. To experimentally validate the *in silico* findings, the TNBC cell line MDA-MB-231 was transfected with miR-200c-3p and miR-144-3p mimics and inhibitors. Subsequent assays assessed cell viability, cell death, and gene/protein expression modulation by the respective miRNA.

To assess the individual impact of each miRNA, the cellular content of miR-200c-3p and miR-144-3p were independently increased. Consistent with the mathematical model, miR-200c-3p induced apoptosis. According to experimental results, this regulation was primarily via BAX and CASP3 upregulation, simultaneously to the downregulation of cell survival genes as AKT3 and PI3K. MiR-144-3p also promoted apoptosis, as characterized by phosphatidylserine exposure and nuclear pyknosis. This effect was potentially induced by the downregulation of the oncogenes CFLAR, EGFR, and IRS1. However, the precise mechanism underlying miR-144-3p-induced apoptosis requires further investigation.

Additionally, a delicate balance in the regulation of these miRNA was observed in the MDA-MB-231 cell line, where the further reduction in the expression of these miRNA, beyond what is naturally observed in TNBC, was capable of inducing apoptotic cell death. This likely occurred through the excessive activation of components in the cell growth pathway, such as AKT3 and EGFR, for miR-200c-3p and miR-144-3p inhibitors, respectively.

In conclusion, miR-200c-3p and miR-144-3p appear to be significant tumor suppressors in TNBC, and an increase in the concentration of these nucleic acids is capable of inducing apoptotic cell death. Additionally, the reduction in the expression of these miRNAs beyond a certain threshold seems to be associated with the overactivation of oncogenic responses, leading to a loss of cell viability due to an increase in the activation of cellular stress responses.

Keywords: Triple-negative breast cancer; miR-200c-3p; miR-144-3p; apoptosis; autophagy; cell growth; modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação anatômica de mama saudável	25
Figura 2 – Biogênese de autofagossomos.....	31
Figura 3 – Processo canônico de biogênese dos miRNA	34
Figura 4 – Rede regulatória representando as vias de apoptose, autofagia e crescimento celular	36
Figura 5 - Linhagem celular MDA-MB-231	43
Figura 6 - Interações de miR-200c na via de apoptose.....	55
Figura 7 – Interações de miR-144 na via de apoptose.....	56
Figura 8 – Via de apoptose	56
Figura 9 – Interações de miR-200c na via de autofagia	58
Figura 10 – Interações de miR-144-3p na via de autofagia.....	59
Figura 11 – Via de autofagia	59
Figura 12 – Interações de miR-200-3p na via de PI3K/AKT/mTOR.....	61
Figura 13 – Interações de miR-144-3p na via de PI3K/AKT/mTOR.....	62
Figura 14 – Via de PI3K/AKT/mTOR	62
Figura 15 – Rede regulatória atualizada representando componentes das vias de apoptose, autofagia e PI3K/AKT/mTOR.....	63
Figura 16 - Avaliação de citotoxicidade de Lipofectamina® em MDA-MB-231	66
Figura 17 - Eficiência de transfecção da Lipofectamina®	67
Figura 18 – Viabilidade celular após transfecção de <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p.....	68
Figura 19 – Viabilidade celular após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p	69
Figura 20 – Ensaio de anexina V-FITC/ iodeto de propídeo para <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p.....	70
Figura 21 – Ensaio de Anexina V-FITC/ iodeto de propídeo para <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p.....	71
Figura 22 – Conteúdo de miRNA após transfecção com <i>mimics</i> e inibidores	72
Figura 23 – Resultado de RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-200c-3p	73
Figura 24 – Resultado de RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-144-3p	74

Figura 25 – Resultado de imunofluorescência de caspase 3 após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p	75
Figura 26 – Intensidade média de fluorescência de caspase 3 após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p	76
Figura 27 – Resultado de imunofluorescência de LC3B após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p	77
Figura 28 – Intensidade média de fluorescência de LC3B após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p	77
Figura 29 – Resultado de imunofluorescência de caspase 3 após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p	78
Figura 30 – Intensidade média de fluorescência de caspase 3 após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p	79
Figura 31 – Resultado de imunofluorescência de LC3B após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p.....	79
Figura 32 – Intensidade média de fluorescência de LC3B após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p	80
Figura 33 – Análise de alterações nucleares.....	80
Figura 34 – Esquema representativo da atuação do miR-200c em TNBC	85
Figura 35 – Respostas celulares após transfecção com <i>mimic</i> e antagomiR de miR-200c	88
Figura 36 – Esquema representativo da atuação do miR-144 em TNBC.....	91
Figura 37 – Respostas celulares após transfecção com <i>mimic</i> e antagomiR de miR-144.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência de <i>primers</i> específicos	50
Quadro 2 - Genes alvo de miR-200c-3p na via de apoptose	54
Quadro 3 - Genes alvo de miR-144-3p na via de apoptose	55
Quadro 4 - Genes alvo de miR-200c-3p na via de autofagia.....	57
Quadro 5 - Genes alvo de miR-144-3p na via de autofagia	58
Quadro 6 - Genes alvo de miR-200c-3p na via de PI3K/AKT/mTOR	60
Quadro 7 - Target genes of miR-144-3p in the apoptosis pathway.....	61
Quadro 8 – Descrição dos componentes atualizados da rede regulatória	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO2 - Proteína argonauta 2

ADCD - *Autophagy-dependent cell death*

AKT - *AKT serine/threonine kinase*

AntagomiR - molécula inibidora de miRNA

AMBRA1 - *Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1*

AMCD - *Autophagy-mediated cell death*

AMPK - *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ANOVA - Análise de variância

ATGs - *autophagy related*

ATM - *Ataxia telangiectasia mutated*

BAD - *BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*

BAK - *BCL2 antagonist/killer 1*

BAX - BCL2 associated X, apoptosis regulator

BCL2 - *B-cell lymphoma*

BCL-xL -

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

BECN1 - Beclin-1

BID - *BH3 interacting domain death agonist*

BIM - *Bcl-2 Interacting mediator of cell death*

BRCA1 - Breast cancer gene 1

BRCA2 - Breast cancer gene 2

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CASP2 – Caspase 2

CASP3 - Caspase 3

CASP7 - Caspase 7

CASP8 - Caspase 8

CASP9 - Caspase 9

CASP10 - Caspase 10

cDNA - DNA complementar

CSCs - Células tronco tumorais

CDH1 - *Cadherin 1*

CFLAR - *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*

c-FLIP - *cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*

CHEK2 - *Checkpoint kinase 2*

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DGCR8 - *DiGeorge syndrome critical region 8*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA - *Ácido desoxirribonucleico*

EGFR - *Epidermal growth factor receptor*

ER - Receptor de estrogênio

EROS - *Espécies reativas do oxigênio*

FADD - *Fas Associated Via Death Domain*

FAS - *Fas cell surface death receptor*

FAS-L - Ligante de Fas

FIP200 - *FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*

GAPDH - *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*

IRS1 - *Insulin Receptor Substrate 1*

HER2 - *Human epidermal growth factor receptor-type 2*

LC3 - *Microtubule associated protein 1 light chain 3*

LC3-I – Forma inativa de LC3

LC3-II - Forma ativa de LC3

Mimic - molécula mimética de miRNA

miRNA - microRNA

MOMP - *Mitochondrial outer membrane permeabilization*

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

mTORC1 - Complexo constituído das proteínas Raptor, Deptor, mTOR, PRAS40 e mLST8

MTT - Brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NRBF2 - *Nuclear receptor-binding factor 2*

NK - *Natural killer*

nt - Nucleotídeo

OMS - Organização Mundial da Saúde

PALB2 - *Partner and localizer of BRCA2*

PARP - *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PD-L1 - *Programmed death-ligand 1*
PI - Iodeto de propídeo
PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*
PIK3CA - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
PIK3C3 - *Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*
PIK3R4 - *Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4*
Pol II – RNA polimerase II
PR - Receptor de progesterona
Pri-miRNA - miRNA primário
PS - Fosfatidilserina
PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*
RAD51C - *RAD51 paralog C*
Ran-GTP - Ran-guanosina-5'-trifosfato
RCD - *Regulated cell death*
RHEB - *Ras homolog enriched in brain*
RISC - *RNA-induced silencing complex*
RNA - Ácido ribonucleico
RNAm - RNA mensageiro
RPc - Resposta patológica completa
RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBF - Soro fetal bovino
siRNA - *Small interfering RNA*
snRNA - *small nuclear RNA*
STK11 - *Serine/threonine kinase 11*
tBID - Forma truncada de BID
TNBC - *Triple negative breast cancer*
TNF - *Tumor necrosis factor*
TP53 - *Tumor protein p53*
TRAF6 - *TNF receptor-associated factor 6*
TRBP - *Transactivation response RNA binding protein*
TSC - *Tuberous sclerosis complex*
ULK - *Unc-51-like autophagy-activating kinases*
UTR - *Untranslated region*
VPS34 - *Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34*

WIPI - *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*

XIAP - *X-linked inhibitor of apoptosis*

XPO5 - Exportin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	22
2.1.1	Epidemiologia e fatores de risco	22
2.1.2	Diagnóstico	23
2.1.3	Classificação Histológica dos Tumores de Mama	24
2.1.4	Classificação Molecular dos Tumores da Mama	26
2.1.5	Câncer de Mama Triplo-Negativo	26
2.2	MORTE CELULAR.....	27
2.2.1	Apoptose	28
2.2.2	Autofagia	29
2.3	VIA DE PI3K/AKT/MTOR	32
2.4	MICRORNAS	32
2.5	MODELAGEM MATEMÁTICA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO BIOLÓGICAS ..	35
2.5.1	Modelo da Influência de miRNA nas Vias de Autofagia e Apoptose em Câncer de Mama Triplo Negativo	36
2.6	MIR-200C-3P	38
2.7	MIR-144-3P.....	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAIS	41
4.2	REVISÃO BIOINFORMÁTICA DE REDES REGULATÓRIAS	41
4.3	CULTIVO CELULAR.....	42

4.4	DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR	43
4.5	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAIMAX.....	44
4.6	TRANSFECCÃO CELULAR.....	44
4.7	DETERMINAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAIMAX.....	45
4.8	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR APÓS TRANSFECCÃO COM <i>MIMICS</i> E INIBIDORES DE MIR-200C-3P E MIR-144-3P.....	46
4.9	ENSAIO DE ANEXINA V-FITC/IODETO DE PROPÍDEO	46
4.10	EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DE RNA TOTAL	47
4.11	REAÇÃO DE POLIADENILAÇÃO E SÍNTESE DE CDNA.....	48
4.12	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	49
4.13	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	51
4.13.1	Análise de alterações nucleares	52
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS.....	53
5.1	REVISÃO BIOINFORMÁTICA DE REDES REGULATÓRIAS	53
5.1.1	Via de apoptose.....	53
5.1.2	Via de autofagia.....	57
5.1.3	Via de PI3K/AKT/mTOR.....	60
5.1.4	Rede regulatória	63
5.2	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAIMAX	66
5.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRANSFECCÃO DOS <i>MIMICS</i> E INIBIDORES DE MIR-144-3P E MIR-200C-3P.....	68
5.4	ENSAIO DE ANEXINA V-FITC/IODETO DE PROPÍDEO	69
5.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	71
5.5.1	RT-qPCR para detecção do conteúdo de miR-200c-3p e miR-144-3p	71

5.5.2	RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-200c-3p.....	72
5.5.3	RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-144-3p	73
5.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	75
5.6.1	Expressão das proteínas caspase 3 e LC3B após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-200c-3p	75
5.6.2	Expressão das proteínas caspase 3 e LC3B após transfecção com <i>mimic</i> e inibidor de miR-144-3p	78
5.6.3	Análise alterações nucleares	80
6	DISCUSSÃO	81
6.1	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAIMAX	81
6.2	<i>MIMIC</i> MIR-200C-3P	81
6.3	INIBIDOR DE MIR-200C-3P	85
6.4	<i>MIMIC</i> DE MIR-144-3P	88
6.5	INIBIDOR DE MIR-144-3P	91
7	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO A – Genes alvos de miR-200c-3p na via de apoptose	118
	ANEXO B – Genes alvos de miR-144-3p na via de apoptose	120
	ANEXO C – Via de apoptose (KEGG PATHWAY)	121
	ANEXO D - Genes alvos de miR-200c-3p na via de autofagia	122
	ANEXO E - Genes alvos de miR-144-3p na via de autofagia	124
	ANEXO F – Via de autofagia (KEGG PATHWAY)	125
	ANEXO G - Genes alvos de miR-200c-3p na via de PI3K/AKT/mTOR	126
	ANEXO H - Genes alvos de miR-144-3p na via de PI3K/AKT/mTOR	130
	ANEXO I – Via de PI3K/AKT/mTOR (KEGG PATHWAY)	131

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo genérico utilizado para referir-se a um conjunto de doenças distintas caracterizadas pelo crescimento e proliferação celular desordenado. A invasão de tecidos e órgãos adjacentes consiste no processo de metástase, que atualmente é a principal causa de óbito promovida por tumores malignos (WHO, 2024a).

Entre todas as formas de câncer, exceto pele não-melanoma, o câncer de mama é o segundo mais incidente em nível mundial em mulheres (Bray *et al.*, 2024). O subtipo triplo-negativo da doença (TNBC) é caracterizado pela ausência de expressão de receptores hormonais e amplificação de HER2, sendo extensivamente conhecido por sua alta agressividade, caráter fortemente invasivo e elevadas taxas de recidiva (Foulkes *et al.*, 2010; Sharma, 2016). Esse conjunto de características, aliado ao padrão de diagnóstico tardio observado nesses tumores e à escassez de alternativas terapêuticas disponíveis atualmente para o TNBC, é responsável por conferir prognósticos frequentemente desfavoráveis para as pacientes afetadas por essa doença (Howard; Olopade, 2021; Kesireddy *et al.*, 2024; Kumar; Aggarwal, 2016).

Neste contexto, microRNAs (miRNA) tratam-se de pequenas sequências nucleotídicas endógenas que permitem a modulação da expressão gênica em nível pós-transcricional (Bartel, 2004). Os miRNA destacam-se devido à capacidade intrínseca de regulação de diversas vias bioquímicas de sinalização relacionadas à morte, diferenciação, desenvolvimento e proliferação celular (Gebert; MacRae, 2019; van Wijk *et al.*, 2022).

Essas moléculas tem apresentado relevância no cenário de pesquisa oncológica, uma vez que podem atuar de forma a promover ou suprimir o desenvolvimento tumoral, além de apresentarem-se com expressão desregulada frequentemente no câncer (Chakraborty *et al.*, 2023; Esquela-Kerscher; Slack, 2006; Peng; Croce, 2016). No TNBC, diversos estudos já foram realizados e relatam o papel de miRNA no diagnóstico (Fu *et al.*, 2023; Kanugo *et al.*, 2022), prognóstico (Anilkumar *et al.*, 2023; Kahraman *et al.*, 2018; Sukumar *et al.*, 2021) e tratamento dessa neoplasia (Dinami *et al.*, 2023; Tao *et al.*, 2019).

No câncer, as vias de apoptose, autofagia e crescimento celular são frequentemente corrompidas para fins de promoção de manutenção e sobrevivência de células malignas (Mulcahy Levy; Thorburn, 2020; Sanchez-Vega *et al.*, 2018; Yip; Papa, 2021). A apoptose é uma forma de morte celular regulada essencial para a homeostase celular (Galluzzi *et al.*, 2018), e trata-se de um mecanismo supressor tumoral frequentemente desregulado no câncer (Hanahan; Weinberg, 2011). A autofagia, por sua vez, consiste em um mecanismo de

sobrevivência celular de papel ambíguo, podendo inibir a formação de tumores em estágios iniciais da doença, ao mesmo tempo em que possui atividade oncogênica em fases mais avançadas, promovendo resistência a terapias e sobrevivência de células neoplásicas (Debnath *et al.*, 2023; Kocaturk *et al.*, 2019). Enquanto isso, as vias de crescimento celular, especialmente a via PI3K/AKT/mTOR, encontram-se frequentemente ativadas de forma anormal no câncer para promover crescimento e sobrevivência celular (He *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2019).

Neste contexto, levando em consideração a importância desses processos para o processo de tumorigênese, um sistema de modelagem matemático foi anteriormente proposto pelo nosso grupo de pesquisa (Issler, 2021), com o objetivo de estudar a influência de miRNA frequentemente alterados em TNBC nas vias de apoptose, autofagia e PI3K/AKT/mTOR. A aplicação do modelo revelou que a restauração da atividade de miR-200c-3p ou miR-144-3p foi capaz de promover apoptose como resposta majoritária, sendo um resultado de grande interesse para tumores do subtipo triplo-negativo, que sofrem com a escassez de terapias disponíveis.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo validar o sistema de modelagem proposto por meio de novas análises *in silico* e avaliação experimental *in vitro*. Para tal, o efeito de alterações na expressão de miR-200c-3p e miR-144-3p foi examinado em linhagem celular de TNBC nos processos de apoptose, autofagia ou crescimento celular, visando caracterizar funcionalmente essas moléculas e auxiliar no estabelecimento de novas abordagens terapêuticas para esses tumores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

Câncer é um termo genérico aplicado para designar um grande grupo de doenças caracterizado por crescimento e proliferação celular de forma descontrolada. O processo de invasão de tecidos e órgãos distantes é denominado metástase, e consiste na maior causa de morte provocada por tumores malignos (WHO, 2024a). Estima-se que cerca de 1 em cada 5 pessoas desenvolverá alguma forma da doença durante a vida, e apenas o ano de 2022 apresentou uma incidência mundial de cerca de 20 milhões de casos de câncer, com aproximadamente 9.7 milhões de óbitos (WHO, 2024b). Neste contexto, o câncer tem apresentado-se não somente como um problema público de saúde global, mas também como uma das principais causas de morte prematura e um dos principais obstáculos para o aumento da expectativa de vida em geral (Bray *et al.*, 2021).

O câncer de mama consiste no segundo tipo de câncer mais frequente em nível mundial excluindo-se os tumores de pele não melanoma. A doença foi responsável por cerca de 2,3 milhões de novos casos de câncer apenas no ano de 2022 e constitui atualmente a quarta forma de câncer com maior taxa de mortalidade global, promovendo cerca de 670 mil óbitos no mesmo ano (Bray *et al.*, 2024). Em território brasileiro, apenas para o triênio 2023-2025 são esperados cerca de 75 mil casos de tumores de mama por ano, estimando-se um risco de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres. Trata-se do tipo tumoral mais incidente no país e em todos os Estados brasileiros de forma unânime, se excluído tumores de pele não melanoma (INCA, 2022).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença envolvem fatores hereditários e não hereditários. Os fatores não hereditários que contribuem para a predisposição de câncer de mama compreendem idade avançada, obesidade e sobrepeso, menarca precoce, menopausa tardia, uso de contraceptivos hormonais, nuliparidade e terapia de reposição hormonal, além de fatores relacionados ao estilo de vida, como consumo de álcool, tabagismo, sedentarismo e consumo excessivo de alimentos processados (Lukasiewicz *et al.*, 2021; Momenimovahed; Salehiniya, 2019; Sun *et al.*, 2017). Já os fatores hereditários consistem em histórico familiar, responsável por cerca de 5 a 10% dos casos, e de diversos fatores genéticos, como mutações

que promovem perda de função em genes supressores tumorais, ou ganho de função em oncogenes (Brewer *et al.*, 2017; Liu, L. *et al.*, 2021; Ponti *et al.*, 2023).

Os genes BRCA1 e BRCA2, localizados nos cromossomos 17q21 e 13q12, respectivamente, tratam-se de dois importantes supressores tumorais que frequentemente apresentam mutações em casos de câncer de mama, sendo responsáveis por cerca de 20% dos casos hereditários da doença (Stratton; Rahman, 2008; Sun *et al.*, 2017). As alterações em BRCA1/2 nesses tumores são consideradas de alta penetrância, uma vez que mulheres portadoras dessas mutações possuem até 80% de risco de desenvolvimento de câncer de mama ao longo da vida (Balmana *et al.*, 2011; Paluch-Shimon *et al.*, 2016). Outras alterações genéticas de penetrância intermediária a elevada que são frequentemente relacionadas com o desenvolvimento de neoplasias de mama incluem mutações em TP53, CDH1, STK11, PALB2, PTEN, CHEK2, ATM e RAD51C (Fanale *et al.*, 2020; Han; Kim, 2021; Tedaldi *et al.*, 2017; Turchiano *et al.*, 2023).

2.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico precoce do câncer de mama proporciona uma forma importante de prevenção contra a mortalidade (INCA, 2024). Tumores localizados são restritos ao sítio primário e caracterizam os estágios iniciais do câncer, apresentando taxa de sobrevida de pacientes em cinco anos após o diagnóstico acima de 99%. Já tumores com acometimento de outros órgãos e tecidos, ou seja, em processo de metástase e, portanto, associados a estágios mais avançados da doença, possuem uma queda de sobrevida em cinco anos para cerca de 30%. Neste contexto, é evidente que o reconhecimento dos tumores da mama em fases iniciais culmina em prognósticos melhores (SEER, 2024; Wen, 2024).

O diagnóstico é realizado por meio de exame clínico para avaliação de sinais e sintomas, além do rastreamento por imagem por meio de mamografia, que é atualmente considerado o padrão-ouro para diagnóstico de câncer de mama. A confirmação do diagnóstico é efetuada mediante biópsia por punções ou pequenas cirurgias (INCA, 2024; Loibl *et al.*, 2024).

O sinal mais comum da doença envolve a presença de nódulo mamário fixo e de consistência endurecida com aumento progressivo de tamanho em mulheres adultas de qualquer idade, ou de nódulo que persiste por mais de um ciclo menstrual em mulheres acima de 30 anos de idade. Em mulheres com mais de 50 anos, a presença de qualquer nódulo deve ser investigada (INCA, 2024). Ainda, sinais como secreção papilar unilateral, lesões

eczematosas não responsivas a tratamentos tópicos, linfadenopatia axilar, retração na pele da mama, pele edemaciada com aspecto de casca de laranja ou mudança de formato do mamilo podem estar presentes e são indicativos da doença (ACS, 2022a; INCA, 2024).

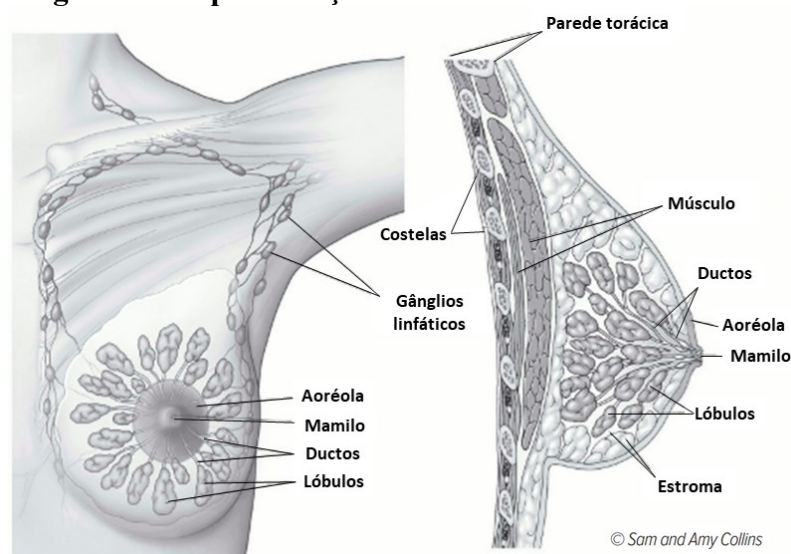
No Brasil, são adotadas Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama, que englobam as técnicas de diagnóstico precoce e rastreamento (INCA, 2015). Para o diagnóstico precoce, a detecção de sinais e sintomas mais comuns relacionados à doença e o acesso rápido aos serviços de saúde são aliados visando o diagnóstico da neoplasia em estágios iniciais (INCA, 2015; 2024). Já a técnica de rastreamento consiste na realização de exame de mamografia bienal em mulheres de 50 a 69 anos, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma vez que menos de um terço dos tumores da mama detectados por mamografia são passíveis de reconhecimento por meio de exame clínico. Nesse cenário, a adoção da estratégia de rastreamento tem apresentado resultados satisfatórios na redução da mortalidade por tumores de mama (IARC, 2016; INCA, 2015).

2.1.3 Classificação Histológica dos Tumores de Mama

O câncer de mama consiste em um grupo altamente heterogêneo de neoplasias, sendo composto por uma gama de subgrupos que apresentam distintas características biológicas, histológicas e moleculares, capazes de influenciar diretamente a agressividade tumoral e a responsividade a tratamentos. Neste contexto, a classificação tumoral adequada é de suma importância para o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença (Harbeck *et al.*, 2019; Malhotra *et al.*, 2010).

Considerando a composição fisiológica da mama saudável, que é constituída por estroma, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ductos transportadores de leite e lóbulos, sendo que os últimos tratam-se de glândulas responsáveis pela produção de leite (Figura 1), a classificação histológica do câncer de mama baseia-se em características morfológicas das células neoplásicas, visando obter informações como origem do tumor e nível de diferenciação apresentado (ACS, 2021c; Rakha *et al.*, 2023).

Figura 1 – Representação anatômica de mama saudável



Adaptado de American Cancer Society. ACS (2021c)

Em geral, tumores de mama consistem em adenocarcinomas, ou seja, neoplasias iniciadas em células de tecido glandular, que normalmente envolvem os ductos ou lóbulos mamários. Os adenocarcinomas ductais e lobulares são adicionalmente classificados de acordo com a presença ou ausência de invasão de tecidos adjacentes, sendo denominados como *in situ* quando restritos ao sítio primário, ou invasivos quando há disseminação de células tumorais a tecidos vizinhos (ACS, 2021b). O carcinoma ductal *in situ*, também chamado de carcinoma intraductal, é uma forma não invasiva que não acomete tecidos adjacentes e, portanto, não possui potencial metastático. Esse tipo de lesão pode ser considerada pré-cancerígena, uma vez que se encontra restrita ao interior dos ductos mamários. Entretanto, há possibilidade de evolução da doença para forma invasiva em alguns casos (Jagsi R, 2019; Zubair *et al.*, 2020). Já o carcinoma lobular *in situ*, ou neoplasia lobular, trata-se de uma condição benigna, e não é considerado uma verdadeira forma de câncer de mama, uma vez que não possui tipicamente a capacidade de invasão de estroma adjacente. Todavia, um diagnóstico desse tipo histológico indica um maior risco de desenvolvimento da doença propriamente dita (ACS, 2022b; Zubair *et al.*, 2020).

O carcinoma ductal invasivo, também conhecido como carcinoma de tipo não especial, trata-se do tipo histológico mais comum de câncer de mama, representando até 80% dos casos. A segunda classificação histológica mais frequente é o carcinoma lobular invasivo, que é responsável por 10-15% dos casos (ACS, 2021a; Viale, 2012).

2.1.4 Classificação Molecular dos Tumores da Mama

Considerando a heterogeneidade apresentada por neoplasias da mama, Perou *et al.* (2000) classificou-as em subgrupos, de acordo com a expressão de padrões moleculares, considerando a presença de receptores de estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR), além da amplificação da expressão do Receptor Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2, do inglês, *human epidermal growth factor receptor-type 2*).

Dessa forma, atualmente o câncer de mama é dividido em quatro subtipos principais, sendo eles: luminal A que apresenta a expressão ER/PR, e não possui superexpressão de HER2; luminal B, que apresenta ER em menores níveis que o subtipo Luminal A, concomitantemente a expressão de PR, enquanto a presença de HER2 pode ser variável; tumores HER2 positivos, como indicado pelo nome, possuem presença apenas de HER2; e, por fim, tumores *basal like* não apresentam a expressão de nenhum dos receptores mencionados (Harbeck *et al.*, 2019; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001). Adicionalmente, o subtipo *claudin-low*, foi adicionado às classificações de tumores da mama tardiamente, e de forma semelhante à classificação *basal-like*, apresenta ausência dos três marcadores principais, diferenciando-se através da presença de propriedades semelhantes a células-tronco tumorais (CSCs) (Prat *et al.*, 2010).

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC, do inglês, *triple-negative breast cancer*) é incluído na classificação *basal like* em até 75% dos casos, apesar de compreender outros subtipos em uma menor porcentagem, incluindo os tumores *claudin-low*. Trata-se de um subtipo bastante diverso, que em geral não apresenta expressão de receptores hormonais ou de amplificação de HER2 (Lehmann *et al.*, 2011; Perou, 2010; Prat *et al.*, 2010).

2.1.5 Câncer de Mama Triplo-Negativo

Os tumores de mama do subtipo triplo-negativo representam cerca de 15% dos casos de câncer de mama. A incidência desse subtipo é geralmente maior em mulheres mais jovens, com idade inferior a 40 anos, e parece estar associada a um padrão de diagnóstico tardio (Howard; Olopade, 2021; Kumar; Aggarwal, 2016).

Esses tumores são caracterizados por sua elevada agressividade, altas taxas de recidiva, caráter fortemente invasivo e menor índice de sobrevida após a ocorrência de metástases (Foulkes *et al.*, 2010; Sharma, 2016). Esse conjunto de características, aliado à escassez de alternativas terapêuticas, é responsável por conferir prognósticos desfavoráveis às

pacientes acometidas pelo TNBC, com uma média de sobrevida geral de aproximadamente 13 meses nas fases metastáticas da doença (Kesireddy *et al.*, 2024; Li, Y. *et al.*, 2022).

Independente do subtipo tumoral, a cirurgia trata-se da primeira escolha nas fases iniciais de câncer de mama. Esse procedimento pode estar aliado à radioterapia, e/ou a outras terapias sistêmicas neoadjuvantes (Harbeck *et al.*, 2019; Loibl *et al.*, 2024). Considerando a ausência dos principais marcadores moleculares ER, PR e HER2, os tumores do subtipo triplo-negativo não possuem resposta favorável a terapias alvo aplicadas com sucesso para outras classificações de tumores da mama, como a hormonioterapia e terapia anti-HER2, limitando as opções de tratamento sistêmico e restringindo-se majoritariamente a quimioterapia em tumores em fases mais avançadas (Harbeck *et al.*, 2019; Lee, 2023).

Neste contexto, apesar do TNBC apresentar um maior índice de resposta patológica completa (RPc) a esta modalidade terapêutica quando comparado aos outros subtipos, atingindo cerca 30-60% de RPc, os quimioterápicos tratam-se de fármacos altamente agressivos que exibem uma série de efeitos adversos indesejáveis (Li, Y. *et al.*, 2022; Sivina *et al.*, 2023). Atualmente, novas alternativas farmacológicas têm sido descritas para o tratamento desse subtipo, como o uso de inibidores de PARP para pacientes positivos para mutação no gene BRCA (Eikesdal *et al.*, 2021; Litton *et al.*, 2023; Loap *et al.*, 2022), ou inibidores de PD-L1 para tumores que expressam essa proteína (Nanda *et al.*, 2016; Pusztai *et al.*, 2024; Schmid *et al.*, 2023). Entretanto, considerando a agressividade e padrões clínicos apresentados pelo TNBC, que apresenta rápida recidiva e menor tempo de sobrevida geral (Foulkes *et al.*, 2010; Kesireddy *et al.*, 2024), torna-se evidente a amplificação da descoberta de novas alternativas terapêuticas.

2.2 MORTE CELULAR

A morte celular é o processo através do qual ocorre a degeneração irreversível de funções celulares vitais, culminando em perda de integridade celular. Diferentes formas de morte celular já foram descritas, variando em aspectos bioquímicos, morfológicos e funcionais, englobando mais de 15 tipos, de acordo com a última atualização do Comitê de Nomenclatura para Morte Celular, publicado em 2018 (Galluzzi *et al.*, 2018). Considerando apenas os aspectos morfológicos, a morte celular tem sido historicamente classificada em três grandes grupos: apoptose, morte celular autofágica e necrose. Neste contexto, apoptose e autofagia consistem em dois tipos de morte celular regulada com desfecho de fagocitose e degradação lisossomal, sem promover dano às células vizinhas, enquanto o processo de

necrose é caracterizado pela rápida perda de integridade da membrana plasmática, ocasionando extravasamento do conteúdo celular sobre células adjacentes e resposta inflamatória (Alberts *et al.*, 2017; Galluzzi *et al.*, 2007; Galluzzi *et al.*, 2018)

As modalidades de morte por apoptose e autofagia serão descritas em mais detalhes a seguir.

2.2.1 Apoptose

A apoptose é descrita como um processo geneticamente controlado e altamente conservado acerca de organismos multicelulares distintos. É uma forma de morte celular regulada (RCD, do inglês *regulated cell death*) iniciada a partir de perturbações no microambiente intracelular (apoptose intrínseca) ou extracelular (apoptose extrínseca), caracterizada por uma sucessão de eventos organizados que culminam na autodestruição celular sistemática. O processo pode ser identificado por particularidades morfológicas, como o encolhimento do citoplasma, condensação de cromatina (picnose) e fragmentação nuclear, além da liberação de corpos apoptóticos. Trata-se de um processo essencial para a homeostase nas condições fisiológicas e patológicas, capaz de propiciar morte celular sem promoção de resposta inflamatória, uma vez que os fragmentos celulares gerados são rapidamente removidos por meio da atividade de fagócitos (Alberts *et al.*, 2017; Galluzzi *et al.*, 2018).

A via intrínseca de apoptose é ativada em resposta a estímulos intracelulares de estresse, como dano ao DNA, estresse oxidativo, privação de fatores de crescimento ou utilização de fármacos citotóxicos. Neste contexto, as proteínas membros da família de BCL2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*), BAX (do inglês, *BCL2 associated X, apoptosis regulator*) e BAK (do inglês, *BCL2 antagonist/killer 1*) promovem a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*), resultando em liberação de citocromo C e promoção de apoptose mediada por caspase 9 (CASP9), que irá ativar as caspases executoras ou seja, -3, -6 e -7, e resultar em apoptose (Czabotar *et al.*, 2014; Kashyap *et al.*, 2021; Yuan; Ofengeim, 2024).

A via extrínseca de apoptose, por sua vez, é desencadeada a partir da interação entre proteínas de sinalização e receptores de morte celular, como Fas e TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*), que são responsáveis por transmitir o sinal de morte a partir da superfície celular até as vias de sinalização intracelular (Elmore, 2007). Dessa forma, os domínios citosólicos dos receptores promovem uma série de interações que resultam na ativação de

caspace 8 (CASP8), uma protease capaz de iniciar a apoptose por meio da ativação direta das caspases executoras. Entretanto, quando as caspases executoras estão inibidas pela ação de XIAP (do inglês, *X-linked inhibitor of apoptosis*), a apoptose extrínseca requer a clivagem de BID (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*) por CASP8, que dá origem a sua forma truncada tBID. Essa proteína, por sua vez, é translocada para a membrana exterior da mitocôndria, onde provoca a permeabilização mitocondrial e ativa a via apoptótica intrínseca (Galluzzi *et al.*, 2018; Kashyap *et al.*, 2021).

No contexto do câncer, a apoptose consiste em um processo relevante relacionado à supressão tumoral, pois promove a remoção de células danificadas ou defeituosas. Dessa forma, a resistência à morte celular é considerada um dos *hallmarks* do câncer, e alvos envolvendo a restauração dessa resposta, visando o estabelecimento ou potencialização de tratamentos para o câncer vem sendo estudados há décadas (Carneiro; El-Deiry, 2020; D'Arcy, 2019; Elmore, 2007; Hanahan; Weinberg, 2011). Entre as terapias já aplicadas em oncologia que são capazes de promover apoptose como um de seus mecanismos antitumorais pode-se mencionar alguns quimioterápicos, radioterapia, imunoterapia e diversas formas de terapia alvo (Hudis, 2007; Liu, Z. *et al.*, 2021; Martins *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2016).

2.2.2 Autofagia

A autofagia consiste no fenômeno celular de degradação e reciclagem de proteínas e/ou organelas com o objetivo da manutenção da homeostase intracelular. É um processo dependente de lisossomos, essencial em diversas condições fisiológicas, como no crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (Alberts *et al.*, 2017; Glick *et al.*, 2010), cuja desregulação parece estar associada ao desenvolvimento de diversas enfermidades como o câncer (Debnath *et al.*, 2023; Levy *et al.*, 2017), diabetes (Oh; Lee, 2022), infecções (Cabrera-Rodriguez *et al.*, 2021; Shan *et al.*, 2023), doenças hepáticas (Qian *et al.*, 2021), cardiovasculares (Gatica *et al.*, 2015), entre outras (Haq *et al.*, 2021; Racanelli *et al.*, 2018; Xilouri *et al.*, 2016).

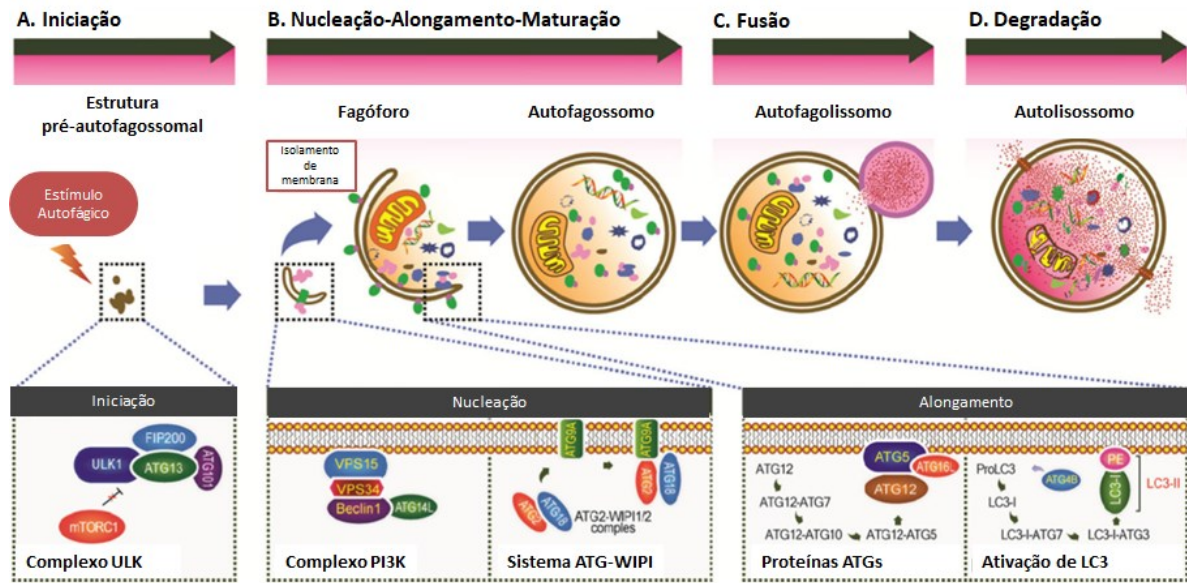
Até o momento, sabe-se da existência de três formas de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia. A primeira refere-se ao processo de captura e degradação de elementos citosólicos por meio da invaginação da membrana de lisossomos, que são organelas ricas em enzimas hidrolíticas e responsáveis pela digestão de conteúdos intracelulares. A autofagia mediada por chaperonas trata-se de um mecanismo mais específico, em que as proteínas alvo são desdobradas e transportadas ao interior dos

lisossomos através da ação de chaperonas. Por fim, a macroautofagia é um processo em que o conteúdo celular a ser degradado é envolto mediante a formação de uma vesícula de dupla membrana, chamada autofagossomo. A degradação dos componentes capturados ocorre posteriormente nos autolisossomos, que consistem em vesículas formadas por meio da fusão de autofagossomos e lisossomos (Abdrakhmanov *et al.*, 2020; Fleming *et al.*, 2022; Glick *et al.*, 2010; Klionsky; Petroni; *et al.*, 2021). Neste trabalho, somente o processo de macroautofagia será abordado e é referido apenas como autofagia.

Em nível molecular, a autofagia é um processo de diferentes estágios coordenado principalmente pelas proteínas relacionadas à autofagia, ou ATGs (do inglês, *autophagy related*), e a família de proteínas WIPI (do inglês, *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*), além de dois complexos: PI3K (do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*) e ULK (do inglês, *unc-51-like autophagy-activating kinases*) (Glick *et al.*, 2010; Wu, 2023). O complexo PI3K é formado por duas proteínas homônimas, PIK3C3, também chamada de VPS34 e PIK3R4, também chamada de VPS15; além de beclin 1 (BECN1), barkor (referido também como ATG14) e NRBF2 (do inglês, *nuclear receptor-binding factor 2*). Já o complexo ULK é constituído por ULK1, ATG13, ATG101 e FIP200 (do inglês, *FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*) (Lu *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018).

Conforme ilustrado na Figura 2, após estímulo, a autofagia é iniciada através de indução do complexo ULK, em um processo chamado de iniciação, dando origem a estrutura pré-autofagossomal. O complexo ULK é responsável por ativar o complexo PI3K, que por sua vez estimula a família de proteínas WIPI, para que ambos possam promover o isolamento inicial de membrana em torno do conteúdo a ser degradado. Esse processo é referido como nucleação. A seguir, o alongamento dessa membrana origina o fagóforo por meio do estímulo de um conjunto de proteínas ATGs, responsáveis por converter LC3 inativo (LC3-I) para sua forma ativa (LC3-II) através de lipidação. LC3-II é incorporado à membrana do fagóforo, promovendo o fechamento dessa estrutura, originando o autofagossomo, que se funde ao lisossomo para produzir o autolisossomo. A partir dessa etapa, ocorre a degradação dos componentes intracelulares capturados (Li; He; *et al.*, 2020; Wu, 2023).

Figura 2 – Biogênese de autofagossomos



A autofagia é iniciada através de indução do complexo ULK, em um processo chamado iniciação, dando origem a estrutura pré-autofagossomal (A). O complexo PI3K e a família proteínas WIPI promovem o isolamento inicial de membrana em processo referido como nucleação. O alongamento dessa membrana origina o fagóforo através da ação de proteínas ATG e ativação de LC3, finalizando com a maturação dessa estrutura em autofagossomo (B). A fusão do autofagossomo com lisossomo origina o autofagolisossomo (C), e por fim ocorre a degradação do conteúdo nos autolisossomos (D). Adaptado de: Li; He; *et al.* (2020)

Apesar de ser considerada uma forma de proteção celular em primeira instância, em que a degradação de componentes celulares é capaz de fornecer substratos para a manutenção da homeostase celular, a ativação descontrolada de autofagia pode promover morte por mecanismos dependentes ou mediados pela via autofágica (Jung *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023).

Dessa forma, a morte celular dependente de autofagia (ADCDC, do inglês *autophagy-dependent cell death*) é uma forma de RCD estritamente dependente dos componentes da via bioquímica de autofagia, não sendo relacionada a nenhuma outra forma de morte celular. Portanto, em casos de ADCDC, a inibição de autofagia através de intervenções genéticas ou farmacológicas é capaz de prevenir a ocorrência de perda de viabilidade celular (Denton; Kumar, 2019; Galluzzi *et al.*, 2018). Em contrapartida, a morte celular mediada por autofagia (AMCD, do inglês *autophagy-mediated cell death*) é relacionada ao estímulo de outras classes de morte celular, como apoptose, necroptose e ferroptose (Jung *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023).

No contexto do câncer, a autofagia possui um papel ambíguo, atuando como supressor tumoral em estágios iniciais da doença, enquanto possui ação oncogênica em fases mais avançadas, ao aumentar a sobrevivência de células tumorais. Dessa forma, em um cenário geral, a autofagia possui a ação de suprimir a iniciação de tumores previamente à transformação maligna de células e/ou em estágios iniciais da progressão neoplásica, enquanto atua na promoção tumoral em estágios tardios, promovendo manutenção do tumor e

induzindo resistência às terapias (Debnath *et al.*, 2023; Galluzzi *et al.*, 2015; Kocaturk *et al.*, 2019; Onorati *et al.*, 2018).

2.3 VIA DE PI3K/AKT/MTOR

Em condições fisiológicas, a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é responsável pela regulação de vias metabólicas essenciais como crescimento e proliferação celular, biossíntese de macromoléculas, manutenção de balanço redox, homeostase e sobrevivência celular (Hoxhaj; Manning, 2020; LoPiccolo *et al.*, 2008). Em condições normais PI3K é ativada a partir de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, citocinas e hormônios. A ativação dessa proteína é responsável por estimular AKT, que irá promover o crescimento e sobrevivência celular através da fosforilação de diversas proteínas intracelulares, além de estimular mTOR. Por fim, mTOR é capaz de estimular a síntese proteica e a captação celular de glicose, promovendo o crescimento celular (Alberts *et al.*, 2017; Fresno Vara *et al.*, 2004; Porta *et al.*, 2014).

A via PI3K/AKT/mTOR encontra-se alterada em quase todos os tipos de câncer, cuja ativação oncogênica resulta em promoção da sobrevivência tumoral em situações de estresse, através de modificações do metabolismo celular. Esta ação dá suporte às necessidades anabólicas das células em crescimento, além de estimular o desenvolvimento de resistência a antitumorais (Datta *et al.*, 1999; Glaviano *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2019).

A inibição dessa via de sinalização no câncer tem sido extensivamente pesquisada, uma vez que resulta em diminuição de proliferação celular, simultaneamente ao aumento de morte (Rugo *et al.*, 2020; Savas *et al.*, 2022; Turner *et al.*, 2023). Neste contexto, o primeiro inibidor de PI3K, PIQRAY® (alpelisibe), foi aprovado pela ANVISA no ano de 2019 para o tratamento de tumores de mama avançados ou metastáticos com mutação de *PIK3CA*, positivos para ER/PR e negativos para HER2 (Andre *et al.*, 2019; Brasil, 2019).

2.4 MICRORNAS

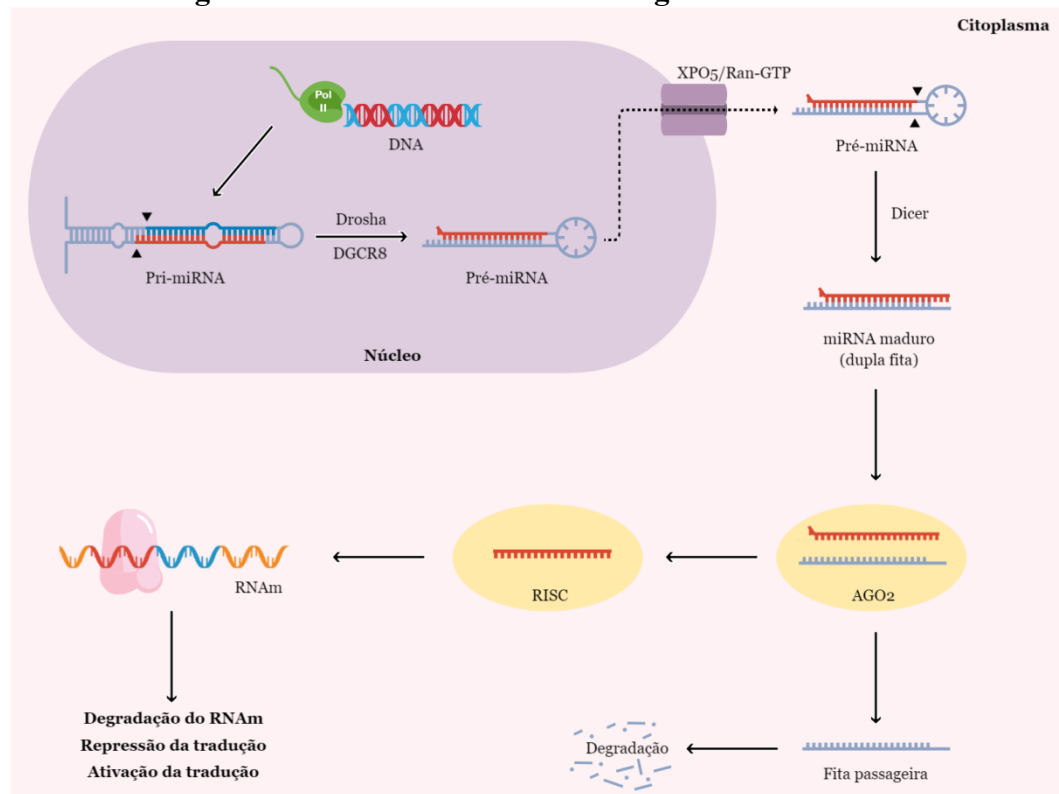
MicroRNAs (miRNA) são pequenas sequências endógenas de RNA não codificantes, contendo aproximadamente 22 nucleotídeos (nt). São responsáveis por atuar na regulação

pós-transcricional da expressão gênica por meio da interação entre as moléculas de miRNA e RNA mensageiro (RNAm) (Bartel, 2004; Ha; Kim, 2014).

Genes codificadores de miRNA já foram mapeados em todos os cromossomos humanos, com exceção do cromossomo Y, em que nenhuma sequência de miRNA foi experimentalmente validada (Calin *et al.*, 2004; Di Palo *et al.*, 2020). Neste contexto, sabe-se que o genoma humano codifica aproximadamente 2654 miRNA e, embora a função de alguns ainda seja desconhecida (Kozomara *et al.*, 2019), inúmeros estudos relacionados ao tema tem sido desenvolvidos. Já foi demonstrado que os miRNA possuem finalidade prognóstica, diagnóstica ou terapêutica no desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares (Cortez-Dias *et al.*, 2016; Sadat-Ebrahimi *et al.*, 2022), neurológicas (Chen *et al.*, 2021; Citterio *et al.*, 2023), autoimunes (Liu; Jeon; *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024), metabólicas (Ghoreishi *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2019) e infecciosas (Dey *et al.*, 2016; Mokhtari *et al.*, 2023), além de diversas formas de câncer (Liang *et al.*, 2020; Liu, N. *et al.*, 2018; Tassone *et al.*, 2023).

O mecanismo canônico de biogênese dos miRNA ocorre por meio da transcrição do DNA pela RNA polimerase II (pol II) em estruturas conhecidas como miRNA primário (pri-miRNA) (Bartel, 2018; Lee *et al.*, 2002). Ainda no núcleo, essas estruturas sofrem ação da enzima ribonuclease III Drosha, com auxílio da proteína DGCR8 (do inglês, *DiGeorge syndrome critical region 8*), dando origem ao pré-miRNA a partir da clivagem da porção *hairpin* de seu precursor (Lee *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2023). Após, o pré-miRNA é transportado do núcleo ao citoplasma por meio da ação do complexo exportina-5 (XPO5)/Ran-guanosina-5'-trifosfato (Ran-GTP), e processado pela RNase III endonuclease Dicer e seu cofator TRBP (do inglês, *transactivation response RNA binding protein*) para remoção da alça terminal, dando origem a uma fita dupla de miRNA, que consiste em uma fita de miRNA maduro e uma fita passageira, composta pela sequência complementar (Ha; Kim, 2014; Saliminejad *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2003). Por fim, a fita dupla é incorporada à proteína argonauta-2 (AGO2), e a fita passageira é liberada, enquanto a fita madura permanece associada a AGO2, dando origem ao complexo RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). Esse complexo pode então atuar em seus alvos mediante o pareamento complementar de bases, promovendo repressão da tradução ou degradação de seu alvo. Ainda, em algumas situações, miRNA são capazes de estimular a ativação da tradução de RNAm (Bartel, 2018; Denli *et al.*, 2004; Iwakawa; Tomari, 2022; Iwasaki *et al.*, 2010; O'Brien *et al.*, 2018).

Figura 3 – Processo canônico de biogênese dos miRNA



No núcleo, os miRNA são transcritos partir do DNA pela pol II em pri-miRNA, que é processado para remoção da porção *hairpin* pela enzima ribonuclease III Drosha, com auxílio da proteína DGCR8, originando o pré-miRNA, que é transportado do núcleo ao citoplasma pelo complexo XPO5/Ran-GTP. No citoplasma, o pré-miRNA é convertido a miRNA maduro de fita dupla por meio de Dicer. Após a separação da dupla fita, a fita passageira é degradada, e a fita madura permanece associada à AGO2, originando o complexo RISC. A atuação no RNAm pode promover repressão/ativação da tradução ou degradação de seu alvo. Pol II: RNA Polimerase II; pri-miRNA: miRNA primário; DGCR8: do inglês, *DiGeorge syndrome critical region 8*; XPO5: exportina-5; Ran-GTP: Ran-guanosina-5'-trifosfato; AGO2: argonauta 2; RISC: do inglês, *RNA-induced silencing complex*; RNAm: RNA mensageiro. Imagem de fonte autoral produzida com Mind the Graph.

Os miRNA tem obtido destaque devido à capacidade intrínseca de regulação de diversos processos celulares fisiológicos e patológicos, uma vez que atua em diversas vias de sinalização celular relacionadas à morte, diferenciação, desenvolvimento e proliferação (Gebert; MacRae, 2019; O'Brien *et al.*, 2018; van Wijk *et al.*, 2022).

Em relação ao câncer, essas pequenas sequências de ácidos nucleicos possuem a capacidade de atuar como oncogenes ou supressores tumorais, sendo nomeados de oncomiRs e miRs supressores tumorais, respectivamente (Chakraborty *et al.*, 2023; Esquela-Kerscher; Slack, 2006; Peng; Croce, 2016).

A desregulação da expressão de miRNA tem sido associada à iniciação tumoral, progressão e ocorrência de metástases (Ali Syeda *et al.*, 2020; Lee; Dutta, 2009), e diversos estudos já demonstraram diferenças nos padrões de expressão de pequenos RNAs entre tecidos saudáveis e tumorais (Cui *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2005; Zhou; Shen, 2019), evidenciando a aplicação dessas moléculas como possíveis biomarcadores para diagnóstico,

(Li, X. *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2014), prognóstico (Halvorsen *et al.*, 2017; Khadka *et al.*, 2023), além de novos tratamentos para o câncer através da aplicação de miRNA *mimics* (também chamados de miméticos), ou de respectivos inibidores (antagomiR) (Hong *et al.*, 2020; Tassone *et al.*, 2023).

2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO BIOLÓGICAS

A modelagem matemática é o processo de aplicação de equações, fórmulas matemáticas e recursos computacionais com o objetivo de representar ou interpretar contextos da realidade de maneira simplificada. Basicamente, o processo de modelagem envolve etapas de observação e coleta de dados, seguida da construção do modelo, simulação e análise. Posteriormente a elaboração, o modelo deve ser otimizado, geralmente através de novas observações que podem envolver contextos experimentais e etapas adicionais de pesquisa (Dundar *et al.*, 2012; Torres; Santos, 2015).

Mesmo as vias bioquímicas mais básicas envolvem um grande número de moléculas que não apresentam comportamento linear e não interagem entre si de maneira isolada. Dessa forma, apesar de a caracterização de constituintes pontuais das vias de sinalização celular ser necessária, pode representar pouca ajuda quando aplicada em um contexto mais amplo, em que se deve considerar o papel ambíguo, e por vezes distinto, de cada molécula nos mais diversos processos biológicos. Neste cenário, a aplicação de modelos matemáticos constituídos por uma rede abrangente aos principais componentes e interações de um sistema pode auxiliar não somente no entendimento da estrutura e função do processo biológico, como também ser capaz de prever o comportamento em situações fisiológicas e de doenças (Le Novère, 2015).

A criação de modelos matemáticos tem sido fundamental para o aprimoramento do entendimento de diversos mecanismos envolvendo inúmeros estados fisiopatológicos, incluindo o câncer. Neste sentido, diversos estudos já foram realizados envolvendo a regulação de proliferação e morte celular (Grieco *et al.*, 2013), estabelecimento de efeito sinérgico entre tratamentos para o câncer (Flobak *et al.*, 2015; Liao; Watt, 2022; Serre *et al.*, 2016), apoptose (Bagci *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2019), autofagia (LIU, B. *et al.*, 2017), senescência celular (Mombach *et al.*, 2014) e resposta imune tumoral (Davenport *et al.*, 2022). O uso de modelos matemáticos e de ferramentas bioinformáticas em biologia celular tem apresentado destaque devido à possibilidade de teste de hipóteses e realização de

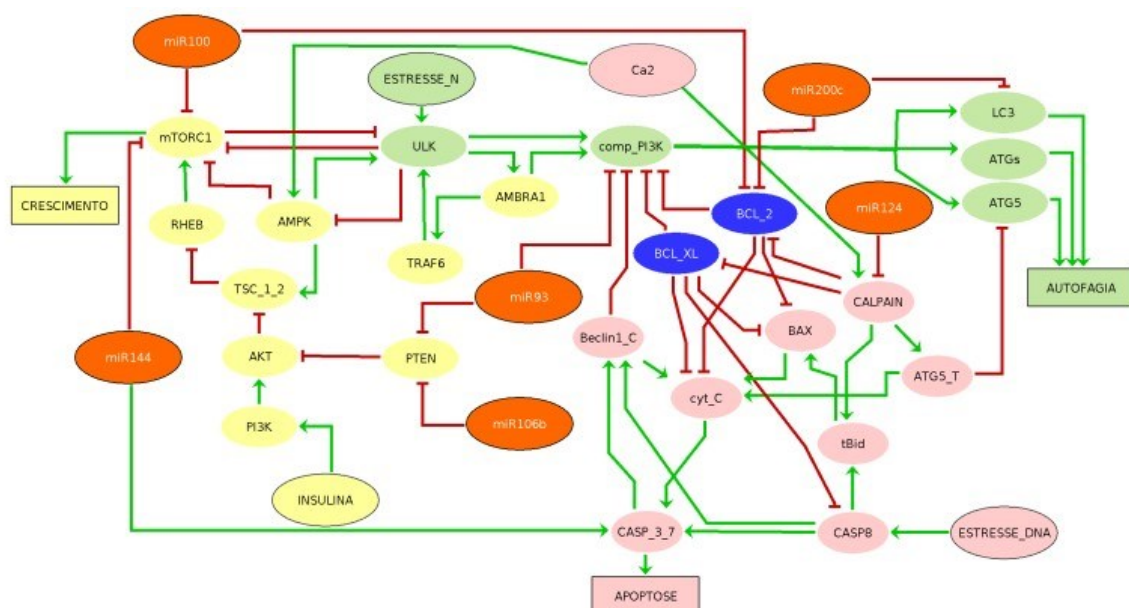
experimentos *in silico*, com considerável aumento na velocidade de obtenção de resultados finais (Bull *et al.*, 2020; King *et al.*, 2021; Sible; Tyson, 2007).

2.5.1 Modelo da Influência de miRNA nas Vias de Autofagia e Apoptose em Câncer de Mama Triplo Negativo

Um trabalho realizado previamente por nosso grupo de pesquisa buscou estudar o papel de diferentes miRNA nas vias de sinalização relacionadas aos processos de apoptose, autofagia e crescimento celular em uma linhagem de TNBC por meio da aplicação de ferramentas matemáticas (Issler, 2021).

Resumidamente, para a construção do modelo, foi realizada uma pesquisa das principais proteínas constituintes das vias de apoptose e autofagia, seguida da busca por miRNA capazes de inibir ou estimular os RNAm responsáveis pela codificação das proteínas de interesse. Após a identificação desses miRNA, suas expressões foram avaliadas e comparadas em linhagem celular tumoral e linhagem saudável de mama para a definição de quais dessas moléculas seriam capazes de promover alterações oncogênicas nos processos de autofagia e apoptose. Dessa forma, foi possível construir uma rede regulatória contendo os principais componentes de cada via, que é ilustrada na Figura 4 (Issler, 2021).

Figura 4 – Rede regulatória representando as vias de apoptose, autofagia e crescimento celular



Elipses em verde representam componentes da via de autofagia; elipses rosadas representam a via de apoptose; e azuis representam os componentes presentes simultaneamente nas vias de autofagia e apoptose. A cor amarela

indica a via de PI3K/AKT/mTOR, e por fim, laranja representa os miRNA. Os *outputs* de cada via são representados por retângulos em suas respectivas cores. As linhas verdes e vermelhas representam ativação e inibição, respectivamente. Fonte: Issler (2021).

A rede é representada por condições iniciais estabelecidas através de relações de ativação ou inibição entre os respectivos constituintes, e o modo como cada variável interage com todo o sistema é fornecido através de expressões matemáticas, permitindo a simulação das vias de sinalização por meio do comportamento dinâmico do sistema que ocorre após a evolução de um estado inicial a cada estado estável.

Mais detalhadamente, o modelo possui constituintes fixos, que se tratam das proteínas das vias de interesse, assim como componentes variáveis, chamados de *inputs*. Nesse caso, os *inputs* podem ser ativados ou não, e tratam-se dos componentes capazes de modificar a forma com que os constituintes fixos interagem entre si. Neste contexto, os *inputs* da rede são os miRNA, que interagem com diversos componentes de todas as vias; insulina (representado por INSULINA), que modifica a promoção de crescimento celular; estresse no DNA (representado por ESTRESSE_DNA) que altera a ativação de apoptose; estresse nutricional (representado por ESTRESSE_N), que modifica o estímulo de autofagia; e o aumento de cálcio citoplasmático (representado por Ca²), que pode estimular apoptose por meio da família de proteínas Calpain (no modelo apresentado como CALPAIN), enquanto inibe o crescimento celular através da inibição do complexo de proteico AMPK (representado por AMPK).

Assim, fica claro que os *inputs* são dados de entrada que podem modificar a forma como os constituintes da via interagem entre si através de inibição ou ativação de proteínas, modificando o estado inicial da rede até um novo estado estável, que resultará em distintos destinos celulares, chamados *outputs*. Dessa forma, os *outputs* tratam-se dos processos de apoptose, autofagia ou crescimento celular (Issler, 2021).

De acordo com os *outputs* observados para cada grupo de *inputs* testados no sistema de Issler (2021), dois miRNA foram selecionados para validação experimental neste trabalho, visando o aprimoramento do sistema: miR-200c-3p e miR-144-3p, ambos com expressão reduzida na linhagem celular de TNBC, MDA-MB-231 (Chen *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2016).

2.6 MIR-200C-3P

A redução de expressão do miR-200c-3p já foi descrita em diversos tipos de câncer, incluindo bexiga (Wen *et al.*, 2022), cabeça e pescoço (Aghiorghiesei *et al.*, 2022; Sanli *et al.*, 2024), rins (Li, T. *et al.*, 2019; Maolakuerban *et al.*, 2018), próstata (Lin *et al.*, 2024) e mama, especialmente no subtipo triplo-negativo da doença (Chen *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2013).

O miR-200c-3p parece possuir valor prognóstico e diagnóstico em câncer de mama, apresentando-se subexpresso em pacientes portadores de tumores mais agressivos (Chen *et al.*, 2018; Fahim *et al.*, 2020), localmente avançados ou metastáticos (Navarro-Manzano *et al.*, 2022). Corroborando esses dados, a superexpressão desse pequeno ácido nucleico parece estar associada com o aumento da sobrevida de pacientes de câncer de mama (Kawaguchi *et al.*, 2017), evidenciando o papel relevante desse miRNA no microambiente tumoral.

No TNBC, a diminuição desse miRNA parece estar relacionada com o aumento de proliferação e sobrevivência celular, e a restauração da expressão de miR-200c-3p em células MDA-MB-231 foi capaz de suprimir a proliferação celular e promover a morte por apoptose (Garrido-Cano *et al.*, 2023; Ren *et al.*, 2014). Ainda, o aumento de expressão dessa molécula parece ser capaz de reestabelecer a sensibilidade do TNBC a quimio e radioterapia, através da redução de expressão de proteínas relacionadas à resistência, como a glicoproteína P; e sobrevivência celular por meio de autofagia, como LC3 (Chen *et al.*, 2012; Safaei *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2015). Esse papel de redução de resistência promovida pela restauração de expressão de miR-200c-3p não é relatado apenas para o câncer de mama, mas também para o câncer de pulmão (Liu; Zhang; *et al.*, 2022), gástrico (Li, M. *et al.*, 2019) e de próstata (Dahal *et al.*, 2023).

O sistema de modelagem matemático em questão demonstrou que a atividade ectópica, ou seja, o aumento de expressão, de miR200c-3p em células de TNBC foi capaz de retornar 672 estados estáveis, sendo 384 referentes ao *output* de apoptose, 64 ao crescimento celular e 224 estados não originaram *outputs*. Dessa forma, de acordo com resultados do modelo, o *output* com maior probabilidade de observação experimental consiste em apoptose (Issler, 2021).

2.7 MIR-144-3P

O miR-144-3p tem sido descrito como um supressor tumoral cuja expressão reduzida contribui para o desenvolvimento de tumores distintos, como carcinoma oral e de esôfago (He

et al., 2020; Wang *et al.*, 2020), câncer colorretal (Li *et al.*, 2021), gástrico (Lu *et al.*, 2021), pulmão (Liu, C. *et al.*, 2018), tumores cerebrais (Lan *et al.*, 2015; Zhou; Liu, 2021), de próstata resistente à castração (You; Zhang, 2018) e de mama (Pan *et al.*, 2016).

O aumento da expressão de miR-144-3p em células de câncer de mama triplo-negativo parece estar associado com a inibição da proliferação celular e aumento de apoptose (Pan *et al.*, 2016). Em concordância, um estudo publicado por Yin e colaboradores (2018) demonstrou que a expressão elevada desse ácido nucleico em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama foi capaz de inibir o processo de proliferação, invasão, migração celular e crescimento tumoral, além de promover morte celular através do estímulo de apoptose.

Esse miRNA também apresentou evidência de participação na restauração de sensibilidade do câncer de mama à quimioterapia. Neste contexto, o aumento de miR-144 em cultura de células MCF-7 resistentes a doxorrubicina foi capaz de restaurar a resposta dessa linhagem ao fármaco, reduzindo a ativação da via de autofagia e induzindo morte por apoptose (Ren *et al.*, 2021), reforçando o papel supressor tumoral desse miRNA.

De acordo com Issler (2021), a atividade ectópica do miR-144-3p no modelo matemático resultou em 640 estáveis com o *output* apoptose, sendo este o destino celular com maior probabilidade de observação experimental no TNBC.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar funcionalmente miR-144 e miR-200c na promoção dos processos de apoptose, autofagia e crescimento para validação dos *outputs* do modelo matemático anteriormente proposto, visando auxiliar no processo de definição de novas abordagens para o tratamento do TNBC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é realizar a validação do modelo matemático previamente proposto a partir de técnicas envolvendo bioinformática e contextos experimentais para análise do efeito da modificação de conteúdo celular de miR-200c-3p e miR-144-3p nos processos de apoptose, autofagia e crescimento celular em câncer de mama triplo-negativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a capacidade dos *mimics* e inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p em interferir nos processos de apoptose, autofagia ou crescimento celular em linhagem modelo de câncer de mama triplo-negativo;
- Analisar a expressão de genes relacionados aos processos de apoptose, autofagia e crescimento celular na linhagem tumoral selecionada após transfecção com os *mimics* e inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p;
- Analisar a expressão de proteínas relacionadas aos processos de apoptose e autofagia na linhagem tumoral selecionada através de após transfecção com os *mimics* e inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), dimetil sulfoxido (DMSO), Azul de Trypan, o brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT), as sequências de microRNAs *mimics* de miR-200c-3p e miR-144-3p (*MISSION® microRNA Mimic* HMI0354 e HMI0223, respectivamente), inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p (*MISSION® Synthetic microRNA Inhibitor, Human* HSTUD0354 e HSTUD0223) e controle negativo (*mirVana™ miRNA Mimic Negative Control #1*) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (San Luis, Missouri, EUA). As sequências de *primers* para RT-qPCR, os anticorpos primários policlonais de CASP3 e LC3, e o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor™ 488 foram adquiridas da Invitrogen® (Waltham, Massachusetts, EUA).

4.2 REVISÃO BIOINFORMÁTICA DE REDES REGULATÓRIAS

Para revisão da rede regulatória do modelo previamente proposto por (Issler, 2021) (Figura 4) foram aplicadas ferramentas de bioinformática. Inicialmente, a base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015) foi utilizada para visualização de prováveis genes alvos de miR-200c-3p e miR-144-3p considerando as vias biológicas de interesse. Para este fim, a função '*target mining*' de miRWalk 2.0 foi selecionada, na qual a base de dados KEGG PATHWAY (Kanehisa; Goto, 2000) é utilizada conjuntamente para extração de interações entre os miRNA selecionados e genes associados especificamente a cada via de sinalização: Apoptose (hsa04210#Apoptosis), autofagia (hsa04140#Autophagy) e PI3K/AKT/mTOR (hsa04151#PI3K-Akt signaling pathway).

Neste contexto, a adição de genes à rede regulatória foi realizada através da determinação de relevância de cada alvo para a via de sinalização em questão associada ao parâmetro de *target score* de cada gene, que se trata de um valor capaz de fornecer um índice de probabilidade de interação entre miRNA e mRNA alvo. Posteriormente, a base KEGG PATHWAY foi novamente utilizada para visualização de cada via de sinalização e para modificação da rede regulatória previamente estabelecida com base nos genes selecionados. A inserção de novos componentes na rede foi realizada a partir do software de desenho PathVisio 3.3.0 (Kutmon *et al.*, 2015) e interações preditas foram pesquisadas no Pubmed utilizando os seguintes termos de pesquisa: "miR-200c-3p + possível gene alvo" e " miR-144-

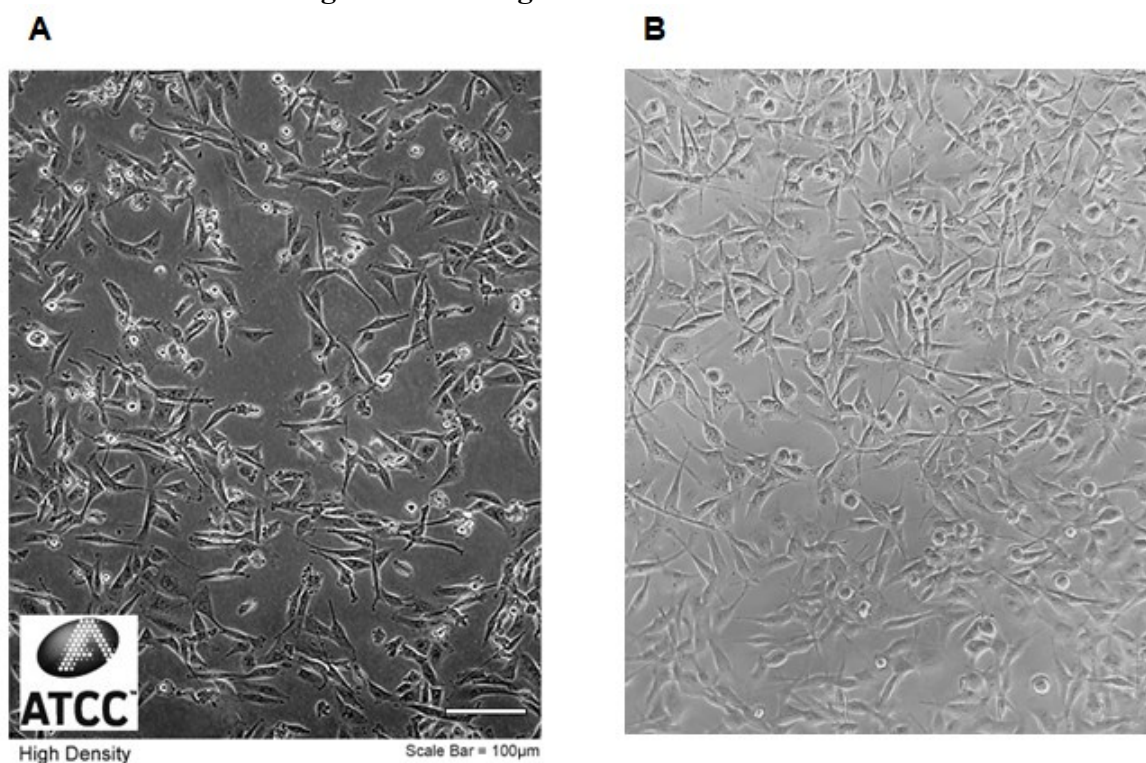
3p + possível gene alvo" para definição quais de interações encontravam-se confirmadas através de dados experimentais. Todas as bases de dados e softwares utilizados neste trabalho são de acesso livre.

4.3 CULTIVO CELULAR

A linhagem MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi selecionada como modelo de câncer de mama triplo-negativo para realização deste trabalho. Previamente a utilização neste projeto, as células foram submetidas ao processo de autenticação celular através do BCRJ. Visando controlar possíveis modificações de fenótipo celular, as culturas foram fotografadas regularmente para observação de morfologia e comparação com fotos do banco ATCC (ATCC®, 2024) (Figura 1), e somente células em até 10 passagens após autenticação foram utilizadas.

A linhagem foi cultivada em garrafas plásticas para proliferação celular em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) inativado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão de HEPES. As culturas foram mantidas em estufa úmida de atmosfera controlada a 37°C e 5% de CO₂, e trocas de meio de cultivo foram realizadas de duas a três vezes por semana. Após atingirem uma confluência de 80 a 90%, as células foram brevemente rinsadas utilizando tampão fosfato-salino (PBS) e dissociadas utilizando tripsina-EDTA 0.25% (p/v) para subcultura, plaqueamento ou congelamento. O número de células viáveis foi avaliado através do método de exclusão de Azul de Trypan (Freshney, 1987) antes da realização de cada experimento, e somente culturas com viabilidade celular superior a 99% foram utilizadas.

Figura 5 - Linhagem celular MDA-MB-231



Linhagem celular MDA-MB-231. (A) Fonte: ATCC® (2024). (B) Fonte: Própria autora.

4.4 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

O MTT (brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) consiste em um sal de tetrazólio de coloração amarela que, quando exposto a células viáveis, é reduzido através da atividade de desidrogenases mitocondriais em cristais insolúveis de formazan, de coloração roxa. Dessa forma, a viabilidade celular é diretamente proporcional à redução do MTT (Mosmann, 1983).

Após a realização de particularidades específicas de cada experimento, uma mistura de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e meio de cultivo em proporção 1:10 foi preparada. Para realização do ensaio, o sobrenadante de todos os poços foi removido, com posterior adição do reagente preparado. Após incubação a 37°C pelo período de 2 h, o sobrenadante foi novamente removido e substituído por 100 µL de DMSO, com homogeneização em agitador orbital até a completa dissolução dos cristais de formazan. Para determinação de absorbância do ensaio colorimétrico em λ 540 nm, utilizou-se o espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika, Belgium), e os resultados foram expressos como porcentagem (%) relativa ao controle.

4.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAiMAX

Para análise de compatibilidade do carreador comercial Lipofectamina® RNAiMAX (ThermoFisher®, Massachusetts, EUA) com a linhagem MDA-MB-231, o ensaio colorimétrico de MTT foi aplicado com objetivo de medir a atividade metabólica celular como índice de viabilidade. Neste sentido, partículas vazias de Lipofectamina®, ou seja, na ausência de ácidos nucleicos encapsulados, foram utilizadas com o objetivo de avaliar a interação do carreador com a linhagem de escolha sem a presença de demais interferentes.

Para realização do ensaio, as células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas em placa de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células/poço em 100 μ L de meio DMEM contendo 10% (v/v) de SBF inativado, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão de HEPES.

Para obtenção de partículas vazias do carreador, a Lipofectamina® RNAiMAX foi preparada conforme orientações do fabricante, substituindo os ácidos nucleicos por água livre de nucleases. Resumidamente, para cada triplicata de poços tratados, uma suspensão contendo 1.5 μ L Lipofectamina® e 25 μ L de meio OPTI-MEM® I foi preparada, assim como uma solução contendo 0.5 μ L de água livre de nucleases e 25 μ L de meio OPTI-MEM® I. Após, a solução contendo água foi misturada à suspensão de Lipofectamina® em proporção 1:1, e incubada em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, 10 μ L da mistura foram adicionados a cada poço. Células expostas somente ao meio de cultivo foram estabelecidas como controle negativo. A viabilidade celular foi avaliada após um período de 48 h de incubação através do ensaio de MTT, conforme descrito no item 4.4.

4.6 TRANSFEÇÃO CELULAR

Para o procedimento de transfeção celular, os *mimics* e inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p, assim como o controle negativo (CN), foram diluídos, separadamente, em água livre de nucleases para obtenção de uma suspensão com concentração final de 10 μ M. As suspensões foram divididas em alíquotas e armazenadas a -20°C para uso posterior.

Controles foram aplicados, compreendendo um controle celular exposto somente ao meio de cultivo (CC), um controle das partículas de vazias de Lipofectamina® (CL), além de um controle do carreador contendo uma sequência comercial de miRNA *scramble*, não homóloga a nenhum gene humano conhecido (CN). Ademais, as condições experimentais

foram delineadas para os seguintes cenários isolados do carreador Lipofectamina® contendo: *mimic* de miR-200c-3p, *mimic* de miR-144-3p, inibidor de miR-200c-3p ou inibidor de miR-144-3p.

Para transfecção celular, o reagente de transfecção Lipofectamina® RNAiMAX foi preparado conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, os *mimics* e inibidores dos miRNA de interesse, assim como o controle negativo, foram diluídos em meio OPTI-MEM® I para concentração de 50 nM. Após esta etapa, uma suspensão contendo Lipofectamina® em meio OPTI-MEM® I foi preparada. Para obtenção dos complexos de transfecção, a suspensão contendo os pequenos RNAs foi adicionada a mistura de Lipofectamina® em proporção 1:1, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Distintos volumes dos complexos de transfecção foram adicionados às placas de cultivo previamente semeadas com as células MDA-MB-231, visando atingir as concentrações de 50, 100 e 150 nM, e todos os controles foram padronizados para atingir a maior concentração testada dos pequenos RNAs, ou seja, 150 nM. A incubação foi mantida durante o período de 48 h previamente à realização de experimentos subsequentes.

4.7 DETERMINAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAiMAX

O controle comercial fluorescente *BLOCK-iT® Alexa Fluor® Red Fluorescent Control* (ThermoFisher®, Massachusetts, EUA) foi selecionado para determinação da eficiência de transfecção do carreador Lipofectamina® RNAiMAX na linhagem MDA-MB-231. Trata-se de uma molécula de siRNA (do inglês, *small interfering RNA*) não homóloga a nenhum gene humano conhecido, ligada a um composto fluorescente Alexa Fluor® 555.

Inicialmente, as células MDA-MB-231 foram semeadas em densidade de 5×10^3 células/poço em 100 μ L de meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SBF inativado, utilizando placas de 96 poços.

O carreador Lipofectamina® foi preparado conforme descrito no item 4.6, utilizando o siRNA controle em substituição aos miRNA. Dessa forma, condições contendo 10, 20 e 40 nM do siRNA fluorescente foram estabelecidas seguindo instruções do fabricante. Controles utilizando partículas vazias de Lipofectamina® e 40 nM da molécula fluorescente livre foram aplicados. Posteriormente à transfecção, as placas foram mantidas em incubadora para cultivo celular durante 48 h. Após esse período, o meio de cultivo dos poços foi substituído por PBS

para aprimoramento da detecção do sinal de fluorescência emitido pelo conjugado Alexa Fluor® 555.

Os resultados foram obtidos em microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®), utilizando filtro de emissão 555/580 nm. As imagens foram capturadas através da câmera Leica DFC310 FX e do software LAS AF Lite® (ambos da empresa Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha).

4.8 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR APÓS TRANSFEÇÃO COM *MIMICS* E INIBIDORES DE MIR-200C-3P E MIR-144-3P

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT (descrito no item 4.4), após transfecção dos *mimics* ou inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p nas concentrações de 50, 100 e 150 nM. Para realização do ensaio, a linhagem MDA-MB-231 foi semeada em placa de 96 poços em uma densidade de 10.000 células/poço. Após 24 h, foram preparados complexos de transfecção utilizando Lipofectamina®, conforme descrito no item 4.6. Volumes de 20, 40 e 60 µL do complexo Lipofectamina®-miRNA foram adicionados a cada poço para obtenção das concentrações de 50, 100 e 150 nM, respectivamente. O ensaio de MTT foi realizado após 48 h de incubação.

4.9 ENSAIO DE ANEXINA V-FITC/IODETO DE PROPÍDEO

Para avaliação de tipo de morte celular o ensaio de Anexina V-FITC/iodeto de propídeo foi aplicado. Para este fim, a linhagem MDA-MB-231 foi semeada em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço em placa de 12 poços. Após 24 horas, o procedimento de transfecção celular foi realizado com os *mimics* e inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p nas concentrações de 150 nM, conforme descrito no item 4.6.

Posteriormente à incubação durante 48 h, o meio de cultura foi removido e as células foram submetidas à tripsinização seguidas de lavagem com PBS e homogeneização em tampão de ligação. Após, as células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (Invitrogen®, Massachusetts, EUA) para avaliação em citômetro de fluxo BD FACS CANTO II (BD Biosciences, EUA). Para cada amostra foram adquiridos 50.000 eventos, e a análise dos resultados foi realizada por meio do software FlowJo®.

Populações celulares não marcadas com Anexina V-FITC ou iodeto de propídeo foram consideradas saudáveis, enquanto populações marcadas apenas com Anexina V-FITC ou concomitantemente marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo foram consideradas como apoptóticas. Grupos celulares marcados somente com iodeto de propídeo foram considerados em necrose.

4.10 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DE RNA TOTAL

Para a extração de RNA total, o kit *mirVana PARIS*TM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) foi utilizado de acordo com instruções do fabricante. Inicialmente, a linhagem proveniente de câncer de mama triplo-negativo foi semeada em placa de 12 poços, em densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço. Após 24 h, as culturas foram expostas ao carreador comercial Lipofectamina[®] contendo, isoladamente, *mimics* ou inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p, conforme descrito no item 4.6. Apenas a maior concentração testada anteriormente (150 nM) foi utilizada nesta etapa. Após 48 h de incubação, o sobrenadante de cada poço foi coletado, considerando a presença de células mortas ou soltas. As células aderidas foram tripsinizadas, coletadas e reunidas ao seu respectivo sobrenadante previamente obtido para centrifugação a 1500 RPM a 4°C durante 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS duas vezes antes da adição de 200 µL de tampão de lise celular gelado, e cada amostra foi mantida em agitação em vórtex durante 30 s para uma ruptura homogênea das membranas celulares. Subsequentemente, 300 µL de solução desnaturante foram adicionados e as amostras foram incubadas em gelo por 5 min. Após esse processo, 600 µL da fase orgânica do reagente ácido-fenol:clorofórmio foi incorporado a cada reação de extração, seguido de homogeneização em vórtex durante 1 min e centrifugação a $12.000 \times g$ à temperatura ambiente para separação da mistura e obtenção de uma interfase compacta. Após, 600 µL da fase aquosa foram removidos cuidadosamente e transferidos para um novo tubo, no qual 750 µL de etanol puro a temperatura ambiente foi posteriormente adicionado. Imediatamente, tubos coletores contendo cartuchos de filtro foram preparados para cada amostra, e a mistura aquosa contendo etanol foi pipetada e centrifugada por 2 min, $3.000 \times g$ para retenção do RNA total. Após o descarte do filtrado, deu-se início as etapas de lavagem, em que 700 µL da solução de lavagem 1 foram adicionados a cada cartucho e foi realizada centrifugação durante 2 min, $3.000 \times g$. Novamente, o filtrado foi descartado e os cartuchos foram então lavados duas vezes com 500 µL de solução de lavagem 2/3, com posterior repetição da centrifugação para remoção de fluidos residuais. Em seguida,

os cartuchos de filtro foram transferidos para novos tubos coletores e 65 μL de água livre de nuclease pré-aquecida a 95°C para eluição do RNA total. Por fim, os tubos coletores foram centrifugados durante 2 min, $3.000 \times g$ para recuperação do RNA eluído.

Para quantificação e determinação de pureza do RNA total, o equipamento NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) foi utilizado. Leituras nos comprimentos de onda 230, 260, 280 e 320 nm foram realizadas utilizando 2 μL de cada amostra. As relações A260/A280 e A260/A230 são utilizadas em geral para determinação da qualidade do RNA extraído, auxiliando na detecção de contaminações por proteínas/DNA ou resíduos de solventes, respectivamente. A medida em 320 nm é realizada para remoção dos efeitos de background. Para determinação de concentração de amostra, o equipamento realiza o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração da amostra (ng/\mu L)} = (A260 - A320) \times 40$$

4.11 REAÇÃO DE POLIADENILAÇÃO E SÍNTESE DE CDNA

A partir do RNA total previamente extraído (item 4.10), foram preparadas amostras de DNA complementar (cDNA) para utilização posterior em ensaios de RT-qPCR. Para este fim, o kit *miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) foi empregado conforme instruções do fabricante. Inicialmente, foi realizado o preparo das reações de poliadenilação visando o alongamento das sequências de miRNA, uma vez que o tamanho reduzido dessas moléculas dificulta a detecção através de métodos convencionais de RT-qPCR (Chen *et al.*, 2011). Dessa forma, reações foram preparadas contendo 4.0 μL de $5\times$ *poly A polymerase buffer*, 1.0 μL de rATP (10 mM), 800 ng de RNA total, 1 μL da enzima *E. coli poly A polymerase* e água livre de RNase em quantidade suficiente para completar o volume final para 20 μL . Todas as reações foram homogeneizadas com o auxílio de micropipeta e centrifugadas brevemente para depositar todo o conteúdo ao fundo dos tubos. Após, as reações foram incubadas a 37°C por 30 min e 95°C por 5 min em termociclador Biocycler para obtenção das amostras poliadeniladas, que foram transferidas imediatamente para banho de gelo.

Para síntese de cDNA, reações foram preparadas contendo 2.0 μL de $10\times$ *AffinityScript RT buffer*, 4 μL da reação de poliadenilação, 0.8 μL de dNTP mix (100 mM), 1.0 μL de *RT adaptor primer* (10 μM), 1.0 μL de *AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture* e água livre de RNase em quantidade suficiente para completar o volume final para 20 μL . Novamente, as reações foram homogeneizadas delicadamente com o auxílio de

micropipeta e centrifugadas brevemente, seguido de incubação em termociclador nas seguintes condições: 55°C durante 5 min, 25°C durante 15 min, 42°C por 30 min e 95°C por 5 min para finalização da transcrição reversa. As amostras foram armazenadas a -20°C e diluídas em água livre de RNase previamente ao uso.

Considerando que o kit *miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* é otimizado para transcrição reversa de templates de miRNA e RNAm, as amostras de cDNA sintetizadas nessa etapa foram utilizadas em ensaios de RT-qPCR para detecção de expressão de miRNA, assim como para determinação de expressão gênica.

4.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Ensaio de RT-qPCR foram aplicados para a detecção da expressão de miRNA e genes após exposição às condições experimentais previamente descritas. Para a detecção de miRNA, o kit *miRNA qPCR Master Mix* (Agilent Technologies, California, EUA) foi utilizado de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, reações com volume final de 25 µL contendo 9.125 µL de água livre de RNases, 12.5 µL de 2 × *miRNA QPCR master mix*, 0.375 µL do corante de referência diluído (1:50), 1.0 µL de *primer* antisense universal, 1.0 µL de *primer* senso específico para o miRNA alvo e 1.0 µL de amostra de cDNA (1:10) foram preparadas. Cada reação foi misturada delicadamente com auxílio de micropipeta e centrifugada brevemente antes do início do ciclo de PCR, que foi realizado no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O seguinte protocolo de incubação foi utilizado: Um ciclo de 10 min a 95°C para desnaturação do DNA, seguido de 40 ciclos de 10 s a 95°C para desnaturação do DNA, 15 s a 55°C para hibridização do *primer* ao alvo e 20 s a 72°C para extensão da cadeia. Para obtenção da curva de dissociação, as seguintes condições foram utilizadas: 1 min a 95°C, 60°C por 30 s, seguido de aumento na temperatura em 0,3°C/s até 95°C.

Para a detecção de expressão gênica, o kit *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) foi utilizado de acordo com instruções do fabricante. As reações foram preparadas para um volume final de 10 µL, contendo 5 µL de *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)*, 1 µL de *primer* específico senso, 1 µL de *primer* específico antisense, 1 µL de água livre de nucleases e 2 µL amostra de cDNA (1:10). Todas as reações foram homogeneizadas com auxílio de micropipeta e centrifugadas brevemente, e o ciclo de PCR foi efetuado no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* com o protocolo de ciclo padrão, com um ciclo de 2 min a 95°C para ativação da

DNA polimerase, seguido de 40 ciclos de 3 s a 95°C para desnaturação do DNA, e 30 s a 60°C para hibridização do *primer* ao alvo e extensão da cadeia. A curva de dissociação foi adquirida a partir de um ciclo de 15 s a 95°C, 60°C por 1 min, seguido de aumento na temperatura em 0,3°C/s até 95°C por 15 s.

Os resultados de expressão de miRNA foram normalizados utilizando o controle endógeno U6 snRNA (do inglês, *small nuclear RNA*), e os resultados de expressão gênica foram normalizados a partir dos valores obtidos para o gene de controle interno GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Todas as sequências de *primers* específicos utilizados no presente trabalho estão descritas no Quadro 1, e foram desenhadas a partir das sequências FASTA de cada alvo obtidas pela base de dados NCBI gene (Sayers *et al.*, 2022), com o auxílio da ferramenta de bioinformática PrimerBank (Wang, X. *et al.*, 2012). As estruturas oligonucleotídicas foram avaliadas integralmente em relação à homologia para os genes de interesse por meio do uso da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponibilizada pelo NCBI (Ye *et al.*, 2012). Ainda, as características termodinâmicas de cada par de *primer* foram avaliadas por meio da ferramenta Oligoanalyzer® para verificação de formação de estruturas secundárias indesejadas, tais quais *hairpins* e auto ou hetero-dímeros.

Quadro 1 - Sequência de *primers* específicos

Primer	Sequência (5' – 3')
hsa-miR-144-3p	GGGTACAGTATAGATGATGTACT
hsa-miR-200c-3p	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA
U6 senso	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 antisenso	AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH senso	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
GAPDH antisenso	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
Caspase 3 senso	ATCCAGTCGCTTTGTGCCAT
Caspase 3 antisenso	TTCTGTTGCCACCTTTCGGT
BAX senso	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG
BAX antisenso	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
FAS senso	AGATTGTGTGATGAAGGACATGG
FAS antisenso	TGTTGCTGGTGAGTGTGCATT
XIAP senso	TATCAGACACCATATACCCGAGG

Quadro 1 - Sequência de *primers* específicos

Primer	Sequência (5' – 3')
XIAP antisenso	TGGGGTTAGGTGAGCATAGTC
CFLAR senso	AGAGTGAGGCGATTTGACCTG
CFLAR antisenso	GTCCGAAACAAGGTGAGGGTT
PTEN senso	TTTGAAGACCATAACCCACCAC
PTEN antisenso	ATTACACCAGTTCGTCCCTTTC
PIK3CB senso	CTGCCTGCGACAGATGAGTG
PIK3CB antisenso	TCCGATTACCAAGTGCTCTTTC
AKT3 senso	TGTGGATTTACCTTATCCCCTCA
AKT3 antisenso	GTTTGGCTTTGGTCGTTCTGT
EGFR senso	TTGCCGCAAAGTGTGTAACG
EGFR antisenso	GTCACCCCTAAATGCCACCG
IRS1 senso	ACAAACGCTTCTTCGTA CTGC
IRS1 antisenso	AGTCAGCCCGCTTGTTGATG
LC3B senso	AAGGCGCTTACAGCTCAATG
LC3B antisenso	CTGGGAGGCATAGACCATGT

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e a expressão relativa de miRNA foi calculada a partir do método o $2^{-\Delta Cq}$, enquanto o dado de *fold change* para expressão gênica foi obtido a partir do método o $2^{-\Delta\Delta Cq}$, conforme descrito por Schmittgen e Livak (2008).

4.13 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A técnica de imunofluorescência indireta foi aplicada para a visualização da expressão das proteínas de interesse, LC3B e Caspase 3. Para este fim, foram utilizadas placas de cultivo celular próprias para imunofluorescência, em que a linhagem MDA-MB-231 foi semeada na densidade de 1×10^4 células/poço. Após 24 h, o procedimento de transfecção celular foi realizado conforme descrito anteriormente (item 4.6), seguido de 48 h de incubação. Ainda, neste experimento foram aplicados controles positivos para a marcação das proteínas de interesse, utilizando-se o fármaco cloroquina 25 μ M para promover acúmulo de LC3B e paclitaxel 7,5 μ M para detecção de caspase 3.

Inicialmente, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol puro e incubadas a -20°C durante 6 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente lavadas com PBS e o tensoativo polissorbato 20 foi adicionado e mantido durante 10 min visando aumentar a permeabilidade celular. Em seguida, as células foram mantidas durante 30 min em leite desnatado 5% para promoção de bloqueio de reações inespecíficas, e então submetidas à lavagem previamente à adição dos anticorpos primários de interesse. Os anticorpos de LC3B e Caspase 3 foram diluídos para a concentração de 1:250 previamente ao uso, e as amostras foram incubadas em câmara úmida a TA durante 1 h. Após esse período, as células foram submetidas a três etapas de lavagem com PBS, seguida da adição do anticorpo secundário ligado a Alexa Fluor™ 488 e incubação durante 1 h a TA em câmara úmida em completa ausência de luz. Posteriormente, o meio de montagem *ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI* (ThermoFisher®, Massachusetts, EUA) foi adicionado para marcação dos núcleos e proteção dos fluorocromos.

As lâminas foram mantidas a TA em ausência de luz, em superfície reta e seca durante 24 h para solidificação do meio de montagem. Após esse período, os resultados foram obtidos em microscópio invertido IX83® OLYMPUS® em aumento de 20×, utilizando os filtros azul (excitação 300/400 nm e emissão 435/485 nm) e verde (excitação 450/490 nm e emissão 500/550 nm). As imagens foram adquiridas por meio do Software de aquisição e captura de imagens CellSens Dimension 1.12® utilizando câmera digital da Olympus DP73®. Para análise das imagens obtidas, o software ImageJ foi utilizado (Schneider *et al.*, 2012).

4.13.1 Análise de alterações nucleares

Após a marcação dos núcleos com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) para elaboração da técnica de imunofluorescência, um padrão de condensação nuclear foi detectado mediante a exposição aos *mimics* e inibidores dos miRNA de interesse. Dessa forma, as imagens dos núcleos foram obtidas de acordo com o previamente descrito, e constam na seção de resultados para corroborar os dados desse trabalho.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. Todos os ensaios foram analisados por meio do programa Graphpad Prism®, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Tukey ou Dunnett dependendo das

comparações desejadas, sendo que o pós-teste de Tukey foi utilizado para comparar todas as amostras entre si, e o pós-teste de Dunnett foi aplicado para comparar as amostras em relação a um controle específico. Valores de probabilidade inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 REVISÃO BIOINFORMÁTICA DE REDES REGULATÓRIAS

A revisão e atualização da rede regulatória proposta por (Issler, 2021) (Figura 4 na seção de revisão bibliográfica) foi realizada utilizando as ferramentas de bioinformática miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015) e KEGG PATHWAY (Kanehisa; Goto, 2000), além do software de desenho PathVisio 3.3.0 (Kutmon *et al.*, 2015), e a base de dados online Pubmed.

As tabelas extraídas a partir da base de dados miRWalk em que consta os genes com expressão possivelmente modificadas pelos miRNA de interesse nas vias de apoptose, autofagia e PI3K/AKT/mTOR podem ser consultadas na seção de anexos, assim como as vias bioquímicas de KEGG PATHWAY para os processos mencionados. Os resultados de modificação serão discutidos detalhadamente nas próximas seções.

5.1.1 Via de apoptose

Inicialmente, os dados dos alvos dos miRNA relacionados a via de apoptose foram extraídos da plataforma miRWalk (Dweep; Gretz, 2015), e podem ser observados nos quadros contidos na seção de anexos (A e B). Para a adição de alvos na rede, a medida de *target score*, que demonstra a probabilidade da interação predita ocorrer em um contexto biológico, foi considerada, aliada à representação da via de apoptose na base de dados KEGG PATHWAY (Kanehisa; Goto, 2000), que está representada no Anexo C. Assim, os alvos selecionados estão representados nos quadros 2 e 3, que indicam ainda a presença ou ausência de validação experimental para cada interação proposta. Essas informações foram obtidas a partir de pesquisa na base de dados PubMed.

Quadro 2 - Genes alvo de miR-200c-3p na via de apoptose

Gene	Sítio de interação com RNAm	Target score	Validação experimental
<i>XIAP</i>	3UTR	1.00	Jin <i>et al.</i> (2019), Ren <i>et al.</i> (2014)
<i>CASP2</i>	3UTR	0.92	Ausente
<i>BAX</i>	3UTR	0.92	Zhou <i>et al.</i> (2017)
<i>BID</i>	3UTR	0.85	Ausente
<i>CASP9</i>	3UTR	0.85	Ausente
<i>BCL2</i>	5UTR	0.81	Zhang, X. <i>et al.</i> (2019), Zhao <i>et al.</i> (2020), Zhu <i>et al.</i> (2012)

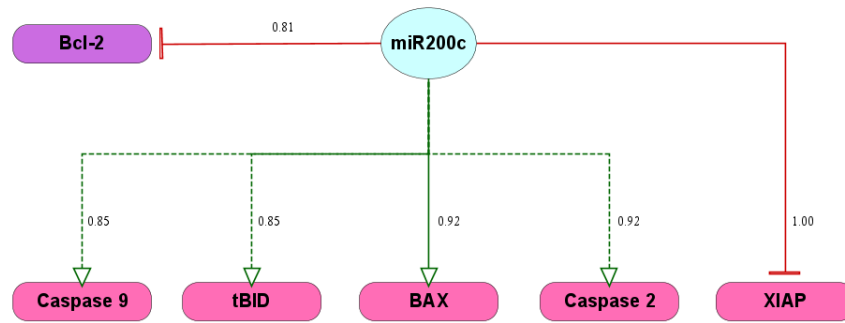
Quadro de fonte autoral.

As análises realizadas em miRWalk (Dweep; Gretz, 2015) revelaram os seguintes genes alvos para o miR-200c: *XIAP*, *CASP2*, *BAX*, *BID*, *CASP9* e *BCL2*.

Segundo estudos publicados por dois grupos de pesquisa independentes, o miR-200c é capaz de promover a inibição de *XIAP* (Jin *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2014). Em células de TNBC, a inibição desse gene parece estar relacionada ao estímulo de apoptose (Ren *et al.*, 2014). Em relação à *BAX*, o miRNA foi capaz de aumentar a expressão gênica em câncer de pulmão (Zhou *et al.*, 2017), e proteica em tumores de Wilms (Zhao *et al.*, 2020) e trofoblastos (Zhang, X. *et al.*, 2019). Estudos relataram redução da expressão proteica de *BCL2* mediante o aumento de miR-200c em células tumorais de pulmão e estômago (Zhu *et al.*, 2012), trofoblastos (Zhang, X. *et al.*, 2019) e tumores de Wilms (Zhao *et al.*, 2020).

As interações de miR-200c com *CASP2*, *BID* e *CASP9* não foram corroboradas por estudos realizados até o momento da finalização do presente trabalho, entretanto, considerando o papel supressor tumoral desse miRNA, as seguintes interações foram propostas para o modelo (Figura 6).

Figura 6 - Interações de miR-200c na via de apoptose



Os componentes da via de apoptose são representados em rosa. Roxo representa os componentes presentes simultaneamente nas vias de autofagia e apoptose. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura. O *target score* de cada interação pode ser observado próximo às linhas de cada interação. Imagem de fonte autoral.

Quadro 3 - Genes alvo de miR-144-3p na via de apoptose

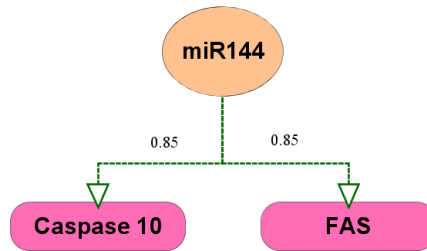
Gene	Sítio de interação com RNAm	<i>Target score</i>	Validação experimental
<i>CASP10</i>	3UTR	0.85	Ausente
<i>FAS</i>	3UTR	0.85	Ausente

Quadro de fonte autoral.

O miR-144 demonstrou possibilidade de atuação nos genes codificantes das proteínas caspase 10 (*CASP10*) e o receptor de morte FAS (*FAS*) segundo análises *in silico*, e essas interações não foram respaldadas até o momento pela literatura existente. Entretanto, considerando o papel supressor tumoral desse miRNA que é descrito não somente em tumores de mama, como em diversos tipos de câncer (Pan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Zhou; Liu, 2021), é esperado que esse pequeno ácido nucleico seja capaz de atuar na ativação da tradução desses alvos, de forma a estimular apoptose.

Neste contexto, o papel do miR-144 na promoção de apoptose já foi descrito anteriormente para tumores da mama (Pan *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2018), e em outros tipos de câncer, como de pulmão (Chen *et al.*, 2015) e próstata (Sun *et al.*, 2021) a partir da modulação de diferentes alvos. Assim, as interações do miR-144 na via foram representadas conforme demonstrado na Figura 7.

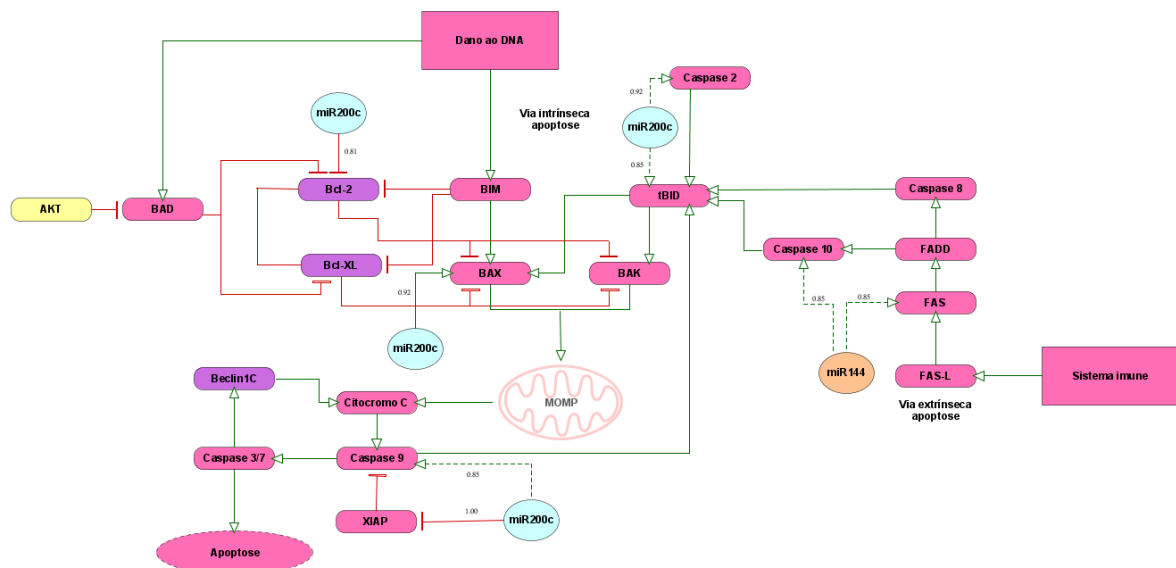
Figura 7 – Interações de miR-144 na via de apoptose



Os componentes da via de apoptose são representados em rosa. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura. O *target score* de cada interação pode ser observado próximo às linhas de cada interação. Imagem de fonte autoral.

Desse modo, a via de apoptose foi atualizada visando promover uma maior abrangência do processo como um todo. Enquanto a rede inicial era formada por 11 constituintes fixos, incluindo os componentes do *cross-talk* (CASP8, tBID, Calpain, BAX, citocromo C, CASP 3/7, Beclin-1C, ATG5, BCL2 e BCL-xL), a rede aprimorada possui 18 componentes (FAS-L, FAS, FADD, caspase 8, caspase 10, caspase 2, tBID, BAK, BAX, BIM, BAD, BCL2, BCL-xL, citocromo C, caspase 9, XIAP, Beclin-1C e caspase 3/7), além de englobar também a via de apoptose extrínseca, que antes não era considerada. A via de apoptose atualizada pode ser observada na **Figura 8**.

Figura 8 – Via de apoptose



A cor rosa demonstra a via de apoptose; e roxo representa os componentes presentes simultaneamente nas vias de autofagia e apoptose. A cor amarela indica a via de PI3K/AKT/mTOR. O miR-144 é apontado em laranja, e o miR-200c em ciano. Os *inputs* estão representados nos retângulos, e *output* (apoptose) é representado em elipse. As linhas verdes são representativas de ativação, enquanto as vermelhas representam inibição. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura, e linhas sólidas representam o oposto. O *target score* de cada interação entre alvo e miRNA pode ser observado ao lado. Imagem de fonte autoral.

5.1.2 Via de autofagia

Para atualização da via de autofagia, um procedimento idêntico ao anteriormente descrito para a via apoptótica foi aplicado, e as tabelas de alvos obtidos *in silico* estão disponíveis na seção de anexos, assim como a via de autofagia utilizada como base a partir da plataforma KEGG PATHWAYS (Kanehisa; Goto, 2000). Os alvos selecionados para o miR-200c estão contemplados no Quadro 4.

Quadro 4 - Genes alvo de miR-200c-3p na via de autofagia

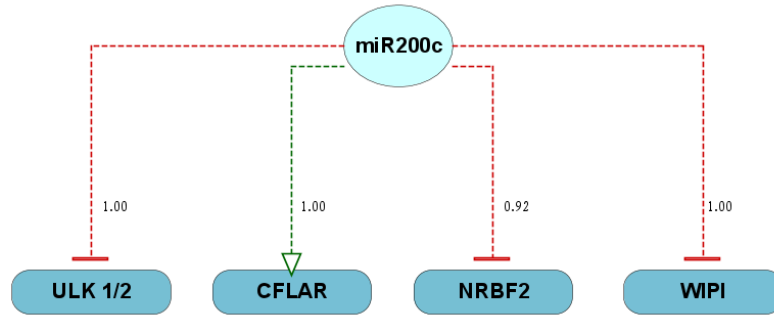
Gene	Sítio de interação com RNAm	Target score	Validação experimental
<i>CFLAR</i>	3UTR	1.00	Ausente
<i>ULK2</i>	3UTR	1.00	Ausente
<i>BECN1</i>	3UTR	0.92	Sai <i>et al.</i> (2021)
<i>WIPI1</i>	3UTR	1.00	Ausente
<i>NRBF2</i>	5UTR	0.92	Ausente

Quadro de fonte autoral.

Dados extraídos de miRWalk (Dweep; Gretz, 2015) revelaram que o miR-200c possui cinco genes alvo de grande relevância na via de autofagia, sendo eles: *CFLAR*, *ULK2*, *BECN1*, *WIPI1* e *NRBF2*. Entretanto, esses alvos não obtiveram confirmação de interação pela literatura até o momento. Um estudo publicado por Sai e colaboradores (2021) avaliou a expressão de *BECN1* após a transfecção de moléculas *mimics* desse miRNA, em células de câncer de pâncreas, entretanto, o *mimic* não foi capaz de alterar a expressão desse alvo de forma isolada. Por esse motivo, *BECN1* não será incluído como alvo do miR-200c na via.

O papel do miRNA em questão foi avaliado em um estudo realizado por Sun e colaboradores (2015), que demonstraram que o aumento dessa molécula no microambiente tumoral é responsável por reduzir a ativação autofágica induzida por radiação em modelo de câncer de mama triplo-negativo. Neste contexto, estima-se que o miR-200c seja capaz de atuar na inibição de genes promotores de autofagia, como *ULK2*, *WIPI1* e *NRBF2*; e na ativação de genes inibidores de autofagia, como *CFLAR*. As interações propostas são demonstradas na Figura 9.

Figura 9 – Interações de miR-200c na via de autofagia



Os componentes da via de autofagia são representados em azul. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura. O *target score* de cada interação pode ser observado próximo às linhas de cada interação. Imagem de fonte autoral.

Quadro 5 - Genes alvo de miR-144-3p na via de autofagia

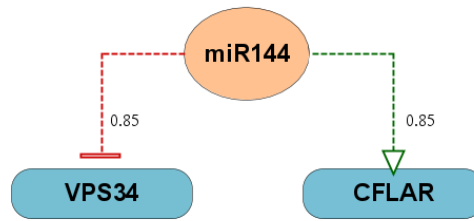
Gene	Sítio de interação com RNAm	<i>Target score</i>	Validação experimental
<i>CFLAR</i>	3UTR	0.85	Ausente
<i>PIK3C3</i>	3UTR	0.85	Ausente

Quadro de fonte autoral.

Conforme demonstrado no Quadro 5, *CFLAR* e *PIK3C3* (do inglês, *phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3*) são possíveis alvos do miR-144. Para fins de compreensão, é importante destacar que *PIK3C3* trata-se do gene codificador da proteína VPS34, presente no complexo PI3K.

Não foram encontrados dados na literatura que corroborem essas interações, entretanto, o papel do miR-144 em reduzir a ativação da via autofágica já foi descrito não somente para o câncer de mama (Ren *et al.*, 2021), como também para tumores de próstata (Gu *et al.*, 2016) e tireóide (Liu, J. *et al.*, 2018). Dessa forma, seria esperado que esse ácido nucleico atuasse na inibição de tradução de proteínas promotoras de autofagia, como *CFLAR*, e estímulo de proteínas antiautofágicas, como VPS34. Essas interações estão representadas na Figura 10.

Figura 10 – Interações de miR-144-3p na via de autofagia

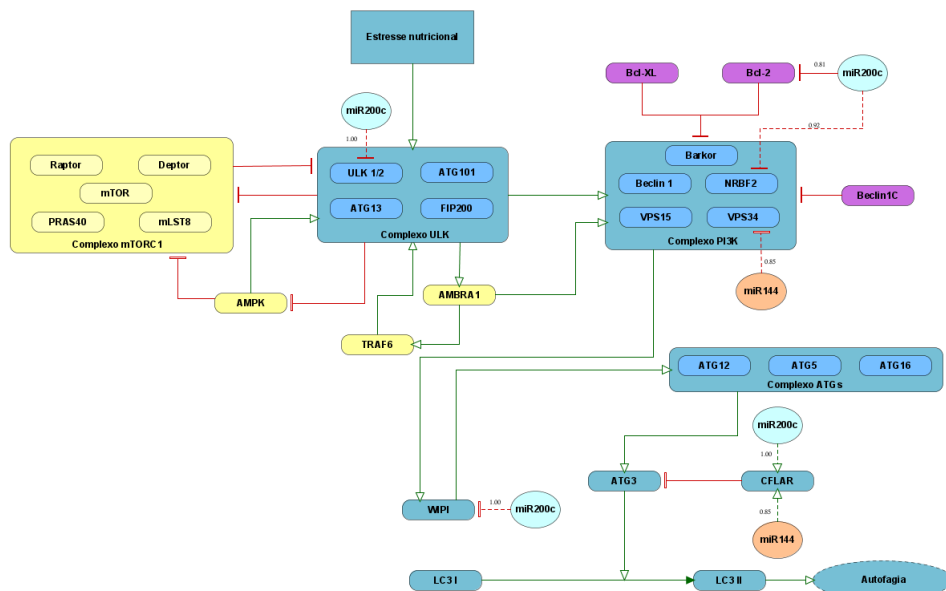


Os componentes da via de autofagia são representados em azul. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura. O *target score* de cada interação pode ser observado próximo às linhas de cada interação. Imagem de fonte autoral.

Assim, a via de autofagia atualizada está representada na Figura 11. A rede inicial era constituída de 08 componentes fixos, incluindo as proteínas de *cross-talk* (ULK, complexo PI3K, LC3, ATGs, ATG5, BCL2 e BCL-xL), enquanto a rede modificada engloba 11 componentes (complexo ULK, complexo PI3K, WIPI, complexo ATGs, ATG3, CFLAR, LC3-I, LC3-II, BCL2, BCL-xL e beclin-1C).

É importante ressaltar que a forma clivada de beclin-1 (beclin-1C), antes considerado um componente exclusivo da via de apoptose, agora é classificado como uma proteína de *cross-talk*, uma vez que é capaz de atuar em ambas as vias (Wirawan *et al.*, 2010).

Figura 11 – Via de autofagia



A cor azul demonstra a via de autofagia; e roxo representa os componentes presentes simultaneamente nas vias de autofagia e apoptose. A cor amarela indica a via de PI3K/AKT/mTOR. O miR-144 é apontado em laranja, e o miR-200c em ciano. O *input* está representado no retângulo azul, e *output* (autofagia) é representado em elipse. As linhas verdes são representativas de ativação, enquanto as vermelhas representam inibição. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura, e linhas sólidas representam o oposto. O *target score* de cada interação entre alvo e miRNA pode ser observado ao lado. Imagem de fonte autoral.

5.1.3 Via de PI3K/AKT/mTOR

Para revisão de alvos dos miR-200c e -144, novamente a base de dados miRWalk e o sistema KEGG PATHWAYS foram aplicados, e os resultados dessas ferramentas estão contidos na seção de anexos, itens G, H e I.

O Quadro 6 ilustra as interações encontradas para o miR-200c na via de PI3K/AKT/mTOR. Os genes *TSC1*, *TSC2*, *PTEN*, *TRAF6*, *AKT3*, *AKT2* e *PIK3CB* (do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta*), que constitui a isoforma catalítica beta de PI3K, foram designados alvos de interesse.

Quadro 6 - Genes alvo de miR-200c-3p na via de PI3K/AKT/mTOR

Gene	Sítio de interação com RNAm	Target score	Validação experimental
<i>TSC1</i>	3UTR	1.00	Ausente
<i>TSC2</i>	5UTR	1.00	Ausente
<i>PTEN</i>	3UTR	1.00	Ghasabi <i>et al.</i> (2019), Chen <i>et al.</i> (2013), Soubani <i>et al.</i> (2012)
<i>TRAF6</i>	3UTR	1.00	Ausente
<i>AKT3</i>	3UTR	0.85	Ausente
<i>AKT2</i>	3UTR	0.92	Wu <i>et al.</i> (2019), Liu <i>et al.</i> (2017), Zhang <i>et al.</i> (2017)
<i>PIK3CB*</i>	5UTR	0.92	Ausente

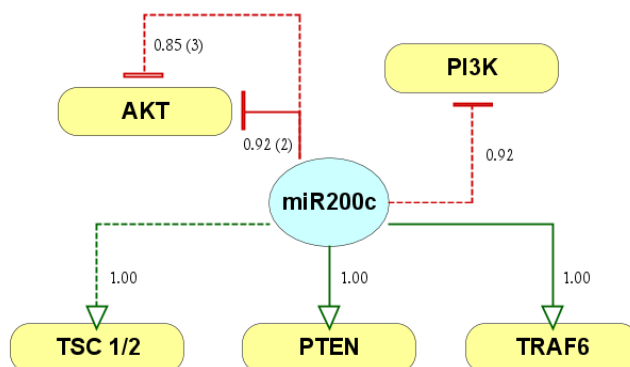
*Isoforma catalítica beta de PI3K. Quadro de fonte autoral.

Semelhante ao observado para as outras vias, poucas interações entre miRNA e RNAm alvo foram confirmadas por meio da literatura existente até o momento, e os genes *TSC1* e *2*, *TRAF6*, *AKT3* e *PIK3CB* não apresentaram evidências experimentais. Todavia, o papel desse miRNA na supressão de crescimento e proliferação celular parece bem estabelecido em TNBC (Garrido-Cano *et al.*, 2023; Simpson *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2015; Zhang, D. D. *et al.*, 2019).

Estudos revelaram que o miR-200c é capaz de reduzir o crescimento celular por meio do aumento de expressão de *PTEN* em câncer de mama (Chen *et al.*, 2013), gástrico (Ghasabi *et al.*, 2019) e de pâncreas (Soubani *et al.*, 2012). Ainda, evidências que corroboram a diminuição de expressão *AKT2* na presença desse miRNA foram relatadas para o TNBC

(Zhang *et al.*, 2017), câncer de bexiga (Wu *et al.*, 2019) e osteossarcoma (Liu *et al.*, 2017), reforçando o papel supressor tumoral desse ácido nucleico. As interações previstas são representadas na Figura 12.

Figura 12 – Interações de miR-200c na via de PI3K/AKT/mTOR



Os componentes da via de PI3K/AKT/mTOR são representados em amarelo. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura. O *target score* de cada interação pode ser observado próximo às linhas de cada interação, e os números entre parênteses indicam a isoforma da proteína. Imagem de fonte autoral.

Conforme ilustrado no Quadro 7 miR-144 demonstrou possível atuação na expressão dos genes *AKT3*, *EGFR* e *IRS1* segundo análises *in silico*. Um estudo publicado por Ma e colaboradores (2015) demonstrou a ação desse miRNA na inibição da expressão do gene *AKT3*, tanto em nível de RNAm, quanto em nível de sua proteína homônima AKT3 em células de hepatocarcinoma. Em relação a *IRS1*, dois artigos demonstraram a capacidade do miR-144 em inibir a expressão desse alvo, sendo que a utilização do inibidor do miRNA foi capaz de exercer o efeito oposto (Karolina *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016).

Quadro 7 - Target genes of miR-144-3p in the apoptosis pathway

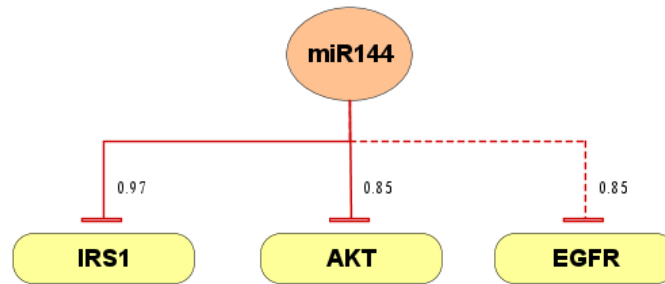
Gene	Sítio de interação com RNAm	Target score	Validação experimental
<i>AKT3</i>	3UTR	0.85	Ma <i>et al.</i> (2015)
<i>EGFR</i>	3UTR	0.85	Ausente
<i>IRS1</i>	3UTR	0.97	Wu <i>et al.</i> (2016), Karolina <i>et al.</i> (2011)

Quadro de fonte autoral.

Wang e colaboradores (2020) relataram que a inibição de miR-144 no microambiente tumoral de câncer de esôfago foi capaz de aumentar a expressão de EGFR. Apesar de ser

provável que o uso de uma molécula mimética seja capaz de realizar o processo inverso, esse parâmetro não foi avaliado. Portanto, essa interação foi considerada como não validada pela literatura até o momento. Um resumo das interações previstas é ilustrado na Figura 13.

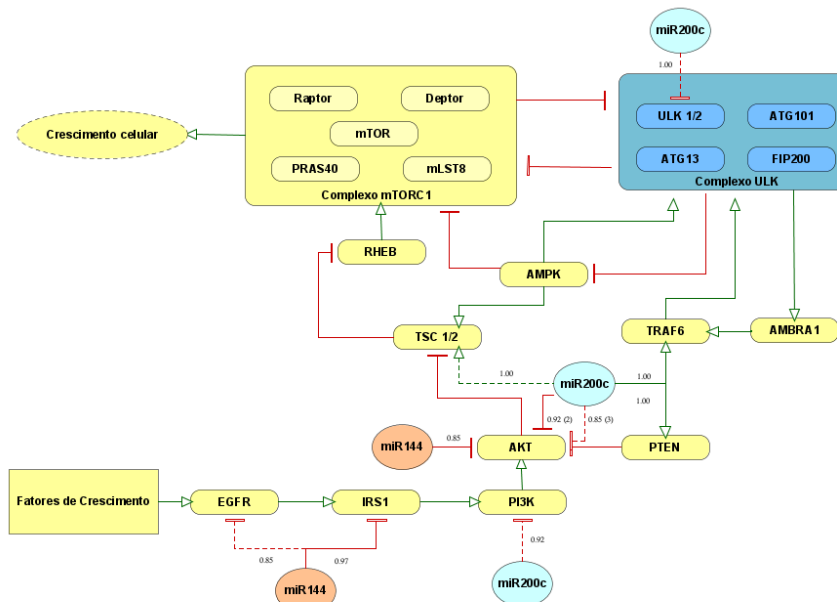
Figura 13 – Interações de miR-144-3p na via de PI3K/AKT/mTOR



Os componentes da via de PI3K/AKT/mTOR são representados em amarelo. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura. O *target score* de cada interação pode ser observado próximo às linhas de cada interação. Imagem de fonte autoral.

A rede de PI3K/AKT/mTOR, inicialmente formada por 09 componentes fixos (PI3K, AKT, PTEN, TSC 1/2, AMPK, RHEB, complexo mTORC1, TRAF6 e AMBRA1), foi atualizada para abranger 11 constituintes permanentes a partir da adição das proteínas EGFR e IRS1 à via. O resultado final pode ser consultado na Figura 14.

Figura 14 – Via de PI3K/AKT/mTOR

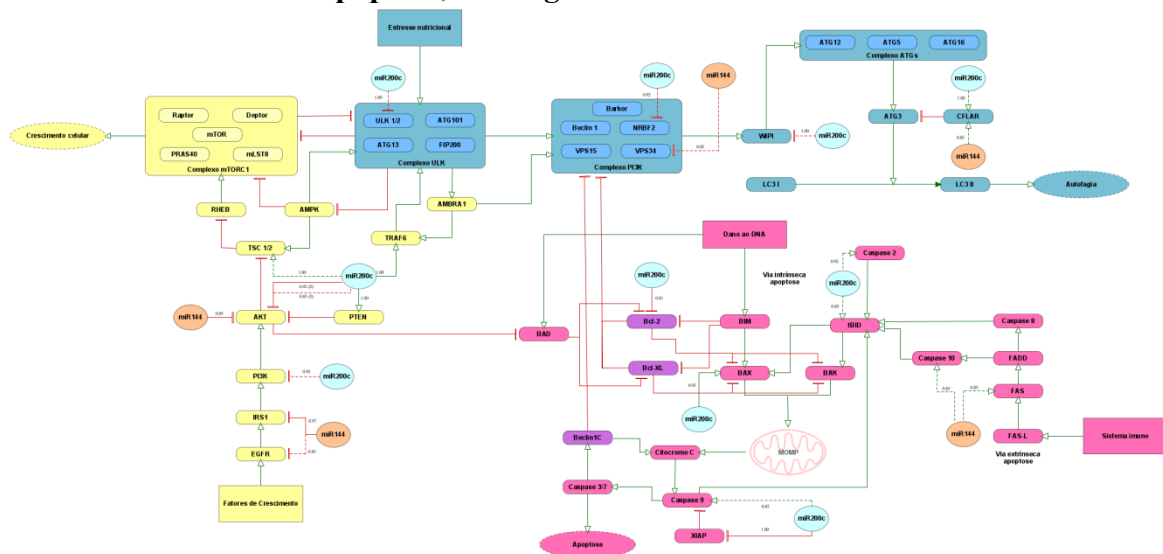


A cor amarela demonstra a via de PI3K/AKT/mTOR; e azul representa a via de autofagia. O miR-144 é apontado em laranja, e o miR-200c em ciano. O *input* está representado no retângulo amarelo, e *output* (crescimento celular) é representado em elipse. As linhas verdes são representativas de ativação, enquanto as vermelhas representam inibição. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura, e linhas sólidas representam o oposto. O *target score* de cada interação entre alvo e miRNA pode ser observado ao lado. Imagem de fonte autoral.

5.1.4 Rede regulatória

A rede regulatória atualizada completa está ilustrada na Figura 15. Conforme demonstrado anteriormente, os componentes estão organizados por cor, sendo que rosa representa a via de apoptose, azul ilustra a via de autofagia e roxo abrange os componentes do *cross-talk*, que estão presentes simultaneamente em ambas as vias. Amarelo compreende a via de PI3K/AKT/mTOR. Os *inputs* são representados pelos retângulos, e os *outputs* pelas elipses. O miR-200c-3p é ilustrado em ciano, e miR-144-3p em laranja. As interações são divididas entre estímulo e inibição, demonstradas em verde e vermelho, respectivamente. Ainda, linhas tracejadas indicam interações previstas *in silico* não confirmadas experimentalmente até o momento, enquanto linhas sólidas compreendem interações respaldadas pela literatura. Para todas as interações envolvendo miRNA, a medida de *target score* foi representada ao lado.

Figura 15 – Rede regulatória atualizada representando componentes das vias de apoptose, autofagia e PI3K/AKT/mTOR



A cor azul representa componentes da via de autofagia; rosa demonstra a via de apoptose; e roxo representa os componentes presentes simultaneamente nas vias de autofagia e apoptose. A cor amarela indica a via de PI3K/AKT/mTOR. O miR-144 é apontado em laranja, e o miR-200c em ciano. Os *outputs* e *inputs* de cada via são representados por elipses e retângulos, respectivamente. As linhas verdes são representativas de ativação, enquanto as vermelhas representam inibição. Linhas tracejadas demonstram interações não respaldadas pela literatura, e linhas sólidas representam o oposto. O *target score* de cada interação entre alvo e miRNA pode ser observado ao lado. Imagem de fonte autoral.

Conforme discutido anteriormente, Issler (2021) definiu que cada via é ativada por *inputs* que irão conduzir à execução dos *outputs*, ou seja, os destinos celulares de apoptose, autofagia ou crescimento celular. Neste contexto, a via de sinalização de apoptose pode ser

ativada através dos *inputs* ‘sistema imune’ e ‘dano ao DNA’, que estimulam a forma extrínseca e intrínseca da via de apoptose, respectivamente, e a conclusão desse processo ocorre com a ativação do *output* ‘apoptose’. Já a via de autofagia é ativada por meio do *input* ‘estresse nutricional’, e conduz ao *output* ‘autofagia’. Semelhantemente, a via de PI3K/AKT/mTOR é estimulada a partir do *input* ‘fatores de crescimento’, que irá ativar uma série de proteínas até atingir o desfecho com o *output* ‘crescimento celular’. Os miRNA são considerados *inputs* e podem modificar o *output* obtido. A descrição completa de todos os constituintes da rede regulatória é ilustrada no Quadro 8.

Quadro 8 – Descrição dos componentes atualizados da rede regulatória

(continua)

Componente	Descrição	Função
Estresse nutricional	Estresse nutricional	Ativa a via de autofagia através de complexo ULK
Estresse ao DNA	Estresse ao DNA	Ativa a via de apoptose intrínseca através de BIM e BAD
Sistema imune	Linfócitos T e NK	Ativa a via de apoptose extrínseca através de FAS-L
Fatores de crescimento	Fatores de crescimento ligantes de EGFR	Ativa a via de PI3K/AKT/mTOR através de EGFR
miR200c	microRNA-200c-3p	Inibe <i>PI3K</i> , <i>AKT</i> , <i>complexo ULK</i> , <i>complexo PI3K</i> , <i>WIPI</i> , <i>BCL2</i> e <i>XIAP</i> . Ativa <i>PTEN</i> , <i>TSC 1/2</i> , <i>TRAF6</i> , <i>caspase 2</i> , <i>tBID</i> , <i>BAX</i> , <i>Caspase 9</i> e <i>CFLAR</i> .
miR144	microRNA-144-3p	Inibe <i>EGFR</i> , <i>IRS1</i> , <i>AKT</i> , <i>caspase 10</i> e <i>FAS</i> . Ativa <i>CFLAR</i> .
EGFR	Proteína EGFR	Ativa <i>IRS1</i>
IRS1	Proteína <i>IRS1</i>	Ativa <i>PI3K</i>
PI3K	Proteína <i>PIK3CB</i>	Ativa <i>AKT</i>
AKT	Proteínas <i>AKT2</i> e <i>AKT3</i>	Inibe <i>TSC 1/2</i> e <i>BAD</i>
PTEN	Proteína <i>PTEN</i>	Inibe <i>AKT</i>
TSC 1/2	Proteínas <i>TSC1</i> e <i>TSC2</i>	Inibe <i>RHEB</i>
RHEB	Proteína <i>RHEB</i>	Ativa complexo <i>mTORC1</i>
AMPK	Proteína <i>AMPK</i>	Inibe complexo <i>mTORC1</i> . Ativa <i>TSC 1/2</i> e complexo <i>ULK</i>
Complexo <i>mTORC1</i>	Proteínas <i>Raptor</i> , <i>Deptor</i> ,	Inibe complexo <i>ULK</i> e ativa o <i>output</i>

Quadro 8 – Descrição dos componentes atualizados da rede regulatória**(continua)**

Componente	Descrição	Função
	mTOR, PRAS40 e mLST8	de crescimento celular
TRAF6	Proteína TRAF6	Ativa o complexo ULK
AMBRA1	Proteína AMBRA1	Ativa TRAF6 e complexo PI3K
Complexo ULK	Proteínas ULK 1/2, ATG101, ATG13, FIP200	Inibe complexo mTORC1 e AMPK. Ativa o complexo PI3K e AMBRA1
Complexo PI3K	Proteínas Barkor, Beclin1, NRBF2, VPS15 e VPS34	Ativa WIPI
WIPI	Proteína WIPI1	Ativa o complexo ATGs
Complexo ATGs	Proteínas ATG12, ATG5 e ATG16	Ativa ATG3
CFLAR	Proteína CFLAR	Inibe ATG3
ATG3	Proteína ATG3	Ativa conversão de LC3 I em LC3 II
LC3 I	Proteína LC3 I	Forma citosólica inativa de LC3
LC3 II	Proteína LC3 II	Forma ativa de LC3 que promove ativação do <i>output</i> autofagia
FAS-L	Proteína ligante do receptor de morte celular Fas	Ativa FAS
FAS	Receptor de morte celular	Ativa FADD
FADD	Proteína FADD	Ativa caspase 8 e caspase 10
Caspase 8	Proteína caspase 8	Ativa tBID
Caspase 10	Proteína caspase 10	Ativa tBID e caspase 3/7
Caspase 2	Proteína caspase 2	Ativa tBID
Caspase 9	Proteína caspase 9	Ativa tBID e caspase 3/7
tBID	Proteína BID truncada	Ativa BAX e BAK
BAX	Proteína BAX	Ativa liberação de citocromo C
BAK	Proteína BAK	Ativa liberação de citocromo C
BCL-2	Proteína BCL-2	Inibe complexo PI3K, BAX e BAK
BCL-xL	Proteína BCL-xL	Inibe complexo PI3K, BAX e BAK
BAD	Proteína BAD	Inibe BCL2 e BCL-xL
BIM	Proteína BIM	Inibe BCL2 e BCL-xL. Ativa BAX
XIAP	Proteína XIAP	Inibe caspase 9
Citocromo C	Proteína citocromo C	Ativa caspase 9
Beclin1C	Proteína Beclin1 clivada	Inibe complexo PI3K. Ativa liberação de citocromo C

Quadro 8 – Descrição dos componentes atualizados da rede regulatória

(continua)

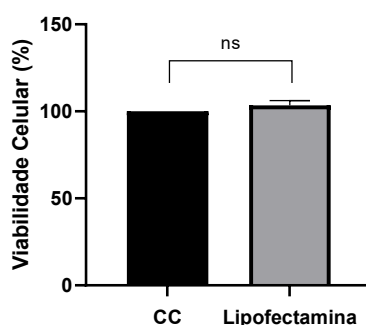
Componente	Descrição	Função
Caspase 3/7	Proteínas caspase 3 e caspase 7	Ativa Beclin1C e o <i>output</i> apoptose
Crescimento	<i>Output</i> que representa o crescimento celular	Regulado pela via de PI3K/AKT/mTORC1
Autofagia	<i>Output</i> que representa autofagia	Regulado pela via de autofagia
Apoptose	<i>Output</i> que representa apoptose	Regulado pela via de apoptose

Quadro de fonte autoral.

5.2 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAIMAX

Para avaliação de citotoxicidade da Lipofectamina® na linhagem celular MDA-MB-231, as células foram expostas ao reagente durante 48 h, seguidas de avaliação de viabilidade celular através do ensaio de MTT. Conforme demonstrado na Figura 16, o lipossoma não provocou alteração de viabilidade celular durante todo o período de incubação, apresentando-se como um carreador não tóxico para a linhagem tumoral selecionada.

Figura 16 - Avaliação de citotoxicidade de Lipofectamina® em MDA-MB-231

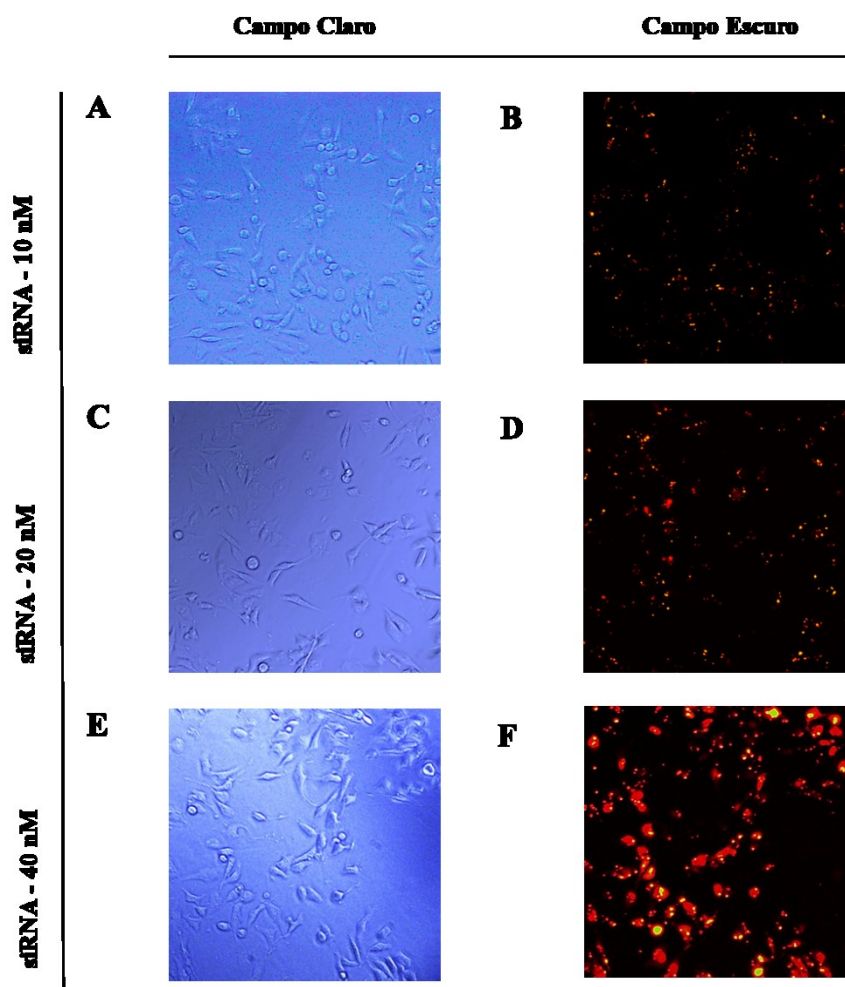


Avaliação da viabilidade celular (%) de MDA-MB-231 após exposição ao meio de cultura (controle) ou à Lipofectamina® RNAiMAX durante 48 h, determinada pelo método de MTT. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) relativa ao controle.

Após a avaliação de citotoxicidade, torna-se necessário o estabelecimento da eficiência de transfecção do carreador na linhagem celular de interesse. Para este fim,

utilizou-se o reagente *BLOCK-iT® Alexa Fluor® Red Fluorescent Control*, que se trata de um siRNA não homólogo a qualquer gene humano conhecido, associado a um composto fluorescente (Alexa Fluor® 555). Dessa forma, a transfecção celular foi realizada utilizando o siRNA em concentrações de 10, 20 e 40 nM. Os resultados foram obtidos em microscópio de fluorescência com filtro de emissão 555/580 nm, após 48 h de incubação. Conforme demonstrado na Figura 17, é possível observar que houve internalização dos ácidos nucleicos desde a menor concentração aplicada, de 10 nM, correspondente ao indicado pela intensidade de fluorescência observada. Ainda, é possível observar um aumento da intensidade de fluorescência compatível com o aumento de concentração do siRNA, indicando uma entrega proporcional de material.

Figura 17 - Eficiência de transfecção da Lipofectamina®



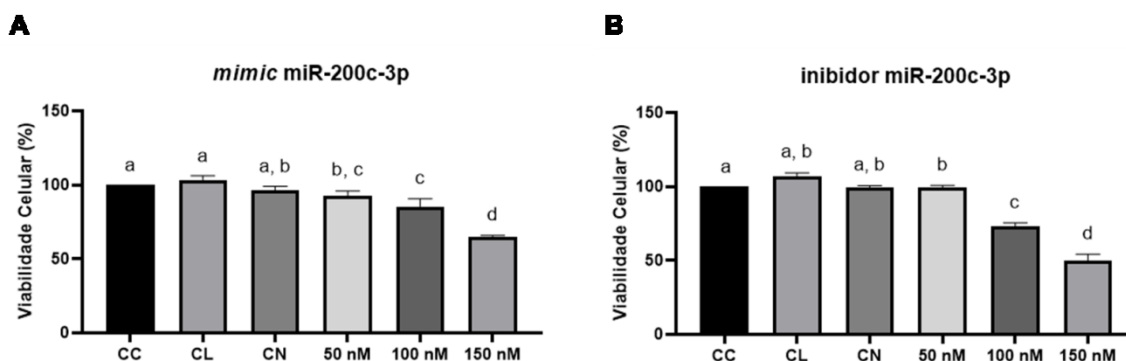
Eficiência de transfecção da Lipofectamina® RNAiMAX em linhagem MDA-MB-231 observada através de transfecção do siRNA *BLOCK-iT® Alexa Fluor® Red Fluorescent Control* nas concentrações de 10 (A, B), 20 (C, D) e 40 nM (E, F). Imagens em campo claro (coluna da esquerda) e escuro (coluna da direita).

Considerando os resultados de citotoxicidade e eficiência de transfecção obtidos para a Lipofectamina®, a mesma foi considerada um carreador adequado para transfecção na linhagem tumoral selecionada.

5.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRANSFEÇÃO DOS *MIMICS* E INIBIDORES DE MIR-144-3P E MIR-200C-3P

Para determinação de viabilidade celular após transfecção com os *mimics* e inibidores de cada miRNA, o ensaio de MTT foi utilizado. Nesse sentido, concentrações de 50, 100 e 150 nM foram definidas para todas moléculas testadas, e após 48 h de incubação os resultados de conversão do MTT à formazan foram lidos em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 540 nm.

Figura 18 – Viabilidade celular após transfecção de *mimic* e inibidor de miR-200c-3p

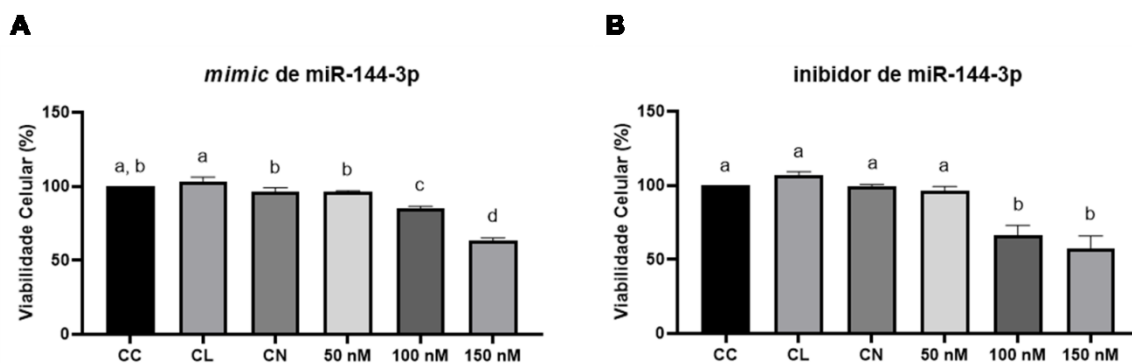


Viabilidade celular (%) 48 h após transfecção utilizando 50, 100 e 150 nM de miR-200c-3p *mimic* (A) e inibidor (B). CC: Células expostas somente ao meio de cultivo; CL: Controle Lipofectamina® *mock*; CN: miRNA *scramble* 150 nM. As letras acima das barras indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0,05$), $n = 3$.

Conforme ilustrado na Figura 18A, a transfecção de *mimic* de miR-200c-3p foi capaz de promover a redução de viabilidade da linhagem MDA-MB-231. Esse efeito foi proeminente principalmente a partir de 100 e 150 nM, apresentando viabilidade média de 85,48 e 65,09 ± 2,44%, respectivamente.

Surpreendentemente, o uso de inibidor de miR-200c-3p promoveu redução de viabilidade celular nas concentrações de 100 e 150 nM, com $72,92$ e $49,59 \pm 2,06\%$ de células viáveis para cada respectiva concentração (Figura 18B).

Figura 19 – Viabilidade celular após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-144-3p



Viabilidade celular (%) 48 h após transfecção utilizando 50, 100 e 150 nM de miR-144-3p *mimic* (A) e inibidor (B). CC: Células expostas somente ao meio de cultivo; CL: Controle Lipofectamina® *mock*; CN: miRNA *scramble* 150 nM. As letras acima das barras indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0,05$), $n = 3$.

Semelhantemente ao observado para o *mimic* de miR-200c, a transfecção de *mimic* de miR-144-3p demonstrou capacidade em reduzir a viabilidade celular nas concentrações de 100 e 150 nM, apresentando uma viabilidade média de $85,23$ e $63,16 \pm 1,57\%$, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 19A. Por outro lado, o inibidor desse miRNA também foi capaz de promover perda de viabilidade celular em concentrações semelhantes, com média de $66,51 \pm 3,79\%$ após exposição a 100 nM do inibidor, e $57,28 \pm 3,79\%$ posteriormente à incubação com 150 nM (Figura 19B).

Considerando os resultados aqui obtidos, a concentração de 150 nM de *mimics* e inibidores dos miRNA foi selecionada para continuidade desse trabalho.

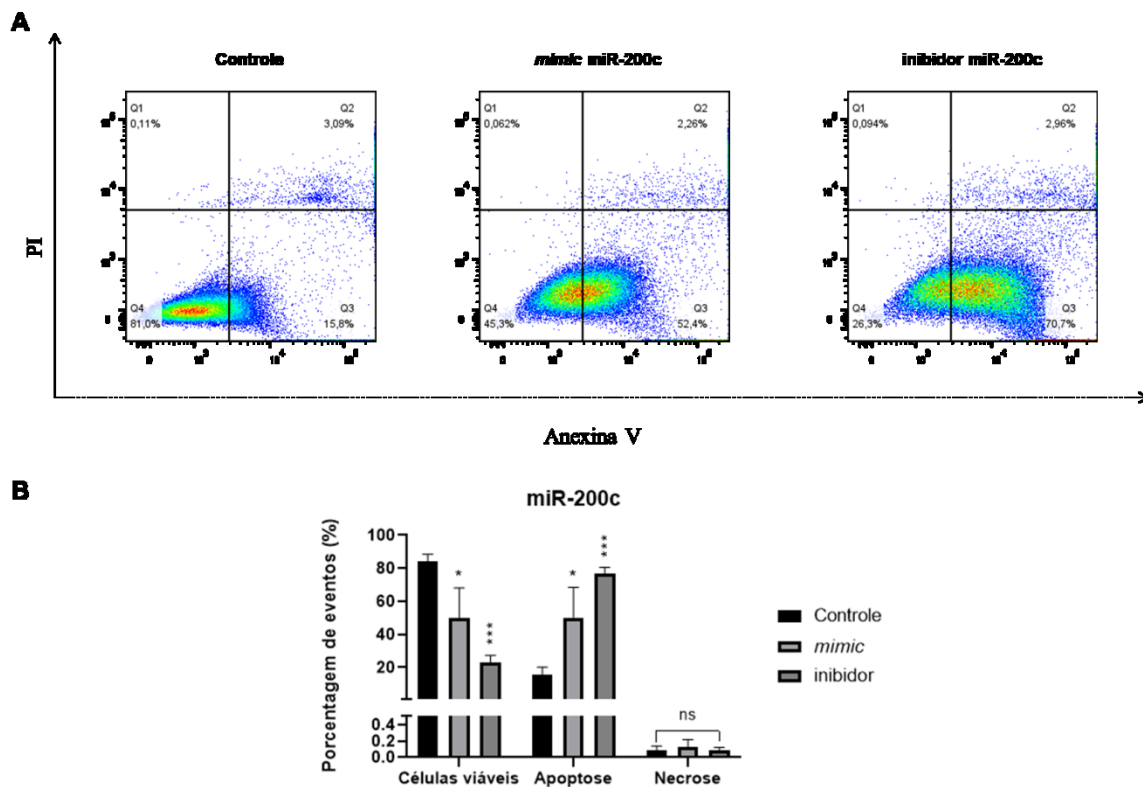
5.4 ENSAIO DE ANEXINA V-FITC/IODETO DE PROPÍDEO

O ensaio de anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) foi utilizado para determinação de morte celular por apoptose nas células expostas aos *mimics* ou inibidores de miR-200c ou miR-144. Neste contexto, células marcadas isoladamente com anexina V ou simultaneamente com anexina V e PI foram consideradas apoptóticas, uma vez que a exposição dos resíduos de fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*), que se ligam à

anexina V, é considerada uma característica de apoptose (Bacso *et al.*, 2000; Vermes *et al.*, 1995). Por outro lado, populações celulares marcadas com PI foram consideradas como necróticas, visto que se trata de um intercalante fluorescente de DNA que depende da perda de integridade de membrana citoplasmática e nuclear para marcação (Vermes *et al.*, 2000).

A exposição da linhagem de TNBC ao *mimic* de miR-200c foi capaz de promover apoptose em uma média de $50,15 \pm 9,06\%$ dos eventos. Surpreendentemente, o uso de inibidor desse miRNA foi capaz de desencadear a exposição dos resíduos de PS em $76,60 \pm 9,06\%$ (Figura 20).

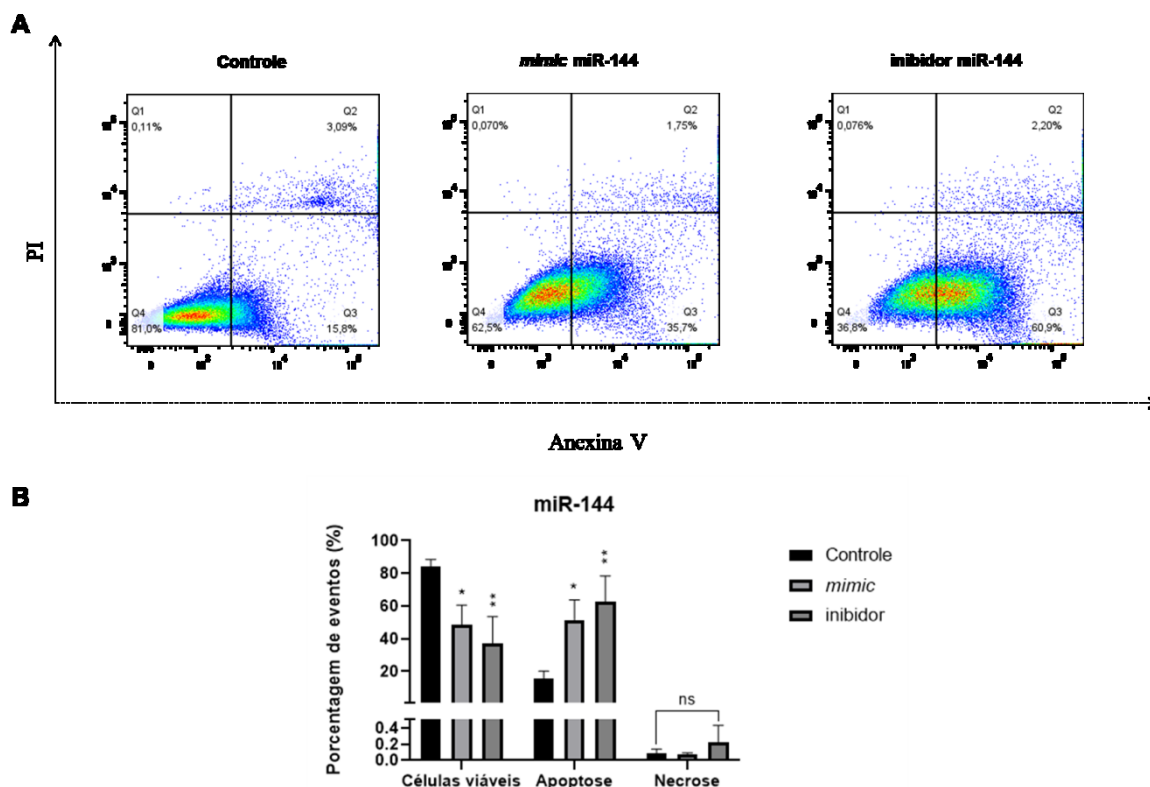
Figura 20 – Ensaio de anexina V-FITC/ iodeto de propídeo para *mimic* e inibidor de miR-200c-3p



Ensaio para determinação de morte celular por apoptose e necrose 48 h após transfecção utilizando 150 nM de miR-200c-3p *mimic* ou inibidor. * $p < 0,05$, *** $p < 0.001$, $n = 3$.

Já a exposição dessa linhagem celular às moléculas *mimic* de miR-144 demonstrou $51,52 \pm 9,68\%$ de resposta característica de apoptose. Novamente, o inibidor foi capaz de promover uma resposta de morte com externalização dos resíduos de PS ainda maior, caracterizando $62,48 \pm 9,68\%$ (Figura 21).

Figura 21 – Ensaio de Anexina V-FITC/ iodeto de propídeo para *mimic* e inibidor de miR-144-3p



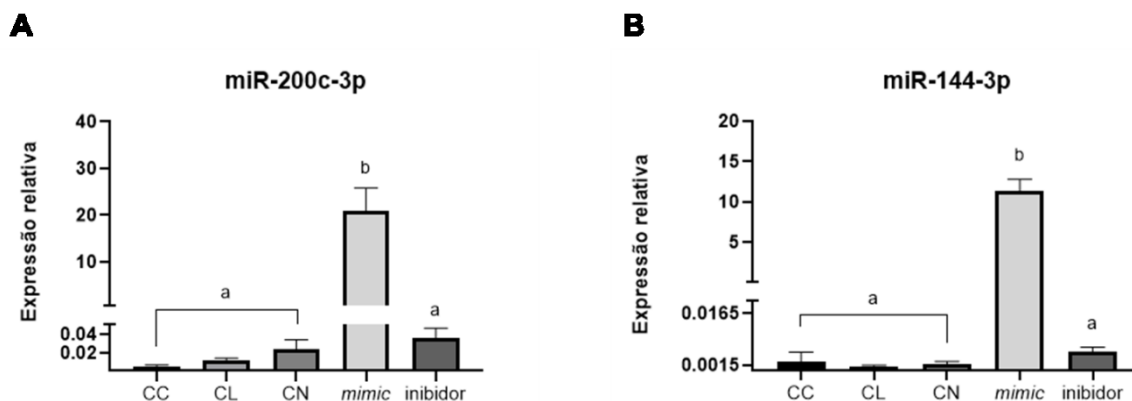
Ensaio para determinação de morte celular por apoptose e necrose 48 h após transfecção utilizando 150 nM de miR-144-3p *mimic* ou inibidor. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 3$.

5.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

5.5.1 RT-qPCR para detecção do conteúdo de miR-200c-3p e miR-144-3p

Para confirmar a modificação intracelular do conteúdo dos miRNA de interesse após a transfecção dos respectivos *mimics* e inibidores, a técnica de RT-qPCR foi aplicada. Os resultados estão contidos na Figura 22. Conforme representado abaixo, o uso de *mimics* para ambos os miRNA testados foram capazes de promover aumento nas respectivas expressões. Dessa forma, para miR-200c-3p houve regulação positiva da expressão relativa a U6 de $20,86 \pm 1,80$ após transfecção da molécula mimética; enquanto para miR-144-3p observou-se um aumento de $11,34 \pm 0,53$. Curiosamente, os inibidores dos miRNA não foram capazes de promover redução no conteúdo dos seus respectivos alvos.

Figura 22 – Conteúdo de miRNA após transfecção com *mimics* e inibidores



Ensaio para determinação de modificação do conteúdo dos miRNA 48 h após transfecção utilizando 150 nM de *mimic* ou inibidor de miR-200c-3p (A) miR-144-3p (B). Dados normalizados a partir da expressão de U6 pelo método de $2^{-\Delta C_t}$. CC: Células expostas somente ao meio de cultivo; CL: Controle Lipofectamina® *mock*; CN: miRNA *scramble* 150 nM. As letras acima das barras indicam grupos estatisticamente distintos. 'b' $p < 0,05$, $n = 3$.

5.5.2 RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-200c-3p

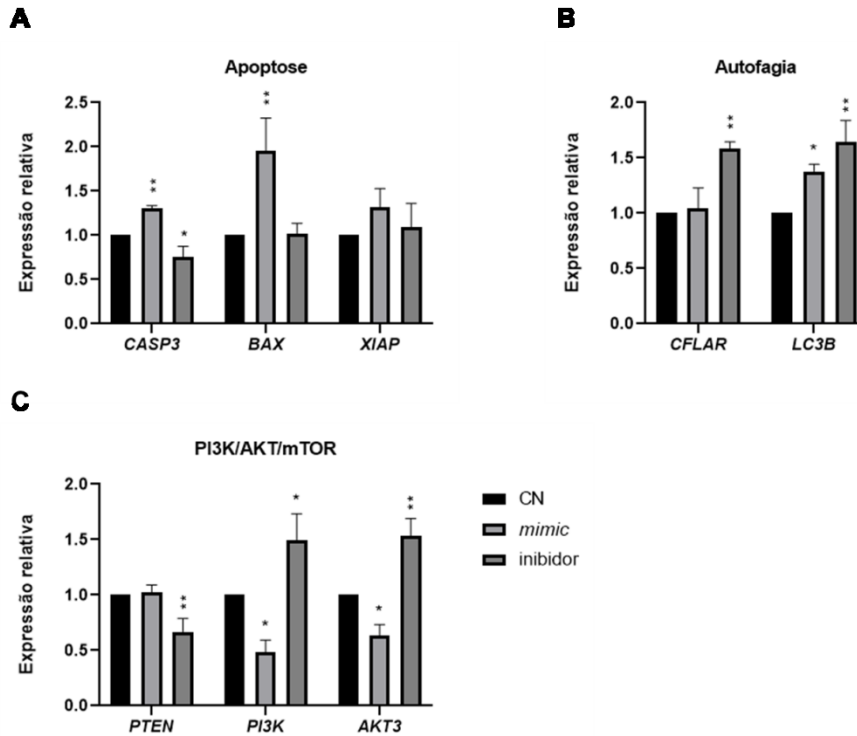
Para avaliação da atividade de miR-200c-3p, foram escolhidos alvos representantes das vias de apoptose, autofagia e crescimento celular a partir das interações descritas nos itens 5.1.1, 5.1.2 e 5.1.3 deste trabalho. Dessa forma, os genes alvo da via de apoptose *BAX* e *XIAP* foram selecionados, além de *CFLAR*, da via autofágica; e *PTEN*, *PI3K* e *AKT3*, da via PI3K/AKT/mTOR. Adicionalmente, *CASP3* e *LC3B* foram avaliados, uma vez que tratam-se de dois dos principais genes relacionados com o processo de apoptose e autofagia, respectivamente.

De acordo com a Figura 23, é possível observar que o *mimic* de miR-200c-3p foi capaz de aumentar a expressão relativa dos alvos *CASP3* e *BAX* da via de apoptose, com valor de *fold change* de $1,31 \pm 0,06$ e $1,95 \pm 0,18$, respectivamente. A expressão de *XIAP* não foi modificada. Em contrapartida, a expressão de *LC3B* foi aumentada em $1,38 \pm 0,09$. Já na via de PI3K/AKT/mTOR, observou-se diminuição da expressão de *PI3K* e *AKT3*, com os respectivos valores de *fold change* de $0,48 \pm 0,12$ e $0,63 \pm 0,08$; Todavia, a expressão de *PTEN* não apresentou alteração.

Em relação ao inibidor de miR-200c, foi observado o oposto do visto para *CASP3* com a transfecção de *mimic*, contemplando-se uma redução de expressão gênica de $0,75 \pm 0,06$. Os demais alvos da via de apoptose não foram modificados quando comparados ao controle. Na via de autofagia, foi constatada modulação positiva dos genes *CFLAR* e *LC3B*, com valores de *fold change* de $1,58 \pm 0,09$ para o primeiro, e $1,64 \pm 0,09$ para o último. Por

fim, observou-se alteração na expressão de todos os alvos avaliados para a via de crescimento celular, com redução na expressão de *PTEN* ($0,66 \pm 0,06$) e aumento de *PI3K* ($1,49 \pm 0,12$) e *AKT3* ($1,53 \pm 0,08$).

Figura 23 – Resultado de RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-200c-3p



Determinação de modificação de expressão gênica por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-200c-3p nas vias de apoptose (A), autofagia (B) e PI3K/AKT/mTOR (C). Dados normalizados a partir da expressão de GAPDH, cálculo de *fold change* pelo método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$. CN: miRNA *scramble* 150 nM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 3$.

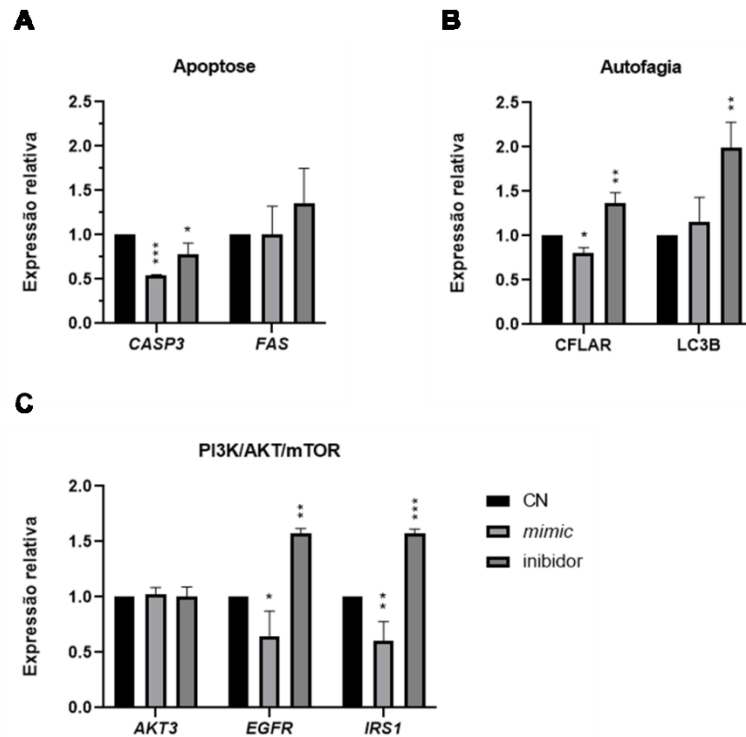
5.5.3 RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-144-3p

Para fins de análise do papel de miR-144-3p nas vias de apoptose, autofagia e PI3K/AKT/mTOR, os dados apresentados nos itens 5.1.1, 5.1.2 e 5.1.3 do presente trabalho foram aplicados para seleção de um conjunto de alvos a serem validados experimentalmente. Assim, *FAS* foi selecionado para a via de apoptose; *CFLAR* para a via de autofagia, e *AKT3*, *EGFR* e *IRS1* para a via de crescimento celular. Novamente, avaliou-se também *CASP3* e *LC3B*, uma vez que se tratam de dois dos principais genes relacionados com os destinos celulares de interesse.

De acordo com a Figura 24, o *mimic* de miR-144-3p promoveu diminuição da expressão de *CASP3*, com uma média de *fold change* de $0,54 \pm 0,06$. Adicionalmente, esse *mimic* também demonstrou a capacidade de regulação negativa do alvo da via de autofagia, atuando em *CFLAR*, com expressão relativa de $0,80 \pm 0,06$. Na via de crescimento celular, foi observada alteração de expressão em *EGFR* e *IRS1*, com respectivas médias de $0,64 \pm 0,10$ e $0,60 \pm 0,08$.

De maneira interessante, o uso de inibidor desse miRNA promoveu uma regulação negativa de *CASP3*, de forma semelhante ao respectivo *mimic*, apesar de menos intensa, representando uma expressão relativa de $0,78 \pm 0,06$. Na via de autofagia, em relação ao alvo *CFLAR*, observou-se o oposto da resposta desencadeada com a aplicação de *mimic*, com um aumento na expressão relativa de $1,37 \pm 0,06$. Ainda, houve também aumento em nível de RNAm de *LC3B*, com *fold change* de $1,99 \pm 0,13$. Por fim, os para alvos da via PI3K/AKT/mTOR, *EGFR* e *IRS1*, o uso de inibidor de miR-144-3p foi responsável por realizar o oposto do observado para o respectivo *mimic*, desencadeando regulação positiva, com as consecutivas expressões de $1,57 \pm 0,10$ e $1,57 \pm 0,08$.

Figura 24 – Resultado de RT-qPCR para detecção de genes alvo de miR-144-3p



Determinação de modificação de expressão gênica por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-144-3p nas vias de apoptose (A), autofagia (B) e PI3K/AKT/mTOR (C). Dados normalizados a partir da expressão de GAPDH, cálculo de *fold change* pelo método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$. CN: miRNA *scramble* 150 nM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 3$.

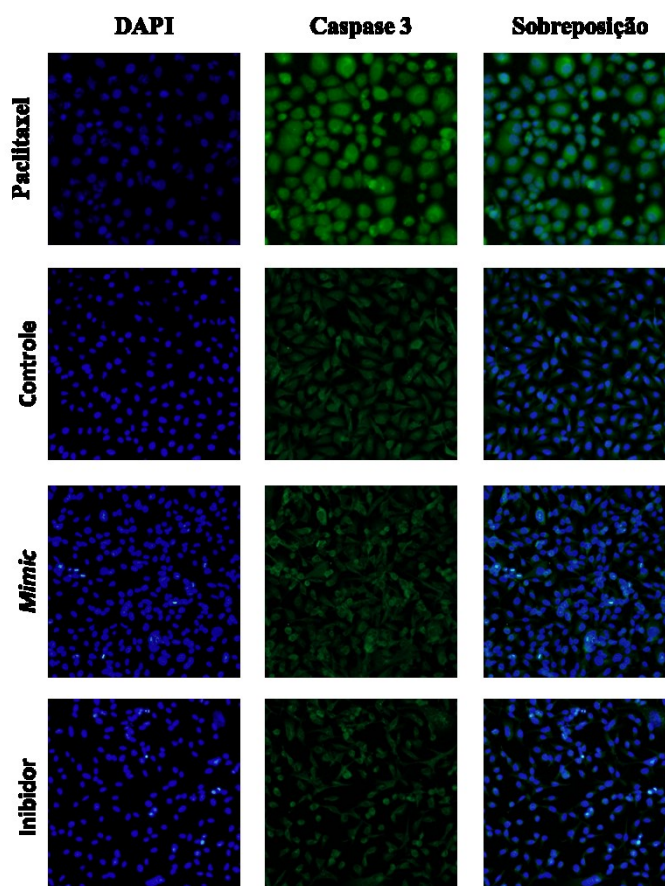
5.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para avaliação da expressão das proteínas CASP3 e LC3B, a técnica de imunofluorescência indireta foi aplicada, visando acrescentar aos dados previamente obtidos de alteração na expressão gênica por RT-qPCR.

5.6.1 Expressão das proteínas caspase 3 e LC3B após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-200c-3p

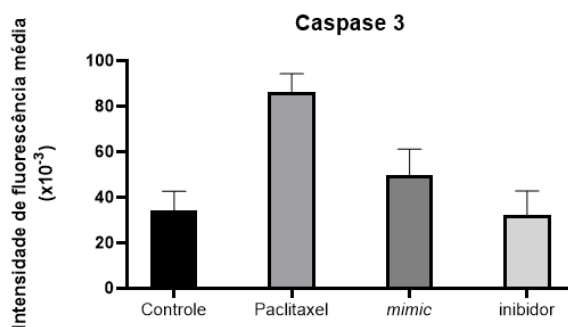
Os resultados de expressão proteica obtidos para CASP3 após transfecção do *mimic* e inibidor de miR-200c-3p são ilustrados nas Figura 25 e Figura 26. Neste contexto, o aumento no conteúdo desse miRNA promoveu um discreto aumento da proteína, confirmando o resultado obtido por RT-qPCR, enquanto a aplicação de inibidor não promoveu modificação de expressão da proteína.

Figura 25 – Resultado de imunofluorescência de caspase 3 após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-200c-3p



Determinação de modificação de expressão da proteína caspase 3 por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-200c-3p. Núcleos foram corados com DAPI (azul), e caspase 3 com Alexa Fluor™ 488 (verde). As imagens sobrepostas são observadas a direita.

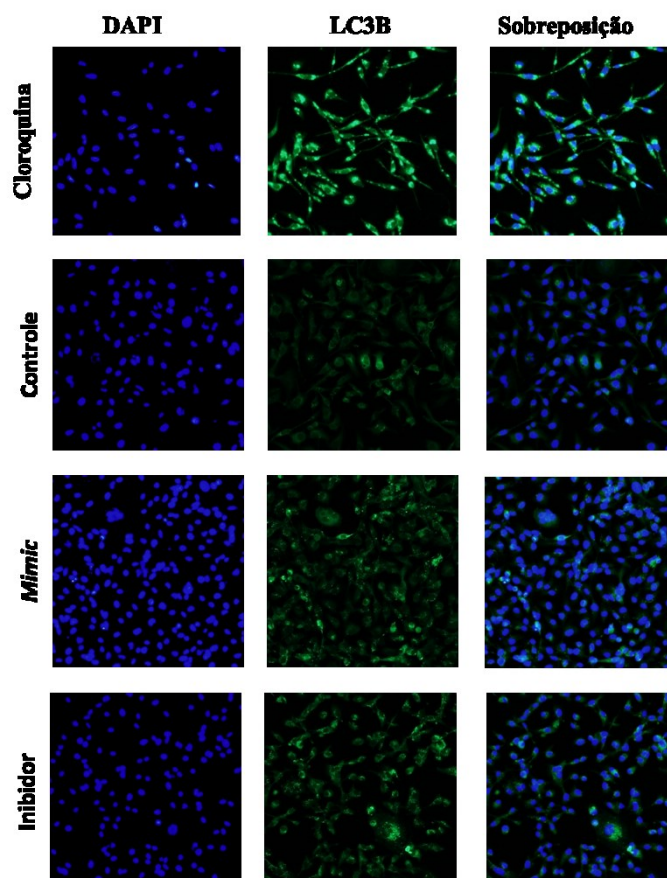
Figura 26 – Intensidade média de fluorescência de caspase 3 após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-200c-3p



Determinação de modificação de expressão da proteína caspase 3 por meio do uso de *mimic* e inibidor de miR-200c-3p. A intensidade de fluorescência média foi analisada por meio do software de imagem ImageJ.

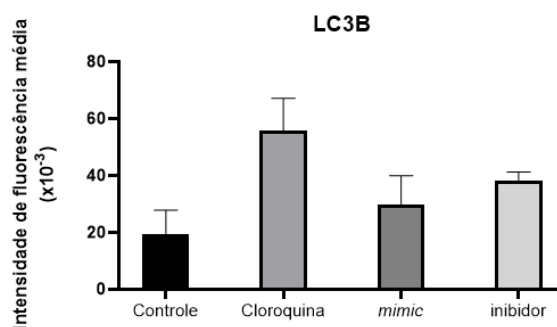
A proteína LC3B apresentou-se aumentada após a transfecção do inibidor de miR-200c, conforme demonstrado nas figuras Figura 27 e Figura 28. Curiosamente, o aumento da expressão desse miRNA por meio da aplicação de *mimic* também promoveu um discreto aumento da proteína.

Figura 27 – Resultado de imunofluorescência de LC3B após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-200c-3p



Determinação de modificação de expressão da proteína LC3B por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-200c-3p. Núcleos foram corados com DAPI (azul), e LC3B com Alexa Fluor™ 488 (verde). As imagens sobrepostas são observadas a direita.

Figura 28 – Intensidade média de fluorescência de LC3B após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-200c-3p

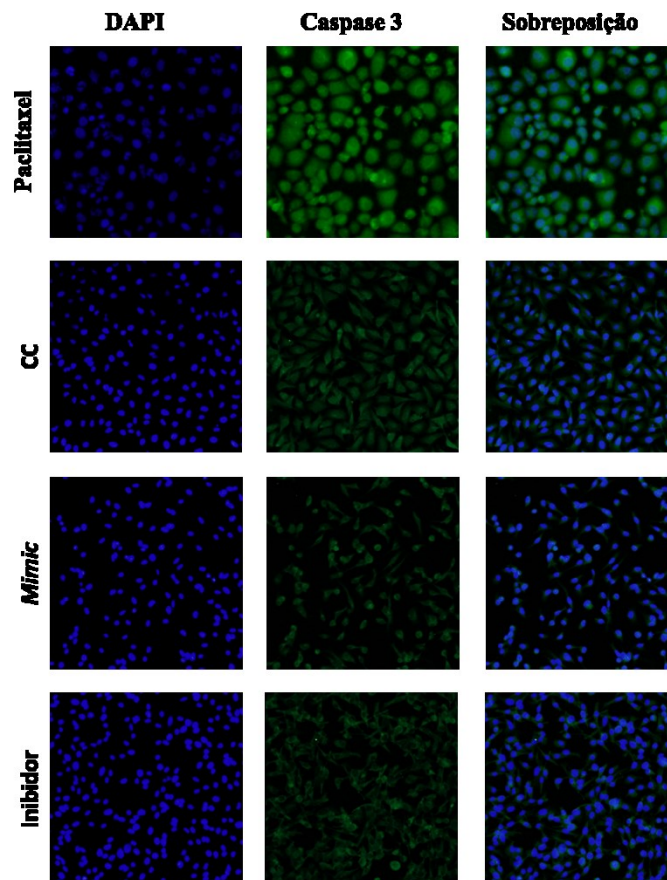


Determinação de modificação de expressão da proteína LC3B por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-200c-3p. A intensidade de fluorescência média foi analisada por meio do software de imagem ImageJ.

5.6.2 Expressão das proteínas caspase 3 e LC3B após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-144-3p

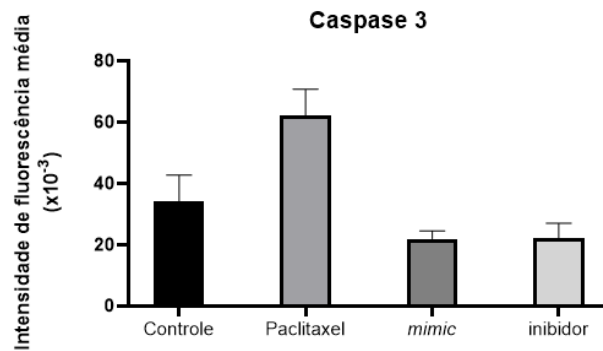
Em relação ao *mimic* e inibidor de miR-144-3p, ambos promoveram redução da expressão de CASP3, corroborando os dados obtidos por RT-qPCR. Esses resultados podem ser observados nas figuras Figura 29 e Figura 30.

Figura 29 – Resultado de imunofluorescência de caspase 3 após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-144-3p



Determinação de modificação de expressão da proteína caspase 3 por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-144-3p. Núcleos foram corados com DAPI (azul), e caspase 3 com Alexa Fluor™ 488 (verde). As imagens sobrepostas são observadas a direita.

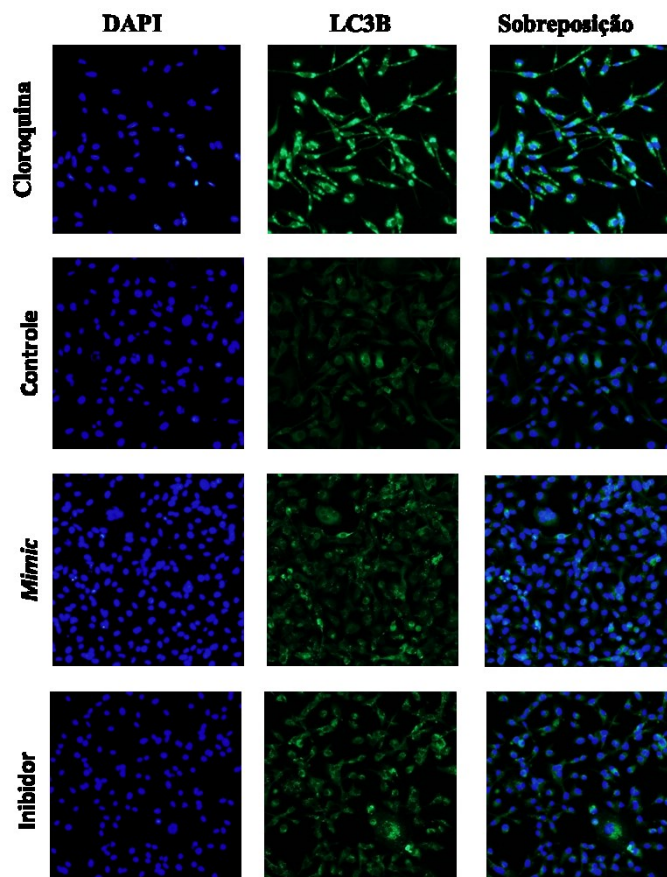
Figura 30 – Intensidade média de fluorescência de caspase 3 após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-144-3p



Determinação de modificação de expressão da proteína LC3B por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-144-3p. A intensidade de fluorescência média foi analisada por meio do software de imagem ImageJ.

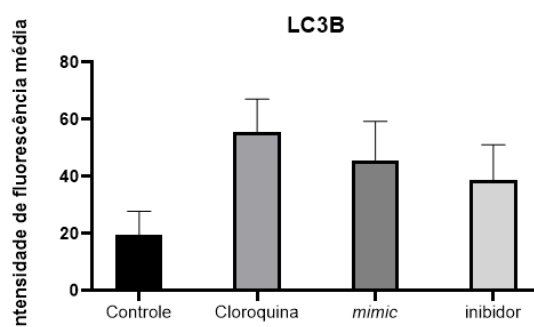
Por outro lado, a expressão de LC3B foi encontrada aumentada em ambos os cenários de aumento e inibição de miR-144-3p, conforme ilustrado nas imagens.

Figura 31 – Resultado de imunofluorescência de LC3B após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-144-3p



Determinação de modificação de expressão da proteína LC3B por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-144-3p. Núcleos foram corados com DAPI (azul), e LC3B com Alexa Fluor™ 488 (verde) As imagens sobrepostas são observadas a direita.

Figura 32 – Intensidade média de fluorescência de LC3B após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-144-3p

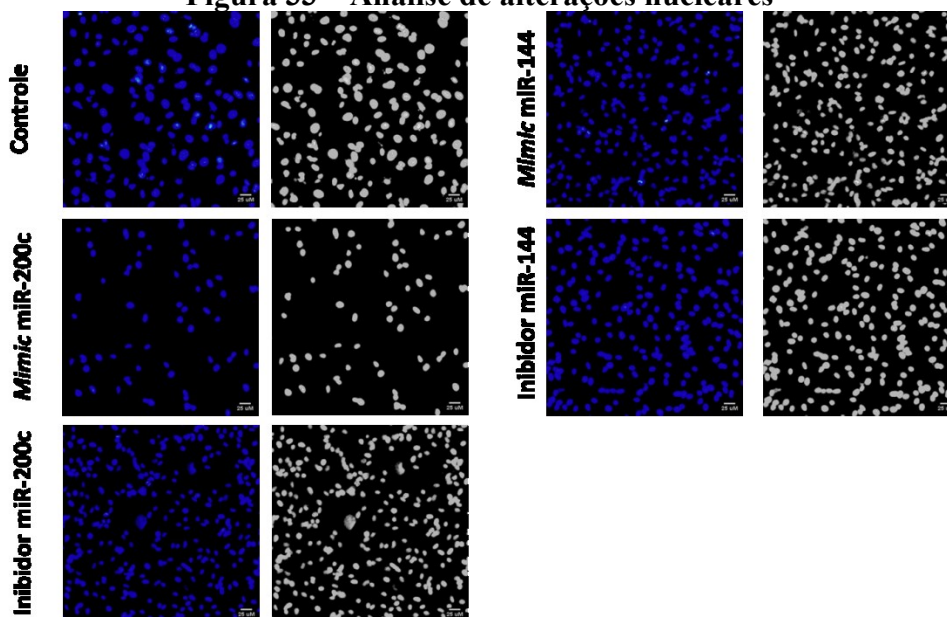


Determinação de modificação de expressão da proteína LC3B por meio da aplicação de *mimic* e inibidor de miR-144-3p. A intensidade de fluorescência média foi analisada por meio do software de imagem ImageJ.

5.6.3 Análise alterações nucleares

Para análise de alterações nucleares, os núcleos foram marcados com o corante DAPI. Os resultados dessa análise constam na Figura 33.

Figura 33 – Análise de alterações nucleares



Alterações nucleares após transfecção com *mimic* e inibidor de miR-200c-3p e miR-144-3p. Núcleos corados com DAPI (azul) à esquerda, e núcleos em escala de cinza para facilitar observação.

Conforme demonstrado acima, é possível observar que a transfecção com *mimics* e inibidores de miR-200c-3p e miR-144-3p foi capaz de promover alteração no padrão nuclear quando comparado aos controles, verificando-se a presença de encolhimento (picnose) nuclear.

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO DO CARREADOR LIPOFECTAMINA® RNAIMAX

MicroRNAs (miRNA) apresentam diversas limitações de entrega intracelular devido as características físico-químicas intrínsecas desses ácidos nucleicos, como alto peso molecular, caráter aniônico e hidrofiliçidade, que impedem a livre passagem dessas moléculas através da bicamada lipídica celular (Aagaard; Rossi, 2007; Dowdy, 2017). Neste contexto, torna-se evidente a necessidade de aplicação de estratégias para entrega segura e eficaz desses pequenos RNA. Neste trabalho, o carreador comercial Lipofectamina® RNAiMAX foi aplicado para transfecção de miR-200c e miR144. Trata-se de um lipossoma catiônico que possui elevada eficiência de transfecção em múltiplas linhagens celulares, além de ser facilmente reprodutível e normalmente possuir uma baixa citotoxicidade. Todavia, é possível que haja variabilidade dessas propriedades a depender da linhagem celular a ser utilizada, fazendo-se necessária a validação da Lipofectamina® previamente ao uso, conforme indicado pelo fabricante (2023).

Os resultados, apresentados nas figuras Figura 16 e Figura 17, indicam que a Lipofectamina® não exerceu efeito citotóxico sobre as células da linhagem MDA-MB-231 e demonstrou alta eficiência na entrega de siRNA, demonstrando-se uma ferramenta adequada para transfecção de ácidos nucleicos nessa linhagem tumoral.

6.2 MIMIC DE MIR-200C-3P

De acordo com estudos publicados por Chen *et al.* (2018) e Luo *et al.* (2013), a linhagem celular MDA-MB-231, proveniente de TNBC, apresenta expressão de miR-200c reduzida. Neste contexto, essa subexpressão tem sido relatada não somente em culturas

celulares desse tipo de câncer, mas também em pacientes acometidos pela doença, demonstrando caráter promissor para o prognóstico e tratamento de um dos subtipos mais agressivos de câncer de mama (Chen *et al.*, 2020; Duong *et al.*, 2022).

Conforme ilustrado na Figura 22A, foi observado um aumento de $20,86 \pm 1,80$ na expressão relativa do miR-200c-3p após transfecção com sua molécula mimética. Esse resultado demonstra que o processo de transfecção com o *mimic* foi capaz reverter o quadro de subexpressão observado para esse miRNA na linhagem MDA-MB-231.

Considerando o papel supressor tumoral do miR-200c-3p, ensaios para determinação de morte celular foram realizados, em que foi observado que a molécula mimética de miR-200c foi capaz de reduzir a viabilidade celular média para $65,09 \pm 2,44\%$ quando comparado com os controles (Figura 18A). Adicionalmente, conforme ilustrado na Figura 20, a marcação das células com anexina V-FITC e PI indicou que o miR-200c promoveu apoptose de $50,15 \pm 9,06\%$ das populações celulares analisadas.

Os resultados descritos até aqui eram esperados, uma vez que o sistema de modelagem demonstrou que a apoptose consiste na principal resposta ativada com o aumento do miR-200c-3p (Issler, 2021). Ainda, estudos realizados por autores como Howe *et al.* (2012) e Ren *et al.* (2014), corroboram a indução de morte celular apoptótica em modelos de câncer de mama triplo-negativo após o aumento do conteúdo do miRNA em questão.

Tendo em vista as modificações realizadas na via de apoptose da rede regulatória (Figura 8), o gene *BAX* foi selecionado para validação experimental da interação entre o alvo e miR-200c-3p em TNBC. O resultado de RT-qPCR demonstrou valor de *fold change* de $1,95 \pm 0,18$ para o gene escolhido, caracterizando um aumento de expressão (Figura 23A), e apresentando-se de acordo com o esperado para a interação predita na Figura 6. Apesar de estudos indicarem que o miR-200c está relacionado com o aumento de BAX em nível gênico e proteico em outras condições (Zhang, X. *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2017), nenhum outro trabalho realizado até o momento relatou essa interação em câncer de mama.

Adicionalmente, a expressão de caspase 3 foi verificada por RT-qPCR e imunofluorescência para confirmação de promoção de apoptose. Neste cenário, o *mimic* foi capaz de promover aumento de expressão de *CASP3*, com *fold change* de $1,31 \pm 0,06$. Esse aumento de expressão foi confirmado através da técnica de imunofluorescência, em que pode-se observar aumento de intensidade de sinal detectado de *CASP3* após aumento do conteúdo de miR-200c-3p (Figura 25). Considerando que a caspase 3 consiste em uma das principais caspases efetoras para a promoção do processo de apoptose, é possível pressupor que o miR-200c se trata de um importante regulador dessa via de morte no TNBC.

Corroborando os dados de morte celular e expressão de genes e proteínas da via de apoptose, foi detectada também a presença de picnose, uma característica celular morfológica amplamente descrita para células em apoptose (Alberts *et al.*, 2017), indicando novamente a ativação desse processo, conforme ilustrado na Figura 33.

Em relação à via de autofagia, os alvos *CFLAR* e *LC3B* foram avaliados por RT-qPCR. Apesar de ser proposto inicialmente que o aumento do miR-200c-3p promoveria estímulo de *CFLAR* (Figura 9), essa regulação não foi observada experimentalmente. Adicionalmente, *LC3B* que se esperava encontrar com expressão reduzida após transfecção com *mimic*, mostrou aumento de expressão de $1,38 \pm 0,09$, conforme ilustrado na Figura 23B. Corroborando esse resultado, a técnica de imunofluorescência indicou um discreto aumento na proteína *LC3B* quando comparado ao controle.

Neste contexto, inicialmente foi considerado que o miR-200c-3p atuasse de forma a inibir a autofagia (Figura 9). Todavia, apenas o aumento de *LC3B* não é suficiente para indicar aumento de atividade autofágica, uma vez que o bloqueio dessa via nas etapas finais pode promover o acúmulo de autofagossomos, ocasionando um aumento no conteúdo desse marcador (Yoshii; Mizushima, 2017). Ainda, as técnicas de RT-qPCR e imunofluorescência não são capazes de detectar a conversão de *LC3-I* em *LC3-II*, que se trata da forma da proteína após um processo de lipidação que resulta em uma incorporação ativa nas membranas para formação dos autofagossomos (Li; He; *et al.*, 2020; Wu, 2023). Assim, segundo Runwal e colaboradores (2019), o aumento da detecção de *LC3* através de imunofluorescência também pode ocorrer devido à inibição da via autofágica e acúmulo de agregados de *LC3-I*.

Para melhor elucidação do papel do miR-200c-3p na via de autofagia, seria interessante a realização de experimentos adicionais, como a técnica de *western blotting* para detecção de conversão de *LC3-I* à *LC3-II*; além de um novo experimento de imunofluorescência em combinações de *mimic* isolado e concomitantemente à presença de um inibidor de autofagia em fase final. Nesse sentido, fármacos como cloroquina ou bafilomicina A podem ser utilizados com a finalidade de observação da capacidade do ácido nucleico em aumentar a intensidade de sinal para *LC3* (indicando aumento do fluxo autofágico devido ao aumento no conteúdo de autofagossomos), ou manutenção da mesma intensidade observada para o *mimic* isolado (apontando inibição de autofagia) (Klionsky; Abdel-Aziz; *et al.*, 2021; Yoshii; Mizushima, 2017). Ademais, a avaliação dos outros genes-alvo indicados por análise *in silico*, *ULK2*, *WIPI1* e *NRBF2* também seria uma forma de enriquecer a caracterização funcional do miR-200c-3p no TNBC.

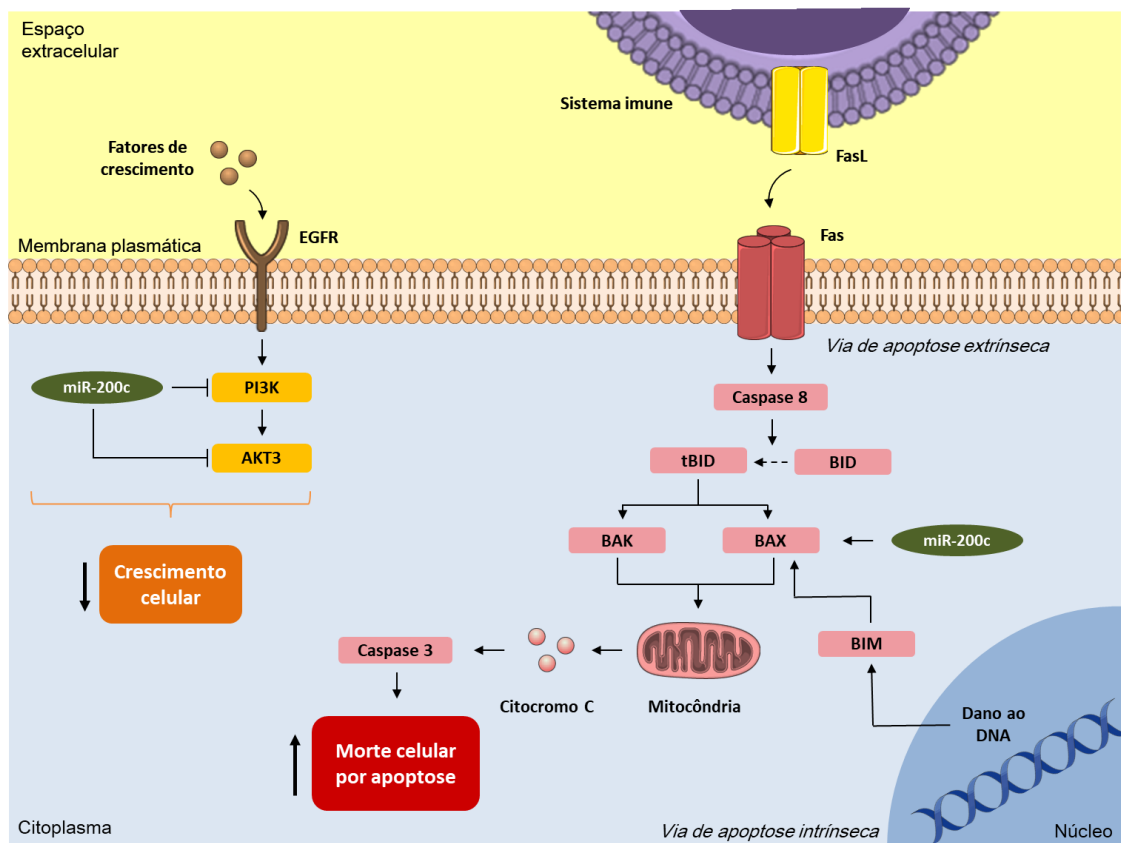
É importante mencionar que o sistema de modelagem elaborado previamente por Issler (2021) não resultou em qualquer *output* de estímulo de autofagia mediante o aumento de miR-200c-3p. Entretanto, a ativação da via de autofagia concomitantemente à via de apoptose já foi descrita no câncer para diversos agentes antitumorais, tanto como um mecanismo de defesa para aumento de sobrevivência de celular, quanto como um mecanismo capaz de intensificar a resposta de morte celular (Hua *et al.*, 2023; Khing *et al.*, 2021; Magnano *et al.*, 2021; Skubnik *et al.*, 2023). Neste contexto, é possível perceber que a autofagia consiste em uma via com respostas ambíguas, que deve ser avaliada e interpretada com cautela.

Três alvos foram selecionados para avaliação experimental do papel de miR-200c-3p na via PI3K/AKT/mTOR a partir da predição *in silico* (Figura 12). Assim, a expressão de *PTEN*, *PI3K* e *AKT3* foi examinada por meio da técnica de RT-qPCR, e os resultados estão contidos na Figura 23C. Conforme esperado (Figura 12), observou-se alterações no *fold change* dos alvos *PI3K* e *AKT3*, que apresentaram médias de $0,48 \pm 0,12$ e $0,63 \pm 0,08$, respectivamente. Assim, é evidente que a atuação supressora tumoral do aumento de expressão do miR-200c dá-se não somente devido ao aumento de apoptose, como também em função de uma diminuição da ativação da via de crescimento PI3K/AKT/mTOR.

Esse resultado está de acordo com estudos prévios que relataram que o aumento de expressão do miR-200c foi capaz de suprimir o crescimento e proliferação celular de TNBC (Garrido-Cano *et al.*, 2023; Simpson *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2015; Zhang, D. D. *et al.*, 2019). Todavia, nenhum estudo até o momento havia avaliado o papel desse miRNA em reduzir a expressão dos genes *PI3K* e *AKT3*.

Finalmente, é possível inferir que o aumento de miR-200c-3p no TNBC consiste em um importante mecanismo supressor tumoral, capaz de promover apoptose e reduzir crescimento celular através da atuação em diferentes componentes da via de interesse. Um resumo dessa atuação pode ser observado na Figura 34. Esse resultado está em concordância com a literatura publicada até o momento, além de corroborar o indicado pelo modelo matemático avaliado neste trabalho.

Figura 34 – Esquema representativo da atuação do miR-200c em TNBC



Esquema representando a atuação do miR-200c-3p nas vias de crescimento celular e apoptose de acordo com os resultados experimentais obtidos. Imagem de fonte autoral elaborada utilizando figuras com cores modificadas da *Servier Medical Art*, licenciada pela *Creative Commons by 4.0*.

6.3 INIBIDOR DE MIR-200C-3P

Para o estabelecimento de uma elucidação mais aprofundada do mecanismo de miR-200c-3p no TNBC, um inibidor desse miRNA, também chamado de antagoniR, foi aplicado. Conforme ilustrado na Figura 22B, a transfecção do inibidor não foi capaz de promover alteração na expressão do miR-200c-3p nas condições de concentração e tempo de incubação adotadas neste trabalho. Entretanto, esse resultado está de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, que indicam que o inibidor em questão não promove eliminação do miRNA, e a sim inibição da atividade a partir de ligação ao miRNA alvo (SIGMA-ALDRICH, 2013).

Neste contexto, diversas respostas celulares foram observadas após exposição ao inibidor, demonstrando que essa molécula foi capaz de exercer ação na linhagem celular selecionada. Ainda, respostas observadas para genes-alvo como *CASP3*, *PI3K* e *AKT3* demonstraram o potencial desse oligonucleotídeo em exercer exatamente a ação oposta ao

observado com o *mimic* (Figura 23), indicando a ocorrência de inibição do miRNA no microambiente. Esses resultados serão avaliados em mais detalhes a seguir.

Por meio do ensaio de MTT, inicialmente foi observada queda de viabilidade celular de $49,59 \pm 2,06\%$ após a transfecção com o inibidor de miR-200c-3p (Figura 18B). Esse resultado, apesar de surpreendente, foi corroborado pela marcação de anexina V-FITC e PI, em que o inibidor promoveu a exposição dos resíduos de PS em $76,60 \pm 9,06\%$ das populações celulares analisadas (Figura 20), sendo indicativo de morte celular por apoptose.

Todavia, um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2017) relatou que a inibição de miR-200c-3p na linhagem celular MDA-MB-231 através da transfecção de plasmídeo foi capaz de promover a proliferação celular, além de reduzir a ocorrência de apoptose. Embora o método de inibição tenha sido diferente, os autores encontraram um resultado contrário ao observado no presente estudo.

Ainda, o sistema de modelagem não avaliou a inibição do miRNA em condições além da subexpressão já observada normalmente no TNBC, uma vez que é apenas possível ativar ou inibir completamente os miRNA no modelo em questão (Issler, 2021).

Com a finalidade de desvendar o papel da inibição do miR-200c-3p na promoção de morte celular, a expressão de *CASP3*, uma das caspases efetoras mais proeminentes no processo de apoptose, foi avaliada por RT-qPCR após a transfecção com esse ácido nucleico. O *fold change* observado foi de $0,75 \pm 0,06$, caracterizando redução de expressão, conforme indicado na Figura 23A. Esse resultado não foi confirmado pela técnica de imunofluorescência realizada, em que a amostra exposta ao antagomiR não apresentou diferença quando comparada ao seu controle.

Por outro lado, os ensaios de RT-qPCR para os alvos da via PI3K/AKT/mTOR demonstraram que a inibição do miR-200c-3p foi capaz de reduzir a expressão de *PTEN* (*fold change* de $0,66 \pm 0,06$), e aumentar a expressão de genes promotores de crescimento celular, como *AKT3* e *PI3K*, apresentando expressões de $1,53 \pm 0,08$ e $1,49 \pm 0,12$, respectivamente. Neste contexto, conforme ressaltado anteriormente, a regulação positiva da via de crescimento tem sido associada à inibição do miRNA em questão (Qiu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Apesar de a ativação moderada de AKT ser considerada um fator de sobrevivência capaz de promover proliferação e crescimento celular, estudos indicam que o estímulo excessivo ou prolongado da proteína pode levar a morte celular através de diferentes processos, como estresse oxidativo (Nogueira *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2017) e disrupção da via autofágica (Noguchi *et al.*, 2020; Wang, R. C. *et al.*, 2012). Ainda, é importante ressaltar que AKT3 foi recentemente destacada como a isoforma com maior capacidade de produção

de espécies reativas do oxigênio (EROs) ativando, portanto, a resposta de dano ao DNA (Polytarchou *et al.*, 2020).

Neste cenário, é possível que a ativação exacerbada da via PI3K/AKT/mTOR promovida pelo antagomiR seja capaz de promover morte celular por meio do acúmulo de EROs concomitantemente à inibição da resposta autofágica adaptativa, conduzindo a célula à perda de viabilidade por meio da resposta de dano ao DNA, possivelmente a partir de apoptose intrínseca. Assim, a avaliação da modificação no conteúdo das caspases efetoras 6 e 7 seria interessante, uma vez que não houve aumento de caspase 3. Ainda, conforme destacado por Galluzzi e colaboradores (2018), a perda de caspases executoras não impede a morte celular, que pode ser desviada para outras formas de RCD (do inglês, *regulated cell death*) independentes dessas proteases.

Em relação aos alvos da via de autofagia, o ensaio de RT-qPCR demonstrou um aumento no *fold change* de *CFLAR* de $1,58 \pm 0,09$. *CFLAR* é um gene codificador da proteína c-FLIP (do inglês, *cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*), conhecida por seus efeitos antiapoptóticos e antiautofágicos. Dessa forma, c-FLIP consiste em uma molécula cataliticamente inativa semelhante à CASP8, e é responsável por inibir a apoptose extrínseca por meio do impedimento de interação de CASP8 com FADD (Galluzzi *et al.*, 2018; Koren; Fuchs, 2021). Já na via da autofagia, essa molécula atua a partir de competição com ATG3 pela ligação à LC3, reduzindo o processamento dessa proteína e inibindo a biogênese de autofagossomos (Safa, 2013).

Considerando os resultados obtidos de aumento em expressão gênica (*fold change* de $1,64 \pm 0,09$) e proteica de LC3B, é possível que a regulação positiva observada ocorra devido à inibição do processo autofágico promovido por AKT3 e c-FLIP, promovendo um acúmulo de LC3B e ampliação da detecção do respectivo sinal, conforme descrito anteriormente. Entretanto, ensaios mais específicos seriam necessários para corroborar essa hipótese.

De forma geral, é possível suspeitar que a inibição de miR-200-3p além da subexpressão naturalmente observada no TNBC resulte em ativação da via intrínseca de apoptose, revelando um fino balanço de regulação desse ácido nucleico no microambiente dessa forma de câncer de mama. Essa hipótese é reforçada por dados da literatura que apontam que: (1) a ativação excessiva de AKT3 conduz ao acúmulo de EROs, fomentando a resposta de dano ao DNA; e (2) o aumento de expressão de AKT e c-FLIP é capaz de suprimir a via de resposta autofágica.

Nesse sentido, a intensa resposta de redução de viabilidade celular, a exposição dos resíduos de PS, e a presença de núcleos picnóticos observada no presente trabalho são capazes

de corroborar essa teoria. Um resumo dos resultados alcançados após transfecção com *mimic* e antagomiR de miR-200c-3p pode ser observado na Figura 35.

Figura 35 – Respostas celulares após transfecção com *mimic* e antagomiR de miR-200c

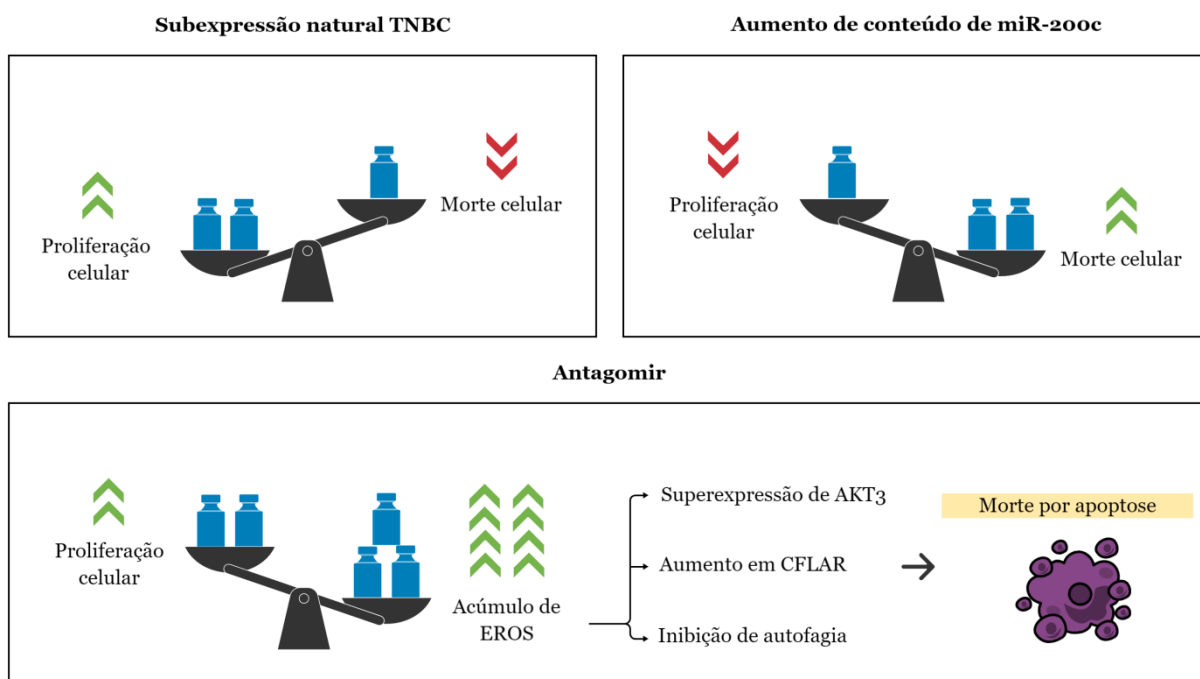


Imagem de fonte autoral elaborada com Mind the Graph.

6.4 MIMIC DE MIR-144-3P

Estudos realizados com amostras de pacientes afetados por câncer de mama em geral e em linhagens celulares do subtipo triplo-negativo apontam que o miR-144-3p encontra-se com expressão reduzida (Li; Zou; *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2018). Na clínica, essa subexpressão parece estar relacionada com a ocorrência de tumores mais invasivos, além de menores índices de sobrevivência geral e sobrevida livre de progressão da doença (Li; Zou; *et al.*, 2020; Madhavan *et al.*, 2016).

A transfecção de *mimic* de miR-144-3p foi capaz de promover aumento do conteúdo relativo desse miRNA em $11,34 \pm 0,53$, conforme ilustrado na Figura 24. Ainda, a maior concentração testada dessa molécula reduziu a viabilidade celular para $63,16 \pm 1,57\%$ quando comparada ao controle (Figura 19A). O ensaio de anexina V-FITC, por sua vez, demonstrou um aumento de apoptose em $51,52 \pm 9,68\%$.

Esses resultados eram esperados, e a perda de viabilidade celular e promoção de apoptose após aumento de expressão do miR-144-3p em câncer de mama já foi relatada

anteriormente em estudos por Pan *et al.* (2016) e Yin *et al.* (2018). Adicionalmente no presente estudo, a marcação dos núcleos com DAPI, demonstrada na Figura 33, demonstrou padrão de condensação nuclear característico de morte por apoptose.

Contudo, resultados inesperados foram obtidos após avaliação dos alvos selecionados referentes à via de apoptose para caracterização funcional do miR-144-3p. Nesse sentido, o ensaio de RT-qPCR não demonstrou atuação do miR-144 na regulação positiva de *FAS* conforme esperado (Figura 7), enquanto foi capaz de promover regulação negativa de *CASP3*, com expressão relativa de $0,54 \pm 0,06$ (Figura 24A). Ainda, a técnica de imunofluorescência confirmou essa redução de expressão de *CASP3* em nível proteico, conforme ilustrado na Figura 26. Neste contexto, para confirmação de morte apoptótica é indicada avaliação de expressão de outras caspases executoras, além da avaliação da interação proposta *in silico* entre o miR-144 e *CASP10*.

Em relação à via de PI3K/AKT/mTOR, foram obtidos resultados promissores e que corroboram o esperado para a regulação dos genes *EGFR* e *IRS1* (Figura 13), com redução na expressão desses alvos apresentando *fold change* de $0,64 \pm 0,10$ para *EGFR* e $0,60 \pm 0,08$ para *IRS1*. Esse resultado condiz com o observado por outros autores, em que o aumento do miR-144-3p em câncer de mama reduziu a proliferação celular (Pan *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2018). Nesse sentido, a literatura científica apresenta, até o momento, apenas um estudo estabelecendo ligação entre o miR-144-3p e a regulação do EGFR. Nesse caso, a inibição do miR-144-3p em tumor esofágico resultou em um aumento na expressão de EGFR em nível proteico. Embora seja razoável inferir que o uso de uma molécula mimética do miR-144-3p poderia reverter esse efeito, ou seja, diminuir a expressão de EGFR, essa hipótese ainda não havia sido submetida a testes experimentais até o momento (Wang *et al.*, 2020). Em relação a *IRS1*, um estudo demonstrou que o aumento de miR-144-3p foi capaz de reduzir a expressão desse gene em carcinoma de laringe (Wu *et al.*, 2016). Assim, nosso trabalho apresenta, pela primeira vez na literatura, evidências da regulação de EGFR e IRS1 a partir do miR-144-3p em TNBC.

Esse resultado é relevante, pois o aumento de expressão gênica e proteica de EGFR tem sido relatado no TNBC, e é associado a piores prognósticos. Ainda, a inibição de EGFR vem sendo considerada como uma possível alternativa terapêutica para esse tipo de câncer, e já é utilizada para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas, em que demonstrou capacidade de promover morte celular por apoptose (El Guerrab *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2023; Nakai *et al.*, 2016; Nishihara *et al.*, 2022). Em relação à IRS1, a

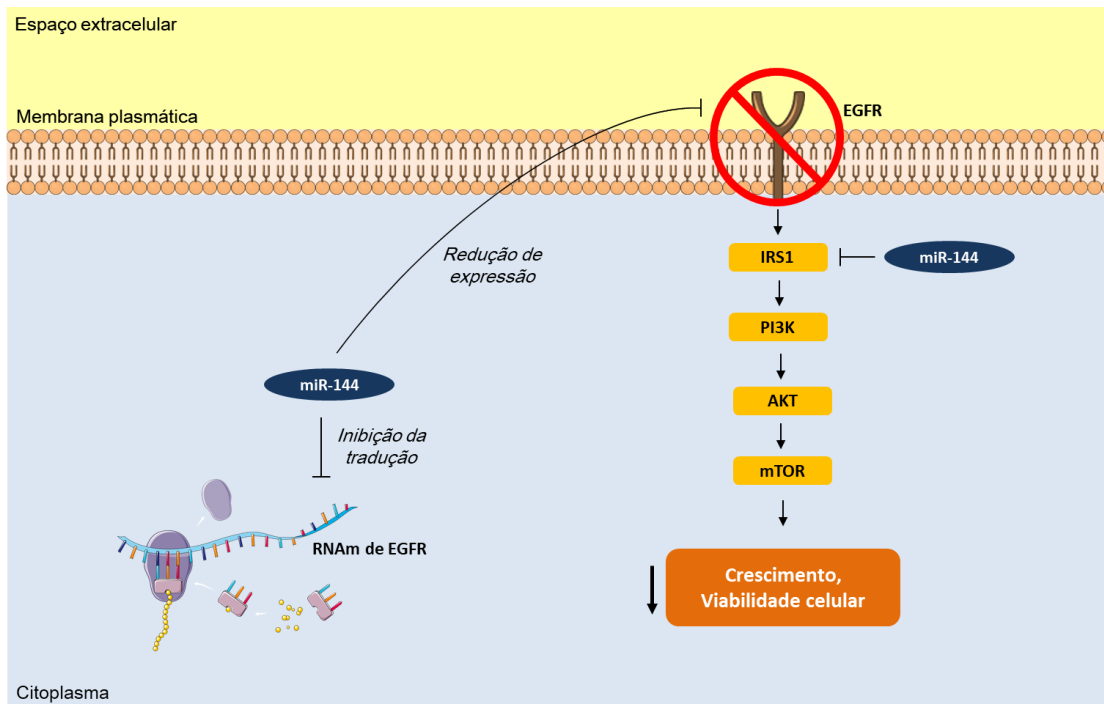
inibição da expressão dessa proteína no microambiente de tumores triplo-negativos foi capaz de promover perda de viabilidade celular e redução de crescimento (Perez *et al.*, 2020).

Por fim, a avaliação de *CFLAR* por RT-qPCR revelou a presença de regulação negativa desse alvo, com *fold change* de $0,80 \pm 0,06$, demonstrando o oposto do aumento de expressão inicialmente esperado (Figura 10). A proteína produzida a partir do gene em questão, c-FLIP, é capaz de promover respostas inibitórias na via de autofagia e apoptose extrínseca, conforme descrito anteriormente (Galluzzi *et al.*, 2018; Koren; Fuchs, 2021). Além do mais, apesar de não ter sido observado aumento significativo em *LC3B*, um aumento da proteína LC3B foi detectado por imunofluorescência. Essa divergência pode ser explicada por um aumento na estabilidade do mRNA de LC3B, possivelmente mediado por miRNA. Nesse contexto, hipotetizamos que o miR-144-3p possa estabilizar o mRNA de LC3B, promovendo sua tradução e consequente aumentando dos níveis proteicos sem modificação de expressão gênica (Naeli *et al.*, 2023; Valinezhad Orang *et al.*, 2014).

Ainda, é importante ressaltar que um estudo publicado por Rontogianni e colaboradores (2020) relatou que a inibição da proteína EGFR de forma isolada é capaz de ativar autofagia em microambiente de tumores triplo-negativos. Esse fato, aliado à diminuição de expressão do gene *CFLAR* promovida pelo miRNA pode ser capaz de promover resposta autofágica, que pode ou não estar associada à promoção de morte celular. Todavia, não é possível confirmar que houve ativação dessa via na ausência de experimentos mais específicos, já que esse aumento de LC3B também poderia estar relacionado à inibição da via autofágica nas etapas finais (Runwal *et al.*, 2019).

Resumidamente, o aumento do miR-144 no microambiente de TNBC apresentou efeito supressor tumoral, principalmente a partir da inibição dos genes *EGFR* e *IRS1*, conforme ilustrado na Figura 36. Ainda, observou-se aumento de morte celular, possivelmente através de apoptose, que pode estar associada ao aumento de autofagia. Nesse sentido, é viável corroborar o resultado obtido pelo modelo descrito por Issler (2021), em que a atividade ectópica desse miRNA seria capaz de promover apoptose como resposta principal.

Figura 36 – Esquema representativo da atuação do miR-144 em TNBC



Esquema representando a atuação do miR-144-3p nas vias de crescimento celular e apoptose de acordo com os resultados experimentais obtidos. Imagem de fonte autoral elaborada utilizando figuras da *Servier Medical Art*, licenciada pela *Creative Commons by 4.0*.

6.5 INIBIDOR DE MIR-144-3P

Para consolidar o mecanismo de miR-144-3p no TNBC, o antagoniR de miR-144-3p foi aplicado. De acordo com o ilustrado na Figura 22B, a transfecção do inibidor não promoveu alteração do conteúdo do miRNA alvo. Todavia, conforme relatado anteriormente para o antagoniR de miR-200c-3p, esse resultado está de acordo com o mecanismo de ação dessa molécula proposto pelo fabricante (SIGMA-ALDRICH, 2013).

A transfecção do antagoniR foi capaz de promover diminuição da viabilidade celular para $57,28 \pm 3,79\%$ (Figura 19B). Ainda, foi observada uma exposição dos resíduos de PS em uma média de $62,48 \pm 9,68\%$ dos eventos celulares analisados após a marcação com anexina V-FITC/PI e a presença de núcleos picnóticos após exposição ao antagoniR, representado nas figuras **Figura 19** e **Figura 33**, respectivamente.

Apesar da marcação com anexina V e presença de condensação nuclear ser sugestiva de apoptose, foi observada uma redução na expressão de caspase 3 em nível gênico, conforme ilustrado na Figura 24B (*fold change* de $0,78 \pm 0,06$), e proteico (Figura 26). Conforme discutido anteriormente, a ausência de aumento desse gene/proteína não exclui a possibilidade de apoptose (Galluzzi *et al.*, 2018).

Ainda, o inibidor desse miRNA promoveu a resposta oposta ao observado com o *mimic*, aumentando a expressão de *EGFR* e *IRS1* em $1,57 \pm 0,10$ e $1,57 \pm 0,08$, respectivamente (Figura 24C). Nesse sentido, apesar de a expressão de EGFR ser normalmente relacionada à proliferação e crescimento celular, a superexpressão desse receptor tem sido associada à morte celular por apoptose em algumas linhagens celulares (Hognason *et al.*, 2001; Jackson; Ceresa, 2017; Treda *et al.*, 2016).

Esse processo ocorre principalmente após a interação desse receptor com o seu ligante EGF (do inglês, *epidermal growth factor*), que está presente no soro fetal bovino (SFB) usado amplamente em práticas de cultivo celular. Neste contexto, a linhagem proveniente de TNBC MDA-MB-468, que apresenta superexpressão de EGFR, demonstrou a ocorrência de morte por apoptose via ativação de STAT3 quando estimulada por EGF (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*) (Jackson; Ceresa, 2017; Lee *et al.*, 2022). Ainda, um estudo recentemente publicado por Kim e colaboradores (2023) procurou elucidar os genes envolvidos nessa curiosa forma de promoção de morte celular. Isso foi realizado a partir de um *screening* utilizando CRISPR/Cas9 e identificou 266 genes possivelmente responsáveis pela promoção de apoptose mediada por ligação de EGF.

Em relação à via de autofagia, foi observada regulação positiva de ambos os alvos avaliados por RT-qPCR, *CFLAR* e *LC3B*, com respectivas expressões relativas de $1,37 \pm 0,06$ e $1,99 \pm 0,13$ Figura 24B. Esse aumento de LC3B foi confirmado a partir da técnica de imunofluorescência (Figura 31), mas é insuficiente para comprovar o aumento de atividade autofágica, já que o bloqueio desse processo em suas últimas etapas pode promover o acúmulo desse marcador (Yoshii; Mizushima, 2017). Ainda, o aumento observado na expressão de *CFLAR* após a transfecção com o inibidor de miR-144-3p pode promover inibição da via de autofagia a partir da respectiva proteína codificada, c-FLIP (Safa, 2013).

A partir dos resultados aqui demonstrados, é possível compreender que assim como o miR-200c-3p, a regulação do miR-144-3p também parece ter um fino balanço, uma vez que se apresenta superexpresso no TNBC, atuando inicialmente na promoção de sobrevivência e proliferação celular, mas desencadeando morte celular se inibido a partir de um certo limite. O exato mecanismo pelo qual essa resposta celular ocorre não é evidente, e a realização de ensaios adicionais poderia auxiliar na elucidação. O resumo dos resultados alcançados é ilustrado na Figura 37.

Figura 37 – Respostas celulares após transfecção com *mimic* e antagomiR de miR-144

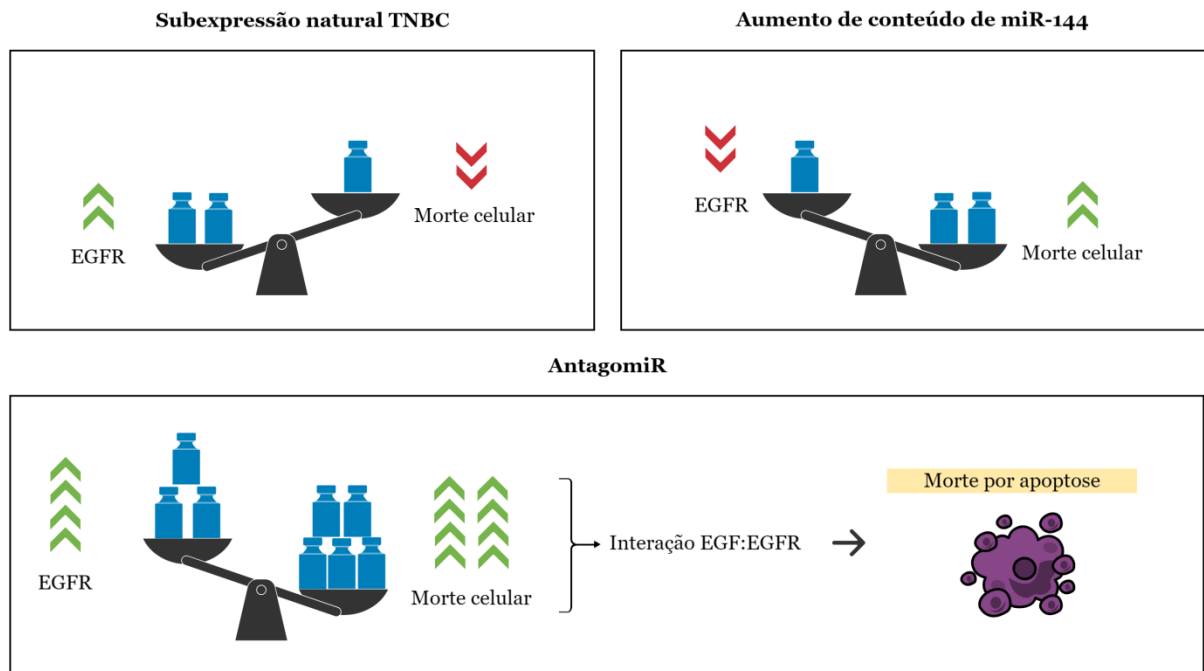


Imagem de fonte autoral elaborada com Mind the Graph.

7 CONCLUSÃO

O aumento dos miRNA selecionados no microambiente de TNBC foi capaz de promover morte celular por apoptose, validando o destino celular previamente predito para essas condições no modelo matemático analisado. Isso foi observado após transfecção de moléculas *mimic* de miR-200c-3p que promoveram redução de viabilidade celular, aumento de apoptose e de expressão de caspase 3 em nível gênico e proteico; além do aumento de miR-144-3p, que foi capaz de reduzir a viabilidade celular e aumentar apoptose, possivelmente a partir das caspases executoras -6 ou -7.

O presente trabalho revelou alguns alvos inéditos para esses pequenos ácidos nucleicos no contexto de câncer de mama triplo-negativo, como *BAX*, *CFLAR*, *AKT3* e *PI3K* para o miR-200c, e *CFLAR*, *EGFR* e *IRSI* para miR-144. Esses resultados auxiliam a compreensão do papel dessas moléculas nesse tipo de tumor, permitindo uma caracterização funcional mais completa e uma maior aplicabilidade desses alvos em estudos futuros.

Adicionalmente, foi observado um fino balanço na regulação desses miRNA no TNBC, em que a subexpressão desses alvos observada naturalmente no contexto tumoral é capaz de promover aumento de crescimento e sobrevivência celular, porém a regulação negativa dessas moléculas a partir de um certo limite é capaz de promover morte por ativação excessiva de componentes da via do crescimento, como AKT3 e EGFR.

Por fim, a rede regulatória do modelo matemático foi ampliada, com a inclusão de 12 novos componentes fixos. Ainda, os resultados obtidos experimentalmente comprovaram aqueles obtidos através do modelo matemático que foi, portanto, otimizado. O modelo atual proporciona predições de interações mais amplas.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, L.; ROSSI, J. J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. **Adv Drug Deliv Rev**, v.59, n. 2-3, p. 75-86, 2007. DOI: 10.1016/j.addr.2007.03.005.
- ABDRAKHMANOV, A.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. To Eat or to Die: Deciphering Selective Forms of Autophagy. **Trends Biochem Sci**, v.45, n. 4, p. 347-364, 2020. DOI: 10.1016/j.tibs.2019.11.006.
- ACS, A. C. S. **Invasive Breast Cancer (IDC/ILC)**. 2021a. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>. Acesso em: 01 ago. 2024.
- ACS, A. C. S. **Types of Breast Cancer**. 2021b. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>. Acesso em: 09 jul. 2024.
- ACS, A. C. S. **What Is Breast Cancer?**, 2021c. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>. Acesso em: 09 jul. 2024.
- ACS, A. C. S. **Breast Cancer Signs and Symptoms**. 2022a. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-cancer-signs-and-symptoms.html>. Acesso em: 08 jul. 2024.
- ACS, A. C. S. **Lobular Carcinoma in Situ (LCIS)**. 2022b. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/non-cancerous-breast-conditions/lobular-carcinoma-in-situ.html>. Acesso em: 01 de ago. 2024.
- AGHIORGHIESEI, O.; ZANOAGA, O.; RADULY, L.; AGHIORGHIESEI, A. I. *et al.* Dysregulation of miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p and miR-205-5p in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Potential Biomarkers Panel? **Curr Issues Mol Biol**, v.44, n. 4, p. 1754-1767, 2022. DOI: 10.3390/cimb44040121.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D. *et al.* Capítulo 18: Morte Celular. *In: Biologia molecular da célula*. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2017.
- ALI SYEDA, Z.; LANGDEN, S. S. S.; MUNKHZUL, C.; LEE, M. *et al.* Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. **Int J Mol Sci**, v.21, n. 5, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051723.
- ANDRE, F.; CIRUELOS, E.; RUBOVSKY, G.; CAMPONE, M. *et al.* Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. **N Engl J Med**, v.380, n. 20, p. 1929-1940, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1813904.
- ANILKUMAR, K. V.; REMA, L. P.; JOHN, M. C.; VANESA JOHN, T. *et al.* miRNAs in the prognosis of triple-negative breast cancer: A review. **Life Sci**, v.333, p. 122183, 2023. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.122183.

ATCC®. **MDA-MB-231: HTB-26™**. 2024. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-26>. Acesso em: 23 de jan. 2024.

BACSO, Z.; EVERSON, R. B.; ELIASON, J. F. The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. **Cancer Res**, v.60, n. 16, p. 4623-4628, 2000.

BAGCI, E. Z.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R.; ERMENTROUT, G. B. *et al.* Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. **Biophys J**, v.90, n. 5, p. 1546-1559, 2006. DOI: 10.1529/biophysj.105.068122.

BALMANA, J.; DIEZ, O.; RUBIO, I. T.; CARDOSO, F. *et al.* BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Ann Oncol**, v.22 Suppl 6, p. vi31-34, 2011. DOI: 10.1093/annonc/mdr373.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, n. 2, p. 281-297, 2004. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v.173, n. 1, p. 20-51, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RE Nº 2.511, DE 5 DE SETEMBRO DE 2019. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: Poder Executivo 2019.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v.74, n. 3, p. 229-263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; WEIDERPASS, E.; SOERJOMATARAM, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v.127, n. 16, p. 3029-3030, 2021. DOI: 10.1002/cncr.33587.

BREWER, H. R.; JONES, M. E.; SCHOEMAKER, M. J.; ASHWORTH, A. *et al.* Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Res Treat**, v.165, n. 1, p. 193-200, 2017. DOI: 10.1007/s10549-017-4325-2.

BULL, J. A.; MECH, F.; QUAISER, T.; WATERS, S. L. *et al.* Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. **PLoS Comput Biol**, v.16, n. 8, p. e1007961, 2020. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007961.

CABRERA-RODRIGUEZ, R.; PEREZ-YANES, S.; ESTEVEZ-HERRERA, J.; MARQUEZ-ARCE, D. *et al.* The Interplay of HIV and Autophagy in Early Infection. **Front Microbiol**, v.12, p. 661446, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.661446.

CALIN, G. A.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, C. D.; HYSLOP, T. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n. 9, p. 2999-3004, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0307323101.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nat Rev Clin Oncol**, v.17, n. 7, p. 395-417, 2020. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.

CHAKRABORTTY, A.; PATTON, D. J.; SMITH, B. F.; AGARWAL, P. miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. **Genes (Basel)**, v.14, n. 7, 2023. DOI: 10.3390/genes14071375.

CHEN, C.; TAN, R.; WONG, L.; FEKETE, R. *et al.* Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. **Methods Mol Biol**, v.687, p. 113-134, 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-944-4_8.

CHEN, H.; LI, Z.; ZHANG, L.; ZHANG, L. *et al.* MicroRNA-200c Inhibits the Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer by Targeting ZEB2, an Epithelial-Mesenchymal Transition Regulator. **Ann Clin Lab Sci**, v.50, n. 4, p. 519-527, 2020.

CHEN, J.; CHEN, Z.; HUANG, J.; CHEN, F. *et al.* Bioinformatics identification of dysregulated microRNAs in triple negative breast cancer based on microRNA expression profiling. **Oncol Lett**, v.15, n. 3, p. 3017-3023, 2018. DOI: 10.3892/ol.2017.7707.

CHEN, J.; TIAN, W.; CAI, H.; HE, H. *et al.* Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. **Med Oncol**, v.29, n. 4, p. 2527-2534, 2012. DOI: 10.1007/s12032-011-0117-4.

CHEN, M. L.; HONG, C. G.; YUE, T.; LI, H. M. *et al.* Inhibition of miR-331-3p and miR-9-5p ameliorates Alzheimer's disease by enhancing autophagy. **Theranostics**, v.11, n. 5, p. 2395-2409, 2021. DOI: 10.7150/thno.47408.

CHEN, S.; LI, P.; LI, J.; WANG, Y. *et al.* MiR-144 inhibits proliferation and induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells by targeting TIGAR. **Cell Physiol Biochem**, v.35, n. 3, p. 997-1007, 2015. DOI: 10.1159/000369755.

CHEN, Y.; SUN, Y.; CHEN, L.; XU, X. *et al.* miRNA-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin through the suppression of E-cadherin-mediated PTEN/Akt signaling. **Mol Med Rep**, v.7, n. 5, p. 1579-1584, 2013. DOI: 10.3892/mmr.2013.1403.

CITTERIO, L. A.; MANCUSO, R.; AGOSTINI, S.; MELONI, M. *et al.* Serum and Exosomal miR-7-1-5p and miR-223-3p as Possible Biomarkers for Parkinson's Disease. **Biomolecules**, v.13, n. 5, 2023. DOI: 10.3390/biom13050865.

CORTEZ-DIAS, N.; COSTA, M. C.; CARRILHO-FERREIRA, P.; SILVA, D. *et al.* Circulating miR-122-5p/miR-133b Ratio Is a Specific Early Prognostic Biomarker in Acute Myocardial Infarction. **Circ J**, v.80, n. 10, p. 2183-2191, 2016. DOI: 10.1253/circj.CJ-16-0568.

CUI, X.; LV, Z.; DING, H.; XING, C. *et al.* MiR-1539 and Its Potential Role as a Novel Biomarker for Colorectal Cancer. **Front Oncol**, v.10, p. 531244, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.531244.

CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.15, n. 1, p. 49-63, 2014. DOI: 10.1038/nrm3722.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**, v.43, n. 6, p. 582-592, 2019. DOI: 10.1002/cbin.11137.

DAHAL, S.; CHAUDHARY, P.; KIM, J. A. Induction of promyelocytic leukemia zinc finger protein by miR-200c-3p restores sensitivity to anti-androgen therapy in androgen-refractory prostate cancer and inhibits the cancer progression via down-regulation of integrin alpha3beta4. **Cell Oncol (Dordr)**, v.46, n. 4, p. 1113-1126, 2023. DOI: 10.1007/s13402-023-00803-y.

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Acts. **Genes Dev**, v.13, n. 22, p. 2905-2927, 1999. DOI: 10.1101/gad.13.22.2905.

DAVENPORT, A. A.; LU, Y.; GALLEGOS, C. A.; MASSICANO, A. V. F. *et al.* Mathematical Model of Triple-Negative Breast Cancer in Response to Combination Chemotherapies. **Bull Math Biol**, v.85, n. 1, p. 7, 2022. DOI: 10.1007/s11538-022-01108-1.

DEBNATH, J.; GAMMOH, N.; RYAN, K. M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.24, n. 8, p. 560-575, 2023. DOI: 10.1038/s41580-023-00585-z.

DENLI, A. M.; TOPS, B. B.; PLASTERK, R. H.; KETTING, R. F. *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v.432, n. 7014, p. 231-235, 2004. DOI: 10.1038/nature03049.

DENTON, D.; KUMAR, S. Autophagy-dependent cell death. **Cell Death Differ**, v.26, n. 4, p. 605-616, 2019. DOI: 10.1038/s41418-018-0252-y.

DEY, R.; SONI, K.; SARAVANAN, S.; BALAKRISHNAN, P. *et al.* Anti-HIV microRNA expression in a novel Indian cohort. **Sci Rep**, v.6, p. 28279, 2016. DOI: 10.1038/srep28279.

DI PALO, A.; SINISCALCHI, C.; SALERNO, M.; RUSSO, A. *et al.* What microRNAs could tell us about the human X chromosome. **Cell Mol Life Sci**, v.77, n. 20, p. 4069-4080, 2020. DOI: 10.1007/s00018-020-03526-7.

DINAMI, R.; POMPILI, L.; PETTI, E.; PORRU, M. *et al.* MiR-182-3p targets TRF2 and impairs tumor growth of triple-negative breast cancer. **EMBO Mol Med**, v.15, n. 1, p. e16033, 2023. DOI: 10.15252/emmm.202216033.

DOWDY, S. F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. **Nat Biotechnol**, v.35, n. 3, p. 222-229, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3802.

DUNDAR, S.; GOKKURT, B.; SOYLU, Y. Mathematical Modelling at a Glance: a theoretical study. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v.46, p. 3465-3470, 2012. DOI: 10.1016/j.sbspro.2012.06.086.

DUONG, T. T. D.; NGUYEN, T. H. N.; THI NGOC NGUYEN, T.; HUYNH, L. H. *et al.* Diagnostic and prognostic value of miR-200 family in breast cancer: A meta-analysis and systematic review. **Cancer Epidemiol**, v.77, p. 102097, 2022. DOI: 10.1016/j.canep.2022.102097.

DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nat Methods**, v.12, n. 8, p. 697, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3485.

EIKESDAL, H. P.; YNDESTAD, S.; ELZAWAHRY, A.; LLOP-GUEVARA, A. *et al.* Olaparib monotherapy as primary treatment in unselected triple negative breast cancer. **Ann Oncol**, v.32, n. 2, p. 240-249, 2021. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.11.009.

EL GUERRAB, A.; BAMDAD, M.; KWIATKOWSKI, F.; BIGNON, Y. J. *et al.* Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v.7, n. 45, p. 73618-73637, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.12037.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v.35, n. 4, p. 495-516, 2007. DOI: 10.1080/01926230701320337.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n. 4, p. 259-269, 2006. DOI: 10.1038/nrc1840.

FAHIM, S. A.; ABDULLAH, M. S.; ESPINOZA-SANCHEZ, N. A.; HASSAN, H. *et al.* Inflammatory Breast Carcinoma: Elevated microRNA miR-181b-5p and Reduced miR-200b-3p, miR-200c-3p, and miR-203a-3p Expression as Potential Biomarkers with Diagnostic Value. **Biomolecules**, v.10, n. 7, 2020. DOI: 10.3390/biom10071059.

FANALE, D.; INCORVAIA, L.; FILORIZZO, C.; BONO, M. *et al.* Detection of Germline Mutations in a Cohort of 139 Patients with Bilateral Breast Cancer by Multi-Gene Panel Testing: Impact of Pathogenic Variants in Other Genes beyond BRCA1/2. **Cancers (Basel)**, v.12, n. 9, 2020. DOI: 10.3390/cancers12092415.

FLEMING, A.; BOURDENX, M.; FUJIMAKI, M.; KARABIYIK, C. *et al.* The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. **Neuron**, v.110, n. 6, p. 935-966, 2022. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.01.017.

FLOBAK, A.; BAUDOT, A.; REMY, E.; THOMMESEN, L. *et al.* Discovery of Drug Synergies in Gastric Cancer Cells Predicted by Logical Modeling. **PLoS Comput Biol**, v.11, n. 8, p. e1004426, 2015. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004426.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v.363, n. 20, p. 1938-1948, 2010. DOI: 10.1056/NEJMra1001389.

FRESHNEY, A. R. L. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. New York: 1987.

FRESNO VARA, J. A.; CASADO, E.; DE CASTRO, J.; CEJAS, P. *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev**, v.30, n. 2, p. 193-204, 2004. DOI: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007.

FU, Y.; YANG, Q.; YANG, H.; ZHANG, X. New progress in the role of microRNAs in the diagnosis and prognosis of triple negative breast cancer. **Front Mol Biosci**, v.10, p. 1162463, 2023. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1162463.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v.14, n. 7, p. 1237-1243, 2007. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402148.

GALLUZZI, L.; PIETROCOLA, F.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; AMARAVADI, R. K. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **EMBO J**, v.34, n. 7, p. 856-880, 2015. DOI: 10.15252/embj.201490784.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, v.25, n. 3, p. 486-541, 2018. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.

GARRIDO-CANO, I.; ADAM-ARTIGUES, A.; LAMEIRINHAS, A.; BLANDEZ, J. F. *et al.* Delivery of miR-200c-3p Using Tumor-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Breast Cancer Therapy. **ACS Appl Mater Interfaces**, v.15, n. 32, p. 38323-38334, 2023. DOI: 10.1021/acscami.3c07541.

GATICA, D.; CHIONG, M.; LAVANDERO, S.; KLIONSKY, D. J. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. **Circ Res**, v.116, n. 3, p. 456-467, 2015. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303788.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.20, n. 1, p. 21-37, 2019. DOI: 10.1038/s41580-018-0045-7.

GHASABI, M.; MAJIDI, J.; MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A. *et al.* The effect of combined miR-200c replacement and cisplatin on apoptosis induction and inhibition of gastric cancer cell line migration. **J Cell Physiol**, v.234, n. 12, p. 22581-22592, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28823.

GHOREISHI, E.; SHAHROKHI, S. Z.; KAZEROUNI, F.; RAHIMIPOUR, A. Circulating miR-148b-3p and miR-27a-3p can be potential biomarkers for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes: integrating experimental and in-silico approaches. **BMC Endocr Disord**, v.22, n. 1, p. 207, 2022. DOI: 10.1186/s12902-022-01120-5.

GLAVIANO, A.; FOO, A. S. C.; LAM, H. Y.; YAP, K. C. H. *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. **Mol Cancer**, v.22, n. 1, p. 138, 2023. DOI: 10.1186/s12943-023-01827-6.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, v.221, n. 1, p. 3-12, 2010. DOI: 10.1002/path.2697.

GRIECO, L.; CALZONE, L.; BERNARD-PIERROT, I.; RADVANYI, F. *et al.* Integrative modelling of the influence of MAPK network on cancer cell fate decision. **PLoS Comput Biol**, v.9, n. 10, p. e1003286, 2013. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003286.

GU, H.; LIU, M.; DING, C.; WANG, X. *et al.* Hypoxia-responsive miR-124 and miR-144 reduce hypoxia-induced autophagy and enhance radiosensitivity of prostate cancer cells via suppressing PIM1. **Cancer Med**, v.5, n. 6, p. 1174-1182, 2016. DOI: 10.1002/cam4.664.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.15, n. 8, p. 509-524, 2014. DOI: 10.1038/nrm3838.

HALVORSEN, A. R.; KRISTENSEN, G.; EMBLETON, A.; ADUSEI, C. *et al.* Evaluation of Prognostic and Predictive Significance of Circulating MicroRNAs in Ovarian Cancer Patients. **Dis Markers**, v.2017, p. 3098542, 2017. DOI: 10.1155/2017/3098542.

HAN, S. A.; KIM, S. W. BRCA and Breast Cancer-Related High-Penetrance Genes. **Adv Exp Med Biol**, v.1187, p. 473-490, 2021. DOI: 10.1007/978-981-32-9620-6_25.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646-674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HAQ, S.; WANG, H.; GRONDIN, J.; BANSKOTA, S. *et al.* Disruption of autophagy by increased 5-HT alters gut microbiota and enhances susceptibility to experimental colitis and Crohn's disease. **Sci Adv**, v.7, n. 45, p. eabi6442, 2021. DOI: 10.1126/sciadv.abi6442.

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M. *et al.* Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v.5, n. 1, p. 66, 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2.

HE, L.; LIAO, L.; DU, L. miR-144-3p inhibits tumor cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma through the downregulation of the oncogenic gene, EZH2. **Int J Mol Med**, v.46, n. 2, p. 828-838, 2020. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4638.

HE, Y.; SUN, M. M.; ZHANG, G. G.; YANG, J. *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal Transduct Target Ther**, v.6, n. 1, p. 425, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00828-5.

HOGNASON, T.; CHATTERJEE, S.; VARTANIAN, T.; RATAN, R. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor induced apoptosis: potentiation by inhibition of Ras signaling. **FEBS Lett**, v.491, n. 1-2, p. 9-15, 2001. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02166-4.

HONG, D. S.; KANG, Y. K.; BORAD, M.; SACHDEV, J. *et al.* Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. **Br J Cancer**, v.122, n. 11, p. 1630-1637, 2020. DOI: 10.1038/s41416-020-0802-1.

HOWARD, F. M.; OLOPADE, O. I. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review. **Cancer J**, v.27, n. 1, p. 8-16, 2021. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000500.

HOWE, E. N.; COCHRANE, D. R.; CITTELLY, D. M.; RICHER, J. K. miR-200c targets a NF-kappaB up-regulated TrkB/NTF3 autocrine signaling loop to enhance anoikis sensitivity in triple negative breast cancer. **PLoS One**, v.7, n. 11, p. e49987, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0049987.

HOXHAI, G.; MANNING, B. D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nat Rev Cancer**, v.20, n. 2, p. 74-88, 2020. DOI: 10.1038/s41568-019-0216-7.

HUA, F.; XIAO, Y. Y.; QU, X. H.; LI, S. S. *et al.* Baicalein sensitizes triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells to doxorubicin via autophagy-mediated down-regulation of

CDK1. **Mol Cell Biochem**, v.478, n. 7, p. 1519-1531, 2023. DOI: 10.1007/s11010-022-04597-9.

HUDIS, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. **N Engl J Med**, v.357, n. 1, p. 39-51, 2007. DOI: 10.1056/NEJMra043186.

IARC. **Breast cancer screening**. Lyon: WHO Press, 2016. 978-92-832-3017-5.

INC, T. F. S. **LIPOFECTAMINE RNAiMAX Transfection Reagent: *in vitro* delivery of siRNA**. 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/pt/home/life-science/cellculture/transfection/transfection-reagents/lipofectamine-rnaimax-reagent.html#protocol>. Acesso em: 08 mai. 2023.

INCA. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA. Estimativa | 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: RJ OFFSET: 160 p. 2022.

INCA. **Detecção precoce**. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/acoes/deteccao-precoce#:~:text=No%20Brasil%2C%20conforme%20as%20Diretrizes,mortalidade%20por%20c%3%A2ncer%20de%20mama>. Acesso em: 08 de jul. 2024.

ISSLER, M. V. C. **Modelo da influência de miRNAs nas vias de autofagia e apoptose em câncer de mama triplo negativo**. Orientador: PASA, A. A. 2021. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

IWAKAWA, H. O.; TOMARI, Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. **Mol Cell**, v.82, n. 1, p. 30-43, 2022. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.11.026.

IWASAKI, S.; KOBAYASHI, M.; YODA, M.; SAKAGUCHI, Y. *et al.* Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. **Mol Cell**, v.39, n. 2, p. 292-299, 2010. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.05.015.

JACKSON, N. M.; CERESA, B. P. EGFR-mediated apoptosis via STAT3. **Exp Cell Res**, v.356, n. 1, p. 93-103, 2017. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.04.016.

JAGSI R, K. T., LEHMAN C, MORROW M, HARRIS JR, BURSTEIN HJ. Chapter 79: Malignant Tumors of the Breast. *In*: DEVITA VT, L. T., ROSENBERG SA (Ed.). **DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 11th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2019.

JIN, H.; XUE, L.; MO, L.; ZHANG, D. *et al.* Downregulation of miR-200c stabilizes XIAP mRNA and contributes to invasion and lung metastasis of bladder cancer. **Cell Adh Migr**, v.13, n. 1, p. 236-248, 2019. DOI: 10.1080/19336918.2019.1633851.

JUNG, S.; JEONG, H.; YU, S. W. Autophagy as a decisive process for cell death. **Exp Mol Med**, v.52, n. 6, p. 921-930, 2020. DOI: 10.1038/s12276-020-0455-4.

KAHRAMAN, M.; ROSKE, A.; LAUFER, T.; FEHLMANN, T. *et al.* MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer. **Sci Rep**, v.8, n. 1, p. 11584, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-29917-2.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**, v.28, n. 1, p. 27-30, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.

KANUGO, A.; GAUTAM, R. K.; KAMAL, M. A. Recent Advances of Nanotechnology in the Diagnosis and Therapy of Triple- Negative Breast Cancer (TNBC). **Curr Pharm Biotechnol**, v.23, n. 13, p. 1581-1595, 2022. DOI: 10.2174/1389201023666211230113658.

KAROLINA, D. S.; ARMUGAM, A.; TAVINTHARAN, S.; WONG, M. T. *et al.* MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. **PLoS One**, v.6, n. 8, p. e22839, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022839.

KASHYAP, D.; GARG, V. K.; GOEL, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v.125, p. 73-120, 2021. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003.

KAWAGUCHI, T.; YAN, L.; QI, Q.; PENG, X. *et al.* Overexpression of suppressive microRNAs, miR-30a and miR-200c are associated with improved survival of breast cancer patients. **Sci Rep**, v.7, n. 1, p. 15945, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-16112-y.

KESIREDDY, M.; ELSAYED, L.; SHOSTROM, V. K.; AGARWAL, P. *et al.* Overall Survival and Prognostic Factors in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A National Cancer Database Analysis. **Cancers (Basel)**, v.16, n. 10, 2024. DOI: 10.3390/cancers16101791.

KHADKA, V. S.; NASU, M.; DENG, Y.; JIJIWA, M. Circulating microRNA Biomarker for Detecting Breast Cancer in High-Risk Benign Breast Tumors. **Int J Mol Sci**, v.24, n. 8, 2023. DOI: 10.3390/ijms24087553.

KHING, T. M.; CHOI, W. S.; KIM, D. M.; PO, W. W. *et al.* The effect of paclitaxel on apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe in AGS cells. **Sci Rep**, v.11, n. 1, p. 23490, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-02503-9.

KIM, E.; KIM, J. Y.; LEE, J. Y. Mathematical Modeling of p53 Pathways. **Int J Mol Sci**, v.20, n. 20, 2019. DOI: 10.3390/ijms20205179.

KIM, J. S.; LEE, J. H.; JEON, S. R.; KIM, Y. *et al.* Identification of Genes Involved in EGF-induced Apoptosis Using CRISPR/Cas9 Knockout Screening: Implications for Novel Therapeutic Targets in EGFR-Overexpressing Cancers. **Cancer Res Treat**, v.55, n. 3, p. 737-745, 2023. DOI: 10.4143/crt.2022.1414.

- KING, J.; EROUME, K. S.; TRUCKENMULLER, R.; GISELBRECHT, S. *et al.* Ten steps to investigate a cellular system with mathematical modeling. **PLoS Comput Biol**, v.17, n. 5, p. e1008921, 2021. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1008921.
- KLIONSKY, D. J.; ABDEL-AZIZ, A. K.; ABDEL-FATAH, S.; ABDELLATIF, M. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). **Autophagy**, v.17, n. 1, p. 1-382, 2021. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280.
- KLIONSKY, D. J.; PETRONI, G.; AMARAVADI, R. K.; BAEHRECKE, E. H. *et al.* Autophagy in major human diseases. **EMBO J**, v.40, n. 19, p. e108863, 2021. DOI: 10.15252/embj.2021108863.
- KOCATURK, N. M.; AKKOC, Y.; KIG, C.; BAYRAKTAR, O. *et al.* Autophagy as a molecular target for cancer treatment. **Eur J Pharm Sci**, v.134, p. 116-137, 2019. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.04.011.
- KOREN, E.; FUCHS, Y. Modes of Regulated Cell Death in Cancer. **Cancer Discov**, v.11, n. 2, p. 245-265, 2021. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0789.
- KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Res**, v.47, n. D1, p. D155-D162, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1141.
- KUMAR, P.; AGGARWAL, R. An overview of triple-negative breast cancer. **Arch Gynecol Obstet**, v.293, n. 2, p. 247-269, 2016. DOI: 10.1007/s00404-015-3859-y.
- KUTMON, M.; VAN IERSEL, M. P.; BOHLER, A.; KELDER, T. *et al.* PathVisio 3: an extendable pathway analysis toolbox. **PLoS Comput Biol**, v.11, n. 2, p. e1004085, 2015. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004085.
- LAN, F.; YU, H.; HU, M.; XIA, T. *et al.* miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met. **J Neurochem**, v.135, n. 2, p. 274-286, 2015. DOI: 10.1111/jnc.13272.
- LE NOVÈRE, N. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. **Nat Rev Genet**, v.16, n. 3, p. 146-158, 2015. DOI: 10.1038/nrg3885.
- LEE, D. Y.; LEE, S. Y.; YUN, S. H.; JEONG, J. W. *et al.* Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. **Food Sci Anim Resour**, v.42, n. 5, p. 775-799, 2022. DOI: 10.5851/kosfa.2022.e46.
- LEE, J. Current Treatment Landscape for Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). **J Clin Med**, v.12, n. 4, 2023. DOI: 10.3390/jcm12041524.
- LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H. *et al.* The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. **Nature**, v.425, n. 6956, p. 415-419, 2003. DOI: 10.1038/nature01957.
- LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J. T.; KIM, S. *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **EMBO J**, v.21, n. 17, p. 4663-4670, 2002. DOI: 10.1093/emboj/cdf476.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol**, v.4, p. 199-227, 2009. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222.

LEFEBVRE, C.; PELLIZZARI, S.; BHAT, V.; JURCIC, K. *et al.* Involvement of the AKT Pathway in Resistance to Erlotinib and Cabozantinib in Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines. **Biomedicines**, v.11, n. 9, 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11092406.

LEHMANN, B. D.; BAUER, J. A.; CHEN, X.; SANDERS, M. E. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest**, v.121, n. 7, p. 2750-2767, 2011. DOI: 10.1172/JCI45014.

LEVY, J. M. M.; TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Targeting autophagy in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.17, n. 9, p. 528-542, 2017. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.

LI, M.; GAO, M.; XIE, X.; ZHANG, Y. *et al.* MicroRNA-200c reverses drug resistance of human gastric cancer cells by targeting regulation of the NER-ERCC3/4 pathway. **Oncol Lett**, v.18, n. 1, p. 145-152, 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.10304.

LI, T.; TANG, C.; HUANG, Z.; YANG, L. *et al.* miR-144-3p inhibited the growth, metastasis and epithelial-mesenchymal transition of colorectal adenocarcinoma by targeting ZEB1/2. **Aging (Albany NY)**, v.13, n. 13, p. 17349-17369, 2021. DOI: 10.18632/aging.203225.

LI, T.; ZHAO, P.; LI, Z.; WANG, C. C. *et al.* miR-200c-3p Suppresses the Proliferative, Migratory, and Invasive Capacities of Nephroblastoma Cells via Targeting FRS2. **Biopreserv Biobank**, v.17, n. 5, p. 444-451, 2019. DOI: 10.1089/bio.2019.0009.

LI, X.; CHEN, W.; LI, R.; CHEN, X. *et al.* Bladder cancer diagnosis with a four-miRNA panel in serum. **Future Oncol**, v.18, n. 29, p. 3311-3322, 2022. DOI: 10.2217/fon-2022-0448.

LI, X.; HE, S.; MA, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. **Mol Cancer**, v.19, n. 1, p. 12, 2020. DOI: 10.1186/s12943-020-1138-4.

LI, X.; ZOU, W.; WANG, Y.; LIAO, Z. *et al.* Plasma-based microRNA signatures in early diagnosis of breast cancer. **Mol Genet Genomic Med**, v.8, n. 5, p. e1092, 2020. DOI: 10.1002/mgg3.1092.

LI, Y.; ZHANG, H.; MERKHER, Y.; CHEN, L. *et al.* Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **J Hematol Oncol**, v.15, n. 1, p. 121, 2022. DOI: 10.1186/s13045-022-01341-0.

LIANG, G.; MENG, W.; HUANG, X.; ZHU, W. *et al.* miR-196b-5p-mediated downregulation of TSPAN12 and GATA6 promotes tumor progression in non-small cell lung cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.117, n. 8, p. 4347-4357, 2020. DOI: 10.1073/pnas.1917531117.

LIAO, K. L.; WATT, K. D. Mathematical modeling for the combination treatment of IFN-gamma and anti-PD-1 in cancer immunotherapy. **Math Biosci**, v.353, p. 108911, 2022. DOI: 10.1016/j.mbs.2022.108911.

LIN, J.; LIU, C.; GAO, F.; MITCHEL, R. E. *et al.* miR-200c enhances radiosensitivity of human breast cancer cells. **J Cell Biochem**, v.114, n. 3, p. 606-615, 2013. DOI: 10.1002/jcb.24398.

LIN, S.; SUN, C.; LI, R.; LU, C. *et al.* The value of a three-microRNA panel in serum for prostate cancer screening. **Int J Biol Markers**, v.39, n. 1, p. 70-79, 2024. DOI: 10.1177/03936155231213660.

LITTON, J. K.; BECK, J. T.; JONES, J. M.; ANDERSEN, J. *et al.* Neoadjuvant Talazoparib in Patients With Germline BRCA1/2 Mutation-Positive, Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer: Results of a Phase II Study. **Oncologist**, v.28, n. 10, p. 845-855, 2023. DOI: 10.1093/oncolo/oyad139.

LIU, C.; YANG, Z.; DENG, Z.; ZHOU, Y. *et al.* Downregulated miR-144-3p contributes to progression of lung adenocarcinoma through elevating the expression of EZH2. **Cancer Med**, v.7, n. 11, p. 5554-5566, 2018. DOI: 10.1002/cam4.1714.

LIU, J.; FENG, L.; ZHANG, H.; ZHANG, J. *et al.* Effects of miR-144 on the sensitivity of human anaplastic thyroid carcinoma cells to cisplatin by autophagy regulation. **Cancer Biol Ther**, v.19, n. 6, p. 484-496, 2018. DOI: 10.1080/15384047.2018.1433502.

LIU, L.; HAO, X.; SONG, Z.; ZHI, X. *et al.* Correlation between family history and characteristics of breast cancer. **Sci Rep**, v.11, n. 1, p. 6360, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-85899-8.

LIU, N.; JIANG, F.; HAN, X. Y.; LI, M. *et al.* MiRNA-155 promotes the invasion of colorectal cancer SW-480 cells through regulating the Wnt/beta-catenin. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.22, n. 1, p. 101-109, 2018. DOI: 10.26355/eurev_201801_14106.

LIU, S.; YAO, S.; YANG, H.; LIU, S. *et al.* Autophagy: Regulator of cell death. **Cell Death Dis**, v.14, n. 10, p. 648, 2023. DOI: 10.1038/s41419-023-06154-8.

LIU, Y.; JEON, S. M.; CATERINA, M. J.; QU, L. miR-544-3p mediates arthritis pain through regulation of FcγRI. **Pain**, v.163, n. 8, p. 1497-1510, 2022. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000002531.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Q.; XU, R. *et al.* MiR-200c-3p and miR-485-5p overexpression elevates cisplatin sensitivity and suppresses the malignant phenotypes of non-small cell lung cancer cells through targeting RRM2. **Thorac Cancer**, v.13, n. 13, p. 1974-1985, 2022. DOI: 10.1111/1759-7714.14475.

LIU, Y.; ZHU, S. T.; WANG, X.; DENG, J. *et al.* MiR-200c regulates tumor growth and chemosensitivity to cisplatin in osteosarcoma by targeting AKT2. **Sci Rep**, v.7, n. 1, p. 13598, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-14088-3.

LIU, Z.; WANG, H.; HU, C.; WU, C. *et al.* Targeting autophagy enhances atezolizumab-induced mitochondria-related apoptosis in osteosarcoma. **Cell Death Dis**, v.12, n. 2, p. 164, 2021. DOI: 10.1038/s41419-021-03449-6.

LOAP, P.; LOIRAT, D.; BERGER, F.; RODRIGUES, M. *et al.* Concurrent Olaparib and Radiotherapy in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: The Phase 1 Olaparib and Radiation Therapy for Triple-Negative Breast Cancer Trial. **JAMA Oncol**, v.8, n. 12, p. 1802-1808, 2022. DOI: 10.1001/jamaoncol.2022.5074.

LOIBL, S.; ANDRE, F.; BACHELOT, T.; BARRIOS, C. H. *et al.* Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v.35, n. 2, p. 159-182, 2024. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.11.016.

LOPICCOLO, J.; BLUMENTHAL, G. M.; BERNSTEIN, W. B.; DENNIS, P. A. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. **Drug Resist Updat**, v.11, n. 1-2, p. 32-50, 2008. DOI: 10.1016/j.drug.2007.11.003.

LU, G.; WANG, Y.; SHI, Y.; ZHANG, Z. *et al.* Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target. **MedComm (2020)**, v.3, n. 3, p. e150, 2022. DOI: 10.1002/mco2.150.

LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E. A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v.435, n. 7043, p. 834-838, 2005. DOI: 10.1038/nature03702.

LU, Y.; ZHANG, B.; WANG, B.; WU, D. *et al.* MiR-144-3p inhibits gastric cancer progression and stemness via directly targeting GLI2 involved in hedgehog pathway. **J Transl Med**, v.19, n. 1, p. 432, 2021. DOI: 10.1186/s12967-021-03093-w.

LUKASIEWICZ, S.; CZECZELEWSKI, M.; FORMA, A.; BAJ, J. *et al.* Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. **Cancers (Basel)**, v.13, n. 17, 2021. DOI: 10.3390/cancers13174287.

LUO, D.; WILSON, J. M.; HARVEL, N.; LIU, J. *et al.* A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. **J Transl Med**, v.11, p. 57, 2013. DOI: 10.1186/1479-5876-11-57.

MA, Y.; SHE, X. G.; MING, Y. Z.; WAN, Q. Q. *et al.* MicroRNA-144 suppresses tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by targeting AKT3. **Mol Med Rep**, v.11, n. 2, p. 1378-1383, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2014.2844.

MADHAVAN, D.; PENG, C.; WALLWIENER, M.; ZUCKNICK, M. *et al.* Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. **Carcinogenesis**, v.37, n. 5, p. 461-470, 2016. DOI: 10.1093/carcin/bgw008.

MAGNANO, S.; HANNON BARROETA, P.; DUFFY, R.; O'SULLIVAN, J. *et al.* Cisplatin induces autophagy-associated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) mediated in part through reactive oxygen species. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.427, p. 115646, 2021. DOI: 10.1016/j.taap.2021.115646.

MALHOTRA, G. K.; ZHAO, X.; BAND, H.; BAND, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther**, v.10, n. 10, p. 955-960, 2010. DOI: 10.4161/cbt.10.10.13879.

MAOLAKUERBAN, N.; AZHATI, B.; TUSONG, H.; ABULA, A. *et al.* MiR-200c-3p inhibits cell migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma via regulating SLC6A1. **Cancer Biol Ther**, v.19, n. 4, p. 282-291, 2018. DOI: 10.1080/15384047.2017.1394551.

MARTINS, I.; RAZA, S. Q.; VOISIN, L.; DAKHLI, H. *et al.* Anticancer chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-autonomous death. **Cell Death Dis**, v.9, n. 7, p. 716, 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0747-y.

MOKHTARI, F.; KABOOSI, H.; MOHEBBI, S. R.; ASADZADEH AGHDAEI, H. *et al.* Circulating Plasma miR-122 and miR-583 Levels Are Involved in Chronic Hepatitis B Virus Pathogenesis and Serve As Novel Diagnostic Biomarkers. **Genet Test Mol Biomarkers**, v.27, n. 8, p. 232-238, 2023. DOI: 10.1089/gtmb.2023.0013.

MOMBACH, J. C.; BUGS, C. A.; CHAOUIYA, C. Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint. **BMC Genomics**, v.15 Suppl 7, n. Suppl 7, p. S7, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-S7-S7.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v.11, p. 151-164, 2019. DOI: 10.2147/BCTT.S176070.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MULCAHY LEVY, J. M.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. **Cell Death Differ**, v.27, n. 3, p. 843-857, 2020. DOI: 10.1038/s41418-019-0474-7.

NAELI, P.; WINTER, T.; HACKETT, A. P.; ALBOUSHI, L. *et al.* The intricate balance between microRNA-induced mRNA decay and translational repression. **FEBS J**, v.290, n. 10, p. 2508-2524, 2023. DOI: 10.1111/febs.16422.

NAKAI, K.; HUNG, M. C.; YAMAGUCHI, H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. **Am J Cancer Res**, v.6, n. 8, p. 1609-1623, 2016.

NANDA, R.; CHOW, L. Q.; DEES, E. C.; BERGER, R. *et al.* Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. **J Clin Oncol**, v.34, n. 21, p. 2460-2467, 2016. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.8931.

NAVARRO-MANZANO, E.; LUENGO-GIL, G.; GONZALEZ-CONEJERO, R.; GARCIA-GARRE, E. *et al.* Prognostic and Predictive Effects of Tumor and Plasma miR-200c-3p in Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer. **Cancers (Basel)**, v.14, n. 10, 2022. DOI: 10.3390/cancers14102390.

NGUYEN, T. A.; JO, M. H.; CHOI, Y. G.; PARK, J. *et al.* Functional Anatomy of the Human Microprocessor. **Cell**, v.161, n. 6, p. 1374-1387, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.010.

NISHIHARA, S.; YAMAOKA, T.; ISHIKAWA, F.; HIGUCHI, K. *et al.* Mechanisms of EGFR-TKI-Induced Apoptosis and Strategies Targeting Apoptosis in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. **Genes (Basel)**, v.13, n. 12, 2022. DOI: 10.3390/genes13122183.

NOGUCHI, M.; HIRATA, N.; TANAKA, T.; SUIZU, F. *et al.* Autophagy as a modulator of cell death machinery. **Cell Death Dis**, v.11, n. 7, p. 517, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-2724-5.

NOGUEIRA, V.; PARK, Y.; CHEN, C. C.; XU, P. Z. *et al.* Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. **Cancer Cell**, v.14, n. 6, p. 458-470, 2008. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.11.003.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.9, p. 402, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

OH, S. J.; LEE, M. S. Role of Autophagy in the Pathogenesis of Diabetes and Therapeutic Potential of Autophagy Modulators in the Treatment of Diabetes and Metabolic Syndrome. **J Korean Med Sci**, v.37, n. 37, p. e276, 2022. DOI: 10.3346/jkms.2022.37.e276.

ONORATI, A. V.; DYCZYNSKI, M.; OJHA, R.; AMARAVADI, R. K. Targeting autophagy in cancer. **Cancer**, v.124, n. 16, p. 3307-3318, 2018. DOI: 10.1002/cncr.31335.

PALUCH-SHIMON, S.; CARDOSO, F.; SESSA, C.; BALMANA, J. *et al.* Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. **Ann Oncol**, v.27, n. suppl 5, p. v103-v110, 2016. DOI: 10.1093/annonc/mdw327.

PAN, Y.; ZHANG, J.; FU, H.; SHEN, L. miR-144 functions as a tumor suppressor in breast cancer through inhibiting ZEB1/2-mediated epithelial mesenchymal transition process. **Oncotargets Ther**, v.9, p. 6247-6255, 2016. DOI: 10.2147/OTT.S103650.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduct Target Ther**, v.1, p. 15004, 2016. DOI: 10.1038/sigtrans.2015.4.

PEREZ, R. E.; CALHOUN, S.; SHIM, D.; LEVENSON, V. V. *et al.* Prolyl endopeptidase inhibitor Y-29794 blocks the IRS1-AKT-mTORC1 pathway and inhibits survival and in vivo tumor growth of triple-negative breast cancer. **Cancer Biol Ther**, v.21, n. 11, p. 1033-1040, 2020. DOI: 10.1080/15384047.2020.1824989.

PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **Oncologist**, v.15 Suppl 5, p. 39-48, 2010. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-S5-39.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, n. 6797, p. 747-752, 2000. DOI: 10.1038/35021093.

POLYTARCHOU, C.; HATZIAPOSTOULOU, M.; YAU, T. O.; CHRISTODOULOU, N. *et al.* Akt3 induces oxidative stress and DNA damage by activating the NADPH oxidase via phosphorylation of p47(phox). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.117, n. 46, p. 28806-28815, 2020. DOI: 10.1073/pnas.2017830117.

PONTI, G.; DE ANGELIS, C.; PONTI, R.; PONGETTI, L. *et al.* Hereditary breast and ovarian cancer: from genes to molecular targeted therapies. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.60, n. 8, p. 640-650, 2023. DOI: 10.1080/10408363.2023.2234488.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol**, v.4, p. 64, 2014. DOI: 10.3389/fonc.2014.00064.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; FAN, C. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v.12, n. 5, p. R68, 2010. DOI: 10.1186/bcr2635.

PUSZTAI, L.; DENKERT, C.; O'SHAUGHNESSY, J.; CORTES, J. *et al.* Event-free survival by residual cancer burden with pembrolizumab in early-stage TNBC: exploratory analysis from KEYNOTE-522. **Ann Oncol**, v.35, n. 5, p. 429-436, 2024. DOI: 10.1016/j.annonc.2024.02.002.

QIAN, H.; CHAO, X.; WILLIAMS, J.; FULTE, S. *et al.* Autophagy in liver diseases: A review. **Mol Aspects Med**, v.82, p. 100973, 2021. DOI: 10.1016/j.mam.2021.100973.

QIU, M.; LIANG, Z.; CHEN, L.; TAN, G. *et al.* MicroRNA-200c suppresses cell growth and metastasis by targeting Bmi-1 and E2F3 in renal cancer cells. **Exp Ther Med**, v.13, n. 4, p. 1329-1336, 2017. DOI: 10.3892/etm.2017.4147.

RACANELLI, A. C.; KIKKERS, S. A.; CHOI, A. M. K.; CLOONAN, S. M. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. **Autophagy**, v.14, n. 2, p. 221-232, 2018. DOI: 10.1080/15548627.2017.1389823.

RAKHA, E. A.; TSE, G. M.; QUINN, C. M. An update on the pathological classification of breast cancer. **Histopathology**, v.82, n. 1, p. 5-16, 2023. DOI: 10.1111/his.14786.

REN, R.; YUAN, Z.; XU, Z. miRNA-144 targeting DNAJC3-AS1 reverses the resistance of the breast cancer cell line Michigan Cancer Foundation-7 to doxorubicin. **Bioengineered**, v.12, n. 2, p. 9885-9892, 2021. DOI: 10.1080/21655979.2021.1999373.

REN, Y.; HAN, X.; YU, K.; SUN, S. *et al.* microRNA-200c downregulates XIAP expression to suppress proliferation and promote apoptosis of triple-negative breast cancer cells. **Mol Med Rep**, v.10, n. 1, p. 315-321, 2014. DOI: 10.3892/mmr.2014.2222.

RONTOGIANNI, S.; ISKIT, S.; VAN DOORN, S.; PEEPER, D. S. *et al.* Combined EGFR and ROCK Inhibition in Triple-negative Breast Cancer Leads to Cell Death Via Impaired Autophagic Flux. **Mol Cell Proteomics**, v.19, n. 2, p. 261-277, 2020. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001800.

RUGO, H. S.; ANDRE, F.; YAMASHITA, T.; CERDA, H. *et al.* Time course and management of key adverse events during the randomized phase III SOLAR-1 study of PI3K inhibitor alpelisib plus fulvestrant in patients with HR-positive advanced breast cancer. **Ann Oncol**, v.31, n. 8, p. 1001-1010, 2020. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.05.001.

RUNWAL, G.; STAMATAKOU, E.; SIDDIQI, F. H.; PURI, C. *et al.* LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. **Sci Rep**, v.9, n. 1, p. 10147, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46657-z.

SADAT-EBRAHIMI, S. R.; REZABAKHSH, A.; ASLANABADI, N.; ASADI, M. *et al.* Novel diagnostic potential of miR-1 in patients with acute heart failure. **PLoS One**, v.17, n. 9, p. e0275019, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0275019.

SAFA, A. R. Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy. **J Carcinog Mutagen**, v.Suppl 6, 2013. DOI: 10.4172/2157-2518.S6-003.

SAFAEI, S.; AMINI, M.; NAJJARY, S.; MOKHTARZADEH, A. *et al.* miR-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to Doxorubicin through downregulating MDR1 gene. **Exp Mol Pathol**, v.125, p. 104753, 2022. DOI: 10.1016/j.yexmp.2022.104753.

SAI, S.; KIM, E. H.; KOOM, W. S.; VARES, G. *et al.* Carbon-Ion Beam Irradiation and the miR-200c Mimic Effectively Eradicate Pancreatic Cancer Stem Cells Under in vitro and in vivo Conditions. **Onco Targets Ther**, v.14, p. 4749-4760, 2021. DOI: 10.2147/OTT.S311567.

SALIMINEJAD, K.; KHORRAM KHORSHID, H. R.; SOLEYMANI FARD, S.; GHAFFARI, S. H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. **J Cell Physiol**, v.234, n. 5, p. 5451-5465, 2019. DOI: 10.1002/jcp.27486.

SANCHEZ-VEGA, F.; MINA, M.; ARMENIA, J.; CHATILA, W. K. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. **Cell**, v.173, n. 2, p. 321-337 e310, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.035.

SANLI, F.; TATAR, A.; GUNDOGDU, B.; KARATAS, O. F. IP3R1 dysregulation via mir-200c-3p/SSFA2 axis contributes to taxol resistance in head and neck cancer. **Eur J Pharmacol**, v.973, p. 176592, 2024. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176592.

SAVAS, P.; LO, L. L.; LUEN, S. J.; BLACKLEY, E. F. *et al.* Alpelisib Monotherapy for PI3K-Altered, Pretreated Advanced Breast Cancer: A Phase II Study. **Cancer Discov**, v.12, n. 9, p. 2058-2073, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1696.

SAYERS, E. W.; BOLTON, E. E.; BRISTER, J. R.; CANESE, K. *et al.* Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Res**, v.50, n. D1, p. D20-D26, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1112.

SCHMID, P.; LIPATOV, O.; IM, S. A.; GONCALVES, A. *et al.* Impact of pembrolizumab versus chemotherapy on health-related quality of life in patients with metastatic triple-negative breast cancer: results from the phase 3 randomised KEYNOTE-119 study. **Eur J Cancer**, v.195, p. 113393, 2023. DOI: 10.1016/j.ejca.2023.113393.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v.3, n. 6, p. 1101-1108, 2008. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v.9, n. 7, p. 671-675, 2012. DOI: 10.1038/nmeth.2089.

SEER, S., EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS PROGRAM. **Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer**. 2024. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. Acesso em: 08 Jul. 2024.

SERRE, R.; BENZEKRY, S.; PADOVANI, L.; MEILLE, C. *et al.* Mathematical Modeling of Cancer Immunotherapy and Its Synergy with Radiotherapy. **Cancer Res**, v.76, n. 17, p. 4931-4940, 2016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3567.

SHAN, T.; LI, L. Y.; YANG, J. M.; CHENG, Y. Role and clinical implication of autophagy in COVID-19. **Virol J**, v.20, n. 1, p. 125, 2023. DOI: 10.1186/s12985-023-02069-0.

SHANG, R.; LEE, S.; SENAVIRATHNE, G.; LAI, E. C. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. **Nat Rev Genet**, v.24, n. 12, p. 816-833, 2023. DOI: 10.1038/s41576-023-00611-y.

SHARMA, P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. **Oncologist**, v.21, n. 9, p. 1050-1062, 2016. DOI: 10.1634/theoncologist.2016-0067.

SHI, S.; TAN, P.; YAN, B.; GAO, R. *et al.* ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. **Oncol Rep**, v.35, n. 5, p. 2606-2614, 2016. DOI: 10.3892/or.2016.4680.

SIBLE, J. C.; TYSON, J. J. Mathematical modeling as a tool for investigating cell cycle control networks. **Methods**, v.41, n. 2, p. 238-247, 2007. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.08.003.

SIGMA-ALDRICH. MISSION® Synthetic miRNA Inhibitors: TECHNICAL BULLETIN. 2013.

SIMPSON, K. E.; WATSON, K. L.; MOOREHEAD, R. A. Elevated Expression of miR-200c/141 in MDA-MB-231 Cells Suppresses MXRA8 Levels and Impairs Breast Cancer Growth and Metastasis In Vivo. **Genes (Basel)**, v.13, n. 4, 2022. DOI: 10.3390/genes13040691.

SIVINA, E.; BLUMBERGA, L.; PURKALNE, G.; IRMEJS, A. Pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer - single hospital experience. **Hered Cancer Clin Pract**, v.21, n. 1, p. 4, 2023. DOI: 10.1186/s13053-023-00249-1.

SKUBNIK, J.; SVOBODOVA PAVLICKOVA, V.; RUMML, T.; RIMPELOVA, S. Autophagy in cancer resistance to paclitaxel: Development of combination strategies. **Biomed Pharmacother**, v.161, p. 114458, 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114458.

SONG, C.; LIU, L. Z.; PEI, X. Q.; LIU, X. *et al.* miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. **Oncotarget**, v.6, n. 33, p. 34968-34978, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.5198.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n. 19, p. 10869-10874, 2001. DOI: 10.1073/pnas.191367098.

SOUBANI, O.; ALI, A. S.; LOGNA, F.; ALI, S. *et al.* Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer. **Carcinogenesis**, v.33, n. 8, p. 1563-1571, 2012. DOI: 10.1093/carcin/bgs189.

STRATTON, M. R.; RAHMAN, N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. **Nat Genet**, v.40, n. 1, p. 17-22, 2008. DOI: 10.1038/ng.2007.53.

SUKUMAR, J.; GAST, K.; QUIROGA, D.; LUSTBERG, M. *et al.* Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.21, n. 2, p. 135-148, 2021. DOI: 10.1080/14737140.2021.1840984.

SUN, Q.; LIU, T.; YUAN, Y.; GUO, Z. *et al.* MiR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1. **Int J Cancer**, v.136, n. 5, p. 1003-1012, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29065.

SUN, X. B.; CHEN, Y. W.; YAO, Q. S.; CHEN, X. H. *et al.* MicroRNA-144 Suppresses Prostate Cancer Growth and Metastasis by Targeting EZH2. **Technol Cancer Res Treat**, v.20, p. 1533033821989817, 2021. DOI: 10.1177/1533033821989817.

SUN, Y. S.; ZHAO, Z.; YANG, Z. N.; XU, F. *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int J Biol Sci**, v.13, n. 11, p. 1387-1397, 2017. DOI: 10.7150/ijbs.21635.

TAO, Y.; ZHAO, Z.; MA, J.; DONG, L. *et al.* MiR-214-3p regulates the viability, invasion, migration and EMT of TNBC cells by targeting ST6GAL1. **Cytotechnology**, v.71, n. 6, p. 1155-1165, 2019. DOI: 10.1007/s10616-019-00352-z.

TASSONE, P.; DI MARTINO, M. T.; ARBITRIO, M.; FIORILLO, L. *et al.* Safety and activity of the first-in-class locked nucleic acid (LNA) miR-221 selective inhibitor in refractory advanced cancer patients: a first-in-human, phase 1, open-label, dose-escalation study. **J Hematol Oncol**, v.16, n. 1, p. 68, 2023. DOI: 10.1186/s13045-023-01468-8.

TEDALDI, G.; TEBALDI, M.; ZAMPIGA, V.; DANESI, R. *et al.* Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. **Oncotarget**, v.8, n. 29, p. 47064-47075, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.16791.

TORRES, N. V.; SANTOS, G. The (Mathematical) Modeling Process in Biosciences. **Front Genet**, v.6, p. 354, 2015. DOI: 10.3389/fgene.2015.00354.

TREDA, C.; POPEDA, M.; KSIAZKIEWICZ, M.; GRZELA, D. P. *et al.* EGFR Activation Leads to Cell Death Independent of PI3K/AKT/mTOR in an AD293 Cell Line. **PLoS One**, v.11, n. 5, p. e0155230, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0155230.

TURCHIANO, A.; PIGLIONICA, M.; MARTINO, S.; BAGNULO, R. *et al.* Impact of High-to-Moderate Penetrance Genes on Genetic Testing: Looking over Breast Cancer. **Genes (Basel)**, v.14, n. 8, 2023. DOI: 10.3390/genes14081530.

TURNER, N. C.; OLIVEIRA, M.; HOWELL, S. J.; DALENC, F. *et al.* Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. **N Engl J Med**, v.388, n. 22, p. 2058-2070, 2023. DOI: 10.1056/NEJMoa2214131.

VALINEZHAD ORANG, A.; SAFARALIZADEH, R.; KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. **Int J Genomics**, v.2014, p. 970607, 2014. DOI: 10.1155/2014/970607.

VAN WIJK, N.; ZOHAR, K.; LINIAL, M. Challenging Cellular Homeostasis: Spatial and Temporal Regulation of miRNAs. **Int J Mol Sci**, v.23, n. 24, 2022. DOI: 10.3390/ijms232416152.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J Immunol Methods**, v.243, n. 1-2, p. 167-190, 2000. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00233-7.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, v.184, n. 1, p. 39-51, 1995. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00072-i.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Ann Oncol**, v.23 Suppl 10, p. x207-210, 2012. DOI: 10.1093/annonc/mds326.

WANG, H.; HOU, L.; LI, A.; DUAN, Y. *et al.* Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. **Biomed Res Int**, v.2014, p. 864894, 2014. DOI: 10.1155/2014/864894.

WANG, P.; YANG, Z.; YE, T.; SHAO, F. *et al.* lncTUG1/miR-144-3p affect the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by competitively regulating c-MET. **J Exp Clin Cancer Res**, v.39, n. 1, p. 7, 2020. DOI: 10.1186/s13046-019-1519-y.

WANG, R. C.; WEI, Y.; AN, Z.; ZOU, Z. *et al.* Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. **Science**, v.338, n. 6109, p. 956-959, 2012. DOI: 10.1126/science.1225967.

WANG, T.; SONG, D.; LI, X.; LUO, Y. *et al.* MiR-574-5p activates human TLR8 to promote autoimmune signaling and lupus. **Cell Commun Signal**, v.22, n. 1, p. 220, 2024. DOI: 10.1186/s12964-024-01601-1.

WANG, X.; SPANDIDOS, A.; WANG, H.; SEED, B. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. **Nucleic Acids Res**, v.40, n. Database issue, p. D1144-1149, 2012. DOI: 10.1093/nar/gkr1013.

WEN, X. G., XING; WANG, SHUIHUA; LU, ZHIHAI; ZHANG, YUDONG. Breast cancer diagnosis: a systematic review. **Biocybernetics And Biomedical Engineering**, v.44, n. 1, p. 119-148, 2024. DOI: 10.1016/j.bbe.2024.01.002.

WEN, Z.; HUANG, G.; LAI, Y.; XIAO, L. *et al.* Diagnostic panel of serum miR-125b-5p, miR-182-5p, and miR-200c-3p as non-invasive biomarkers for urothelial bladder cancer. **Clin Transl Oncol**, v.24, n. 5, p. 909-918, 2022. DOI: 10.1007/s12094-021-02741-3.

WHO. **Cancer**. 2024a. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer>. Acesso em: 22 mai. 2024.

WHO. **Global cancer burden growing, amidst mounting need for services**. 2024b. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Acesso em: 22 mai. 2024.

WIRAWAN, E.; VANDE WALLE, L.; KERSSE, K.; CORNELIS, S. *et al.* Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. **Cell Death Dis**, v.1, n. 1, p. e18, 2010. DOI: 10.1038/cddis.2009.16.

WU, M. Y.; LIU, L.; WANG, E. J.; XIAO, H. T. *et al.* PI3KC3 complex subunit NRBF2 is required for apoptotic cell clearance to restrict intestinal inflammation. **Autophagy**, v.17, n. 5, p. 1096-1111, 2021. DOI: 10.1080/15548627.2020.1741332.

WU, S. Q.; HE, H. Q.; KANG, Y.; XU, R. *et al.* MicroRNA-200c affects bladder cancer angiogenesis by regulating the Akt2/mTOR/HIF-1 axis. **Transl Cancer Res**, v.8, n. 8, p. 2713-2724, 2019. DOI: 10.21037/tcr.2019.10.23.

WU, X.; CUI, C. L.; CHEN, W. L.; FU, Z. Y. *et al.* miR-144 suppresses the growth and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting IRS1. **Am J Transl Res**, v.8, n. 1, p. 1-11, 2016.

WU, Y. T., H. W. S.; LIN, J.; SHEN, H.; WANG, H.; LU, G. Molecular mechanisms of autophagy and implications in liver diseases. **Liver Research**, v.7, n. 1, p. 56-70, 2023. DOI: 10.1016/j.livres.2023.02.002.

XILOURI, M.; BREKK, O. R.; POLISSIDIS, A.; CHRYSANTHOU-PITEROU, M. *et al.* Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats. **Autophagy**, v.12, n. 11, p. 2230-2247, 2016. DOI: 10.1080/15548627.2016.1214777.

XU, G.; THIELEN, L. A.; CHEN, J.; GRAYSON, T. B. *et al.* Serum miR-204 is an early biomarker of type 1 diabetes-associated pancreatic beta-cell loss. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.317, n. 4, p. E723-E730, 2019. DOI: 10.1152/ajpendo.00122.2019.

YANG, J.; NIE, J.; MA, X.; WEI, Y. *et al.* Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. **Mol Cancer**, v.18, n. 1, p. 26, 2019. DOI: 10.1186/s12943-019-0954-x.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v.13, p. 134, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v.17, n. 24, p. 3011-3016, 2003. DOI: 10.1101/gad.1158803.

YIN, Y.; CAI, J.; MENG, F.; SUI, C. *et al.* MiR-144 suppresses proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells through inhibiting CEP55. **Cancer Biol Ther**, v.19, n. 4, p. 306-315, 2018. DOI: 10.1080/15384047.2017.1416934.

YIP, H. Y. K.; PAPA, A. Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. **Cells**, v.10, n. 3, 2021. DOI: 10.3390/cells10030659.

YOSHII, S. R.; MIZUSHIMA, N. Monitoring and Measuring Autophagy. **Int J Mol Sci**, v.18, n. 9, 2017. DOI: 10.3390/ijms18091865.

YOU, B.; ZHANG, K. C. MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in castration-resistant prostate cancer by targeting CEP55. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.22, n. 22, p. 7660-7670, 2018. DOI: 10.26355/eurrev_201811_16383.

YU, L.; CHEN, Y.; TOOZE, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. **Autophagy**, v.14, n. 2, p. 207-215, 2018. DOI: 10.1080/15548627.2017.1378838.

YUAN, J.; OFENGEIM, D. A guide to cell death pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.25, n. 5, p. 379-395, 2024. DOI: 10.1038/s41580-023-00689-6.

ZHANG, D. D.; LI, Y.; XU, Y.; KIM, J. *et al.* Phosphodiesterase 7B/microRNA-200c relationship regulates triple-negative breast cancer cell growth. **Oncogene**, v.38, n. 7, p. 1106-1120, 2019. DOI: 10.1038/s41388-018-0499-2.

ZHANG, J.; LI, G.; CHEN, Y.; FANG, L. *et al.* Metformin Inhibits Tumorigenesis and Tumor Growth of Breast Cancer Cells by Upregulating miR-200c but Downregulating AKT2 Expression. **J Cancer**, v.8, n. 10, p. 1849-1864, 2017. DOI: 10.7150/jca.19858.

ZHANG, X.; GE, Y. W.; WANG, Z. X.; XU, Q. L. *et al.* MiR-200c regulates apoptosis of placental trophoblasts in preeclampsia rats through Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.23, n. 17, p. 7209-7216, 2019. DOI: 10.26355/eurrev_201909_18822.

ZHAO, G. Z.; NIU, Y. Q.; LI, Z. M.; KOU, D. *et al.* MiR-200c inhibits proliferation and promotes apoptosis of Wilms tumor cells by regulating akt signaling pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.24, n. 12, p. 6623-6631, 2020. DOI: 10.26355/eurrev_202006_21648.

ZHAO, Y.; HU, X.; LIU, Y.; DONG, S. *et al.* ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Mol Cancer**, v.16, n. 1, p. 79, 2017. DOI: 10.1186/s12943-017-0648-1.

ZHOU, G.; ZHANG, F.; GUO, Y.; HUANG, J. *et al.* miR-200c enhances sensitivity of drug-resistant non-small cell lung cancer to gefitinib by suppression of PI3K/Akt signaling pathway and inhibites cell migration via targeting ZEB1. **Biomed Pharmacother**, v.85, p. 113-119, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.100.

ZHOU, J.; LIU, R. Upregulation of miR-144-3p expression attenuates glioma cell viability and invasion by targeting BCL6. **Exp Ther Med**, v.22, n. 4, p. 1157, 2021. DOI: 10.3892/etm.2021.10591.

ZHOU, Y.; SHEN, S. MiR-520f acts as a biomarker for the diagnosis of lung cancer. **Medicine (Baltimore)**, v.98, n. 30, p. e16546, 2019. DOI: 10.1097/MD.00000000000016546.

ZHU, W.; XU, H.; ZHU, D.; ZHI, H. *et al.* miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.69, n. 3, p. 723-731, 2012. DOI: 10.1007/s00280-011-1752-3.

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Front Pharmacol**, v.11, p. 632079, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.632079.

ANEXO A – Genes alvos de miR-200c-3p na via de apoptose

Gene (sigla)	Target score	Posição de interação
AIFM1	0.92	3UTR
AKT2	1.00	3UTR
AKT3	1.00	3UTR
ATM	1.00	3UTR
BAX	0.92	3UTR
BID	0.85	3UTR
BIRC3	0.92	3UTR
CASP2	0.92	3UTR
CASP3	0.85	3UTR
CASP9	0.85	3UTR
CFLAR	1.00	3UTR
CSF2RB	0.85	3UTR
CTSC	1.00	3UTR
CTSH	1.00	3UTR
CTSS	0.82	3UTR
DFFA	0.92	3UTR
DFFB	0.92	3UTR
EIF2S1	0.85	3UTR
FADD	0.92	3UTR
FASLG	1.00	3UTR
HRK	0.92	3UTR
IKBKB	1.00	3UTR
IKBKG	0.85	3UTR
IL3	1.00	3UTR
LMNB1	0.82	3UTR
MAP2K1	0.92	3UTR
MAPK8	1.00	3UTR
NFKB1	0.85	3UTR
PARP3	0.85	3UTR
PDPK1	0.85	3UTR

Gene (sigla)	<i>Target score</i>	Posição de interação
PIK3CB	0.85	3UTR
PIK3R1	0.85	3UTR
TP53AIP1	0.85	3UTR
TRAF1	0.92	3UTR
TUBAL3	0.85	3UTR
XIAP	1.00	3UTR
APAF1	0.92	5UTR
BCL2	0.81	5UTR
DIABLO	1.00	5UTR
ENDOG	0.85	5UTR
JUN	0.92	5UTR
NFKB1	0.92	5UTR
PIK3CB	0.92	5UTR
PIK3R1	0.92	5UTR
PIK3R3	0.92	5UTR
TUBA1A	1.00	5UTR

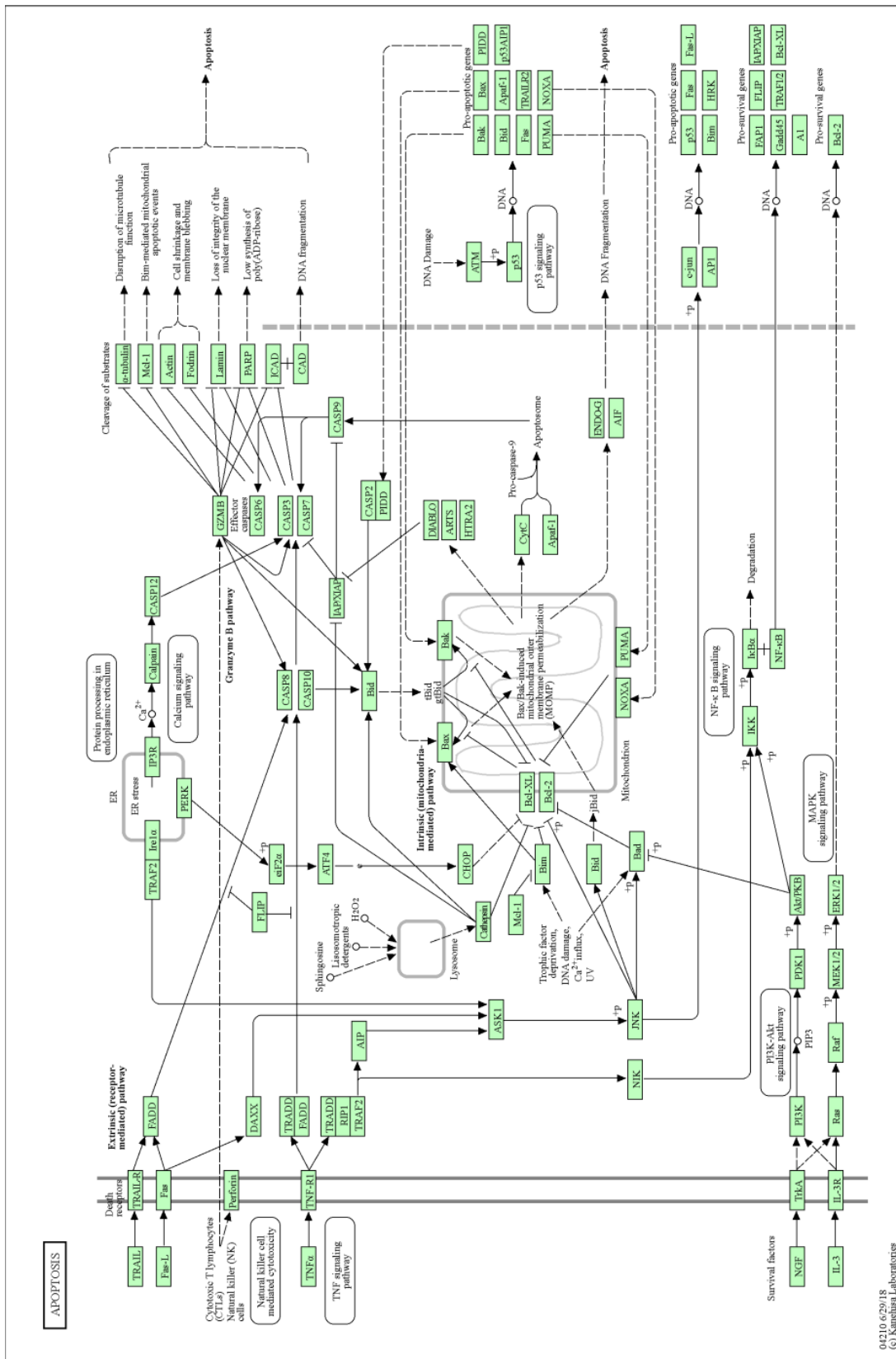
Observação: em caso de duplicidade de genes alvo na mesma posição de interação, foi considerado apenas o maior valor de *target score*. Conteúdo adaptado da base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015).

ANEXO B – Genes alvos de miR-144-3p na via de apoptose

Gene (sigla)	<i>Target score</i>	Posição de interação
AKT3	0.85	3UTR
BIRC5	0.85	3UTR
CASP3	0.85	3UTR
CTSV	1.00	3UTR
FAS	0.85	3UTR
MAPK10	0.85	3UTR
MAPK8	0.83	3UTR
MAPK9	1.00	3UTR
PTPN13	0.85	3UTR
TNFSF10	0.96	3UTR
PIK3R1	0.92	5UTR

Observação: em caso de duplicidade de genes alvo na mesma posição de interação, foi considerado apenas o maior valor de *target score*. Conteúdo adaptado da base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015).

ANEXO C – Via de apoptose (KEGG PATHWAY)



Fonte: Kanehisa e Goto (2000)

ANEXO D - Genes alvos de miR-200c-3p na via de autofagia

Gene (sigla)	Target score	Posição de interação
AKT2	1.00	3UTR
AKT3	1.00	3UTR
ATG14	1.00	3UTR
ATG16L2	1.00	3UTR
BECN1	0.92	3UTR
CALCOCO2	1.00	3UTR
CFLAR	1.00	3UTR
DAPK1	1.00	3UTR
DAPK2	0.97	3UTR
EIF2S1	0.85	3UTR
GORASP1	0.92	3UTR
HIF1A	0.92	3UTR
HMGB1	1.00	3UTR
LAMP2	0.92	3UTR
MAP1LC3A	0.85	3UTR
MAP2K1	0.92	3UTR
MAPK8	1.00	3UTR
MTMR3	1.00	3UTR
PDPK1	0.85	3UTR
PIK3CB	0.85	3UTR
PIK3R1	0.85	3UTR
PPP2CA	0.92	3UTR
PRKAA2	0.85	3UTR
PRKACB	0.92	3UTR
PRKCQ	0.87	3UTR
PTEN	1.00	3UTR
RAB39B	0.85	3UTR
RAB7A	0.92	3UTR
RAB7B	0.92	3UTR
RPS6KB1	1.00	3UTR

Gene (sigla)	Target score	Posição de interação
RRAGA	0.92	3UTR
RRAGD	0.92	3UTR
SNAP29	0.92	3UTR
STK11	0.92	3UTR
STX7	0.85	3UTR
TP53INP2	1.00	3UTR
TRAF6	1.00	3UTR
TSC1	1.00	3UTR
UBA52	0.85	3UTR
ULK2	0.92	3UTR
YKT6	1.00	3UTR
AKT1S1	0.85	5UTR
ATG2A	0.92	5UTR
ATG4C	0.85	5UTR
BCL2	0.81	5UTR
GORASP1	0.92	5UTR
MLST8	0.85	5UTR
MRAS	1.00	5UTR
NRBF2	0.92	5UTR
PIK3CB	0.92	5UTR
PIK3R1	0.92	5UTR
PIK3R3	0.92	5UTR
PRKACA	0.85	5UTR
RAB33B	1.00	5UTR
RB1CC1	0.92	5UTR
RPS27A	0.85	5UTR
RRAS2	0.85	5UTR
SUPT20H	0.92	5UTR
TBK1	0.92	5UTR
ULK2	0.85	5UTR
WIPI1	1.00	5UTR

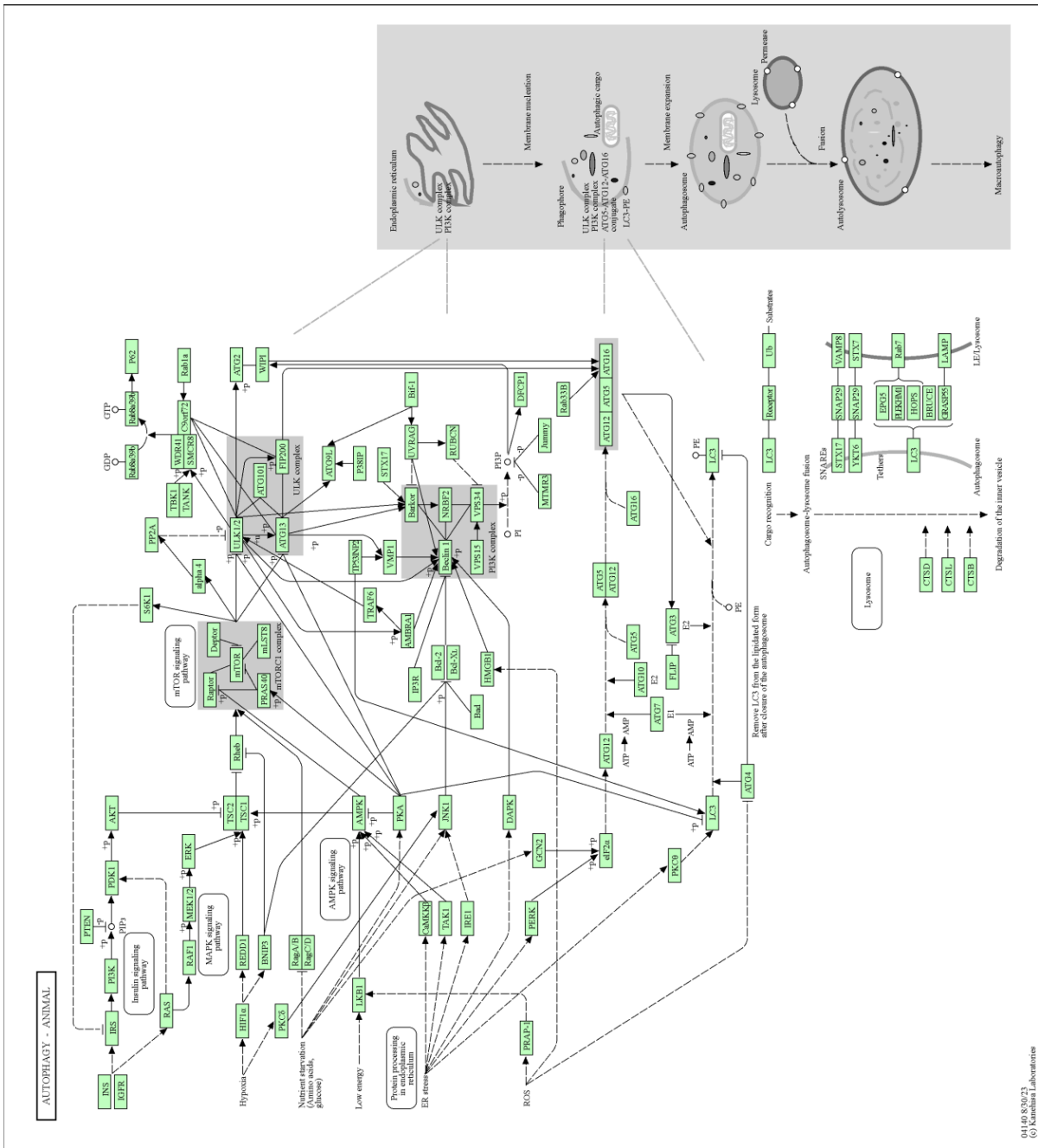
Observação: em caso de duplicidade de genes alvo na mesma posição de interação, foi considerado apenas o maior valor de *target score*. Conteúdo adaptado da base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015).

ANEXO E - Genes alvos de miR-144-3p na via de autofagia

Gene (sigla)	<i>Target score</i>	Posição de interação
AKT3	0.85	3UTR
GABARAPL2	0.85	3UTR
GORASP1	0.92	3UTR
HMGB1	0.85	3UTR
CFLAR	0.85	3UTR
IRS1	0.97	3UTR
MAPK10	0.85	3UTR
MAPK8	0.83	3UTR
MAPK9	1.00	3UTR
PIK3C3	0.85	3UTR
TAX1BP1	0.85	3UTR
PIK3R1	0.92	5UTR

Observação: em caso de duplicidade de genes alvo na mesma posição de interação, foi considerado apenas o maior valor de *target score*. Conteúdo adaptado da base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015).

ANEXO F – Via de autofagia (KEGG PATHWAY)



Fonte: Kanehisa e Goto (2000)

ANEXO G - Genes alvos de miR-200c-3p na via de PI3K/AKT/mTOR

Gene (sigla)	<i>Target score</i>	Posição de interação
AKT2	1.00	3UTR
AKT3	1.00	3UTR
BDNF	1.00	3UTR
CASP9	0.85	3UTR
CCND3	1.00	3UTR
CDK6	0.92	3UTR
CHAD	0.85	3UTR
CHRM2	0.92	3UTR
CREB5	0.85	3UTR
EGF	1.00	3UTR
EIF4B	0.92	3UTR
EIF4E2	1.00	3UTR
EPOR	0.92	3UTR
ERBB4	0.92	3UTR
FASLG	1.00	3UTR
FGF23	1.00	3UTR
FGF5	0.85	3UTR
FGF7	1.00	3UTR
FGFR1	0.92	3UTR
FGFR2	1.00	3UTR
FOXO3	1.00	3UTR
G6PC2	1.00	3UTR
GDNF	0.92	3UTR
GNB4	1.00	3UTR
GNG4	1.00	3UTR
GNG7	0.92	3UTR
IGF1	0.92	3UTR
IGF2	0.92	3UTR
IKBKB	1.00	3UTR
IKBKG	0.85	3UTR

Gene (sigla)	Target score	Posição de interação
IL3	1.00	3UTR
IL6R	1.00	3UTR
ITGA1	0.85	3UTR
ITGA10	1.00	3UTR
ITGA11	0.85	3UTR
ITGA2	0.92	3UTR
ITGA8	0.85	3UTR
ITGAV	0.92	3UTR
ITGB3	0.85	3UTR
ITGB8	0.92	3UTR
JAK1	0.92	3UTR
JAK3	0.85	3UTR
KIT	0.85	3UTR
LAMC1	0.85	3UTR
LPAR4	0.92	3UTR
MAP2K1	0.92	3UTR
MDM2	1.00	3UTR
MET	1.00	3UTR
MYC	0.87	3UTR
NFKB1	0.85	3UTR
NOS3	0.90	3UTR
NTRK2	1.00	3UTR
OSMR	0.85	3UTR
PCK1	0.85	3UTR
PDPK1	0.85	3UTR
PGF	0.92	3UTR
PHLPP2	1.00	3UTR
PIK3CB	0.85	3UTR
PIK3R1	0.85	3UTR
PPP2CA	0.92	3UTR
PPP2R1B	1.00	3UTR
PPP2R2B	0.82	3UTR

Gene (sigla)	Target score	Posição de interação
PPP2R2C	0.92	3UTR
PPP2R2D	1.00	3UTR
PPP2R5A	0.85	3UTR
PPP2R5E	1.00	3UTR
PRKAA2	0.85	3UTR
PRKCA	1.00	3UTR
PRLR	1.00	3UTR
PTEN	1.00	3UTR
RBL2	1.00	3UTR
RELN	0.85	3UTR
RET	0.92	3UTR
RPS6KB1	1.00	3UTR
SOS1	0.92	3UTR
STK11	0.92	3UTR
TCL1B	0.85	3UTR
TGFA	1.00	3UTR
TSC1	1.00	3UTR
VEGFA	0.92	3UTR
VEGFB	0.85	3UTR
YWHAB	0.85	3UTR
YWHAQ	0.85	3UTR
YWHAZ	1.00	3UTR
ANGPT1	1.00	5UTR
BCL2	0.81	5UTR
C8orf44-SGK3	0.85	5UTR
CREB3L2	0.92	5UTR
EIF4E	1.00	5UTR
FGF19	0.85	5UTR
GDNF	0.85	5UTR
MAGI2	1.00	5UTR
MET	0.92	5UTR
MLST8	0.85	5UTR

Gene (sigla)	<i>Target score</i>	Posição de interação
NFKB1	0.92	5UTR
NTRK2	0.85	5UTR
PHLPP2	1.00	5UTR
PIK3CB	0.92	5UTR
PIK3R1	0.92	5UTR
PIK3R3	0.92	5UTR
PIK3R5	0.92	5UTR
PPP2R2A	0.92	5UTR
PPP2R3C	1.00	5UTR
PPP2R5E	0.85	5UTR
SYK	0.92	5UTR

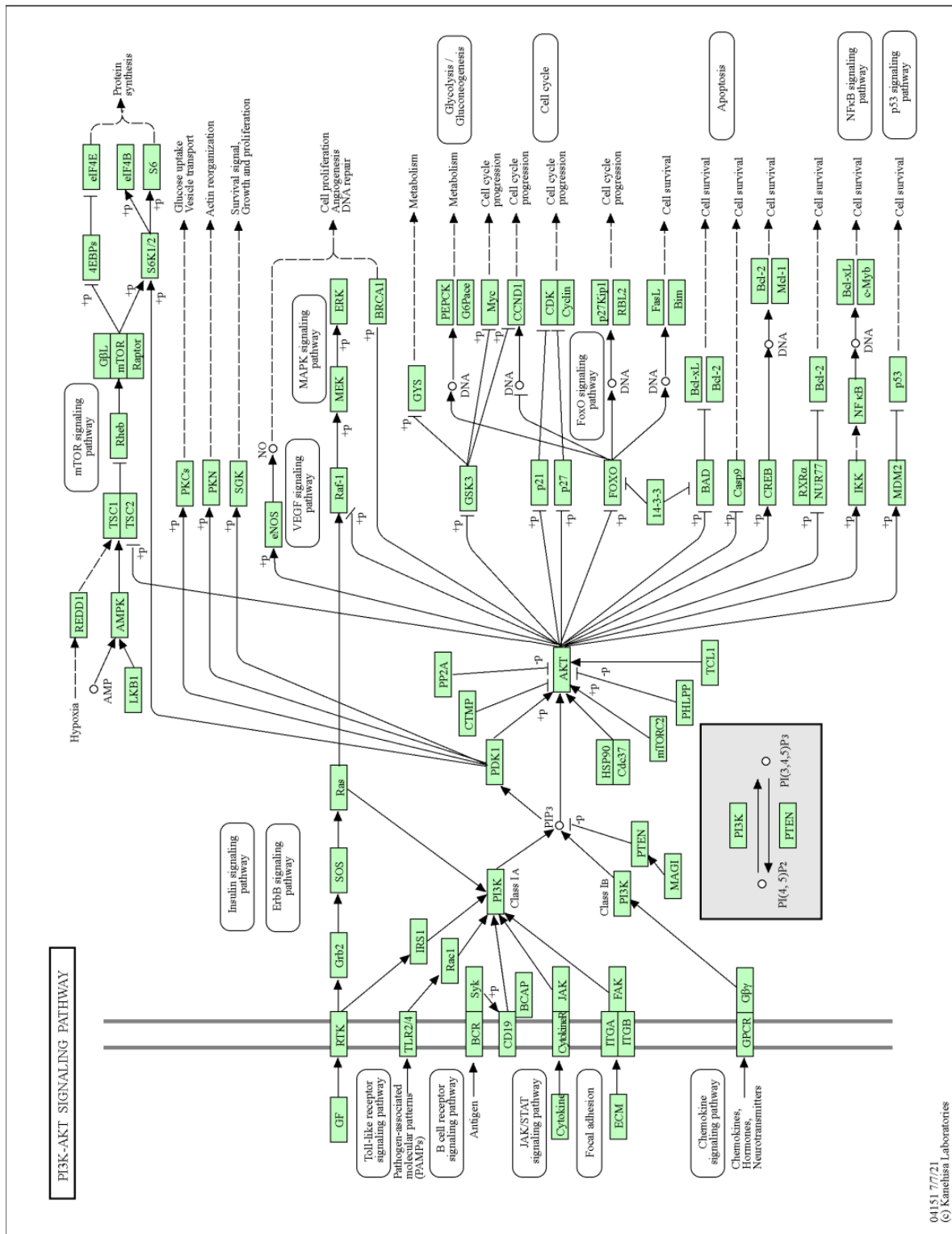
Observação: em caso de duplicidade de genes alvo na mesma posição de interação, foi considerado apenas o maior valor de *target score*. Conteúdo adaptado da base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015)

ANEXO H - Genes alvos de miR-144-3p na via de PI3K/AKT/mTOR

Gene (sigla)	Target score	Posição de interação
AKT3	0.85	3UTR
ATF2	0.85	3UTR
BDNF	0.92	3UTR
C8orf44-SGK3	1.00	3UTR
CCND1	0.85	3UTR
CDK6	0.85	3UTR
EGFR	0.85	3UTR
EIF4E	1.00	3UTR
FGF2	0.85	3UTR
FGF7	0.92	3UTR
GNB1	1.00	3UTR
GYS1	0.92	3UTR
IFNA14	0.85	3UTR
IFNAR2	0.85	3UTR
IL7	0.92	3UTR
IRS1	0.97	3UTR
ITGA2	0.85	3UTR
MAGI1	0.85	3UTR
PPP2R3A	0.85	3UTR
SGK3	1.00	3UTR
SOS1	0.92	3UTR
TGFA	0.92	3UTR
TLR4	0.85	3UTR
YWHAE	0.92	3UTR
MAGI2	0.92	5UTR
PIK3R1	0.92	5UTR

Observação: em caso de duplicidade de genes alvo na mesma posição de interação, foi considerado apenas o maior valor de *target score*. Conteúdo adaptado da base de dados miRWalk 2.0 (Dweep; Gretz, 2015).

ANEXO I – Via de PI3K/AKT/mTOR (KEGG PATHWAY)



Fonte: Kanehisa e Goto (2000)