

|
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAYANE DE FÁTIMA SCHMIDT

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA
PARA A ANÁLISE DE MIRNAS**

CURITIBA

2016

DAYANE DE FÁTIMA SCHMIDT

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA
PARA A ANÁLISE DE MIRNAS

Monografia apresentada à disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II
como requisito parcial à conclusão do
Curso de Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Profa. Dra. Karin Braun
Prado

Co-orientadores: Dr. Rodrigo Coutinho
de Almeida, Prof. Dr. Wanderson Duarte
da Rocha

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre apoiarem minhas decisões e incentivarem a alcançar meus objetivos.

Aos meus orientadores, Prof. Dra. Karin Braun Prado, Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida e Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, pela confiança, orientação e amizade.

Ao Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas que foi essencial para a existência do trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular Humana e seus integrantes, em especial a Débora, Renata, Luciana e Gabriel.

Ao laboratório de Genômica Funcional de Parasitos por ter me acolhido e disponibilizado seu espaço para execução de parte do projeto e em especial, as alunas Lara e Normanda por toda a ajuda.

Ao Laboratório de Neurobiologia, em especial a Prof. Adriana Frohlich Mercadante e suas alunas Nathali e Larissa, por auxiliarem nos testes de transfecção.

À Profa. Dra. Djanira Aparecida da Luz Veronez sempre buscando ajudar os alunos da Biomedicina, disponibilizando sua amizade e conselhos.

À todos os amigos, colegas de laboratório e professores, que de alguma forma contribuíram na minha graduação em Biomedicina e na conclusão desse trabalho.

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) exercem função regulatória pós-transcricional causando, em geral, um efeito inibitório sobre a expressão proteica. MiRNAs regulam a expressão de genes através de sua complementaridade com a região 3' não traduzida (3'UTR - do inglês *untranslated region*) dos RNAm de seus respectivos genes alvos. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados em 3'UTR, podem alterar a afinidade de ligação dos miRNAs e seus alvos. SNPs associados ao câncer de mama que afetam esses sítios de ligação, já foram relacionados com a patogênese da doença. Recentemente, nosso grupo de pesquisa integrou diferentes níveis de dados (resultados de predições de SNPs que afetam sítios de alvos de miRNAs, associação genômica e efeito de variantes genéticas sobre expressão gênica específicos ao câncer de mama) permitindo a seleção de SNPs e miRNAs candidatos para a validação funcional em linhagens tumorais de mama. O presente trabalho busca desenvolver a metodologia para utilizar pre-miRNAs sintetizados *in vitro* como precursores de miRNAs para essa validação. Foi escolhido o SNP rs4245749 e o miR-887-3p, que já tiveram sua interação validada com o uso de mimetizadores do miRNA. O referido SNP está localizado em 3'UTR do gene *MDM4*, o qual codifica uma proteína que regula supressores tumorais. Para tanto, foi avaliada a expressão do gene *MDM4* em linhagens celulares de mama, as quais ainda foram sequenciadas para determinar os alelos do SNP rs4245739. O pre-miRNA do miR-887-3p foi sintetizado por transcrição *in vitro*. Para testar sua funcionalidade na célula, sendo processado em miRNA e ligando-se ao complexo RISC, espera-se fazer teste com luciferase. Para isso, foi preparado um vetor contendo o gene *luc2* e o insertos de 3'UTR contendo cada variante do SNP. Foi ainda testada a transfecção da linhagem MDA-MB-231. Os resultados obtidos, trazem otimizações das técnicas utilizadas, como da purificação de gel de agarose e de RNA após reação de transcrição *in vitro*. Esse trabalho possibilita o direcionamento para a aplicação de pre-miRNAs em ensaios funcionais.

Palavras-chave: pre-miRNAs, microRNAs, SNPs, validação funcional, câncer de mama.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) have a post-transcriptional regulatory function, generally inducing an inhibitory effect on protein expression. MiRNAs regulate the expression of genes through their complementarity with the 3' untranslated region (3'UTR) of mRNA from its target genes. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in 3'UTR may change the binding affinity between miRNAs and its targets. Breast cancer associated SNPs that interfere in these binding sites, have already been related to the disease pathology. Recently, our research group integrated different levels of data (predictions of SNPs that interfere with miRNAs target sites, genomic association and effect of genetic variants on gene expression specific to breast cancer) enabling the selection of SNPs and miRNAs to functional validation in breast cancer cell lines. This study aims to develop the methodology to use pre-miRNAs synthesized in vitro as miRNAs precursors for this validation. The SNP rs4245739 and miR-887-3p were chosen, which have had their interaction validated using of miRNA mimics. The referred SNP is located in *MDM4* gene 3'UTR, which encodes a protein that regulates tumour suppressors. Therefore, it was evaluated the *MDM4* gene expression on breast cancer cell lines, which were also sequenced to determine the SNP rs4245739 alleles. The pre-miRNA of miR-887-3p was synthesized by in vitro transcription. To test its cellular function, being processed into miRNA and binding to the RISC complex, it is expected to perform a test with luciferase. For this, a vector was prepared, containing the *luc2* gene and 3'UTR inserts containing each variant of the SNP. It was also tested the transfection of the cell line MDA-MB-231. The obtained results provide optimizations of techniques, such as agarose gel purification and RNA purification after in vitro transcription reaction. This study enables the orientation for applying pre-miRNAs in functional assays.

Key words: pre-miRNAs, miRNAs, SNPs, functional validation, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA PROTEÍNA MDM4	14
FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DO MIRNA	16
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MIR-887P E A 3'UTR DE MDM4 DEPENDENTE DO SNP RS4245739	17
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO COMERCIAL PMIRGLO DA PROMEG	27
FIGURA 5 - ELETROFORESE DA RT-PCR PARA O GENE <i>MDM4</i>	33
FIGURA 6 - ELETROFORESE DA PCR PARA SEQUENCIAMENTO DA 3'UTR DE MDM4.....	34
FIGURA 7 - ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR	35
FIGURA 8 - SEQUENCIAMENTO INSERTO PARA 3'UTR MDM4	36
FIGURA 9 - ELETROFORESE DO TESTE DE DIGESTÃO PMIRGLO.....	36
FIGURA 10 - ELETROFORESE DA DIGESTÃO DE PMIRGLO COM NHEI PARA CORTE E PURIFICAÇÃO	37
FIGURA 11 - ELETROFORESE DE PURIFICAÇÕES DE BANDA DE GEL APÓS DIGESTÃO COM NHEI	38
FIGURA 12 – ELETROFORESE DA DIGESTÃO DO PMIRGLO COM SALI E PURIFICAÇÃO	39
FIGURA 13 - TESTE DE DENSIDADE DA LINHAGEM MDA-MB-231	39
FIGURA 14 - ELETROFORESE DA HIBRIDIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	41
FIGURA 15 - ELETROFORESE DO TESTE DA DNASE	41
FIGURA 16 - ELETROFORESE DO RNA OBTIDO POR TRANSCRIÇÃO IN VITRO	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. SNPS E MIRNAS SELECIONADOS PARA O GENE <i>MDM4</i> A PARTIR DE INTEGRAÇÃO DE DADOS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA, GWAS E EQTL.....	22
TABELA 2. INICIADORES PARA CDNA DE <i>MDM4</i> E DE <i>HPRT</i>	24
TABELA 3. CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO CDNA DE <i>MDM4</i> ..	24
TABELA 4. INICIADORES ESPECÍFICOS PARA REGIÃO CONTENDO O SNP DE INTERESSE	25
TABELA 5. CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTENDO O SNP DE INTERESSE	25
TABELA 6. CICLOS DA PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR	25
TABELA 7. ETAPAS DO CICLO DE SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS PURIFICADAS	27
TABELA 8. INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE INSERTO PARA ENSAIO DE LUCIFERASE	30
TABELA 9. CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO	30
TABELA 10. SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA TRANSCRIÇÃO IN VITRO	31
TABELA 11. GENÓTIPOS PARA OS SNPS RS10900596 E RS4245739 EM LINHAGENS CELULARES DE MAMA	34
TABELA 12 - RESULTADOS APÓS PURIFICAÇÃO DE BANDA DE GEL POR DIFERENTES MÉTODOS	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 CÂNCER DE MAMA	12
2.2 MDM4	13
2.3 MIRNAS	15
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 SELEÇÃO DE SNPS CANDIDATOS	20
4.1.1 INTEGRAÇÃO DE DADOS E CLASSIFICAÇÃO BAYESIANA	20
4.1.2 INTEGRAÇÃO DE DADOS DE eQTL	20
4.1.3 INTEGRAÇÃO COM DADOS DE GWAS	21
4.1.4 ESCOLHA DE MIRNA E SNP PARA ENSAIOS FUNCIONAIS	21
4.2 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR	22
4.3 RT-PCR	23
4.4 GENOTIPAGEM	24
4.5 ENSAIO COM REPORTER LUCIFERASE	26
4.5.1 Vetor	26
4.5.2 Digestão Vetor	28
4.5.3 Inseto	29
4.6 TRANSFEÇÃO	30
4.6.1 Teste de densidade	30
4.6.2 TESTE COM GFP	31

4.7 TRANSCRIÇÃO IN VITRO	31
4.7.1 DNA MOLDE	31
4.7.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO	32
5 RESULTADOS	33
5.1 EXPRESSÃO DE MDM4	33
5.1 AMPLIFICAÇÃO DE 3'UTR PARA SEQUENCIAMENTO	33
5.3 SEQUENCIAMENTO	34
5.4 SEQUENCIAMENTO E DIGESTÃO INSERTO	35
5.5 TESTE DIGESTÃO PMIRGLO	36
5.6 DIGESTÃO COM NHEI SEGUIDA DE PURIFICAÇÃO	37
5.7 DIGESTÃO COM SALI SEGUIDA DE PURIFICAÇÃO	38
5.8 TESTE DE DENSIDADE	39
5.9 TRANSFEÇÃO COM SUPERFECT	40
5.10 HIBRIDIZAÇÃO OLIGONUCLEOTÍDEOS	40
5.11 TESTE DNASE	41
5.12 TRANSCRIÇÃO IN VITRO	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

MicroRNAs (miRNAs) são reguladores pós-transcricionais e, geralmente, tem um efeito inibitório sobre a síntese proteica. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) localizados na região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (RNAm) onde os miRNAs tipicamente se ligam, são capazes de alterar a afinidade de ligação entre miRNA e seus alvos. A desregulação de miRNAs pode estar envolvida no processo de tumorigênese e ainda apresentam um potencial uso como biomarcadores (BERTOLI, CAVA & CASTIGLIONI, 2015).

Da colaboração dos grupos de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas e Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos (GFP), foi possível integrar informações de bioinformática e de regulação gênica relevantes ao câncer de mama. Foi estabelecida, como abordagem para selecionar miRNAs candidatos, a aplicação de estatística Bayesiana Ingênua para integrar resultados de 3 diferentes algoritmos (PolyMirts, MirSNP e mirSNP score), os quais predizem o efeito de SNPs em 3'UTR sobre a ligação de miRNAs. Além disso, também foram integrados dados de estudos genômicos de associação (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*) e de traços fenotípicos com base genética poligênica (eQTL, do inglês *expression Quantitative Loci*) específicos ao câncer de mama. Isso resultou na identificação de miRNAs que podem estar envolvidos no câncer de mama de maneira dependente de SNP.

Espera-se fazer a validação das interações preditas e realizar testes funcionais em células de linhagens tumorais de mama utilizando pre-miRNAs sintetizados *in vitro* como precursores dos miRNAs de interesse. Para tanto, foi executado esse trabalho com o intuito de desenvolver a metodologia a ser aplicada. Foi escolhido o SNP rs4245749 e o miR-887-3p, que além de estarem nos resultados da integração de dados realizada, já tiveram sua interação validada com o uso de mimetizadores do miRNA (STEGEMAN et al., 2015). O referido SNP está localizado em 3'UTR do gene *MDM4*, que codifica uma proteína que regula negativamente produtos de genes supressores tumorais. Um

aumento na expressão de MDM4 leva a inibição desses supressores e pode ser prejudicial para o prognóstico de um paciente com câncer (DANOVI *et al.*, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer, ou neoplasia maligna, descreve um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento exacerbado de células anormais e com capacidade de invasão e metástase (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Essa neoplasia pode se originar em diversos tecidos, entre eles o mamário de mulheres ou homens.

Em 2012, o câncer de mama foi o segundo câncer de maior incidência no mundo e o mais comum entre mulheres, com uma média de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados. Além disso, ocupou a quinta posição como câncer com maior mortalidade (FERJAY *et al.*, 2014). Segundo dados do DATASUS (2015), no ano de 2013 ocorreram 14.388 óbitos por neoplasia maligna de mama, enquanto que no ano de 2009 foram 12.098, o que demonstra um aumento de 18,9%. A estimativa para o ano de 2016 foi de 57.960 novos casos diagnosticados no Brasil (INCA, 2015).

Trata-se de uma doença heterogênea que pode apresentar diversas classificações, como em função da presença de marcadores moleculares, os quais podem servir como alvo para terapias específicas, sendo eles o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), e o receptor 2 de fator de crescimento epidermal humano (HER2). Os tumores que não expressam nenhum destes marcadores são conhecidos como tumores de mama triplo negativos (TN) (KALIMUTHO *et al.*, 2015).

Os casos de triplo negativo (TN) representam 12 a 17% das ocorrências de carcinoma de mama e apresentam um pior prognóstico, com piores resultados depois de quimioterapia em comparação aos outros tipos de carcinoma mamário (FOULKES *et al.*, 2010). Além disso, nos casos de TN, menos de 30% das mulheres que apresentam metástases sobrevivem após 5 anos (DENT *et al.*, 2007). Um estudo acompanhando pacientes com câncer de mama triplo negativo mostrou alta recorrência nos 3 primeiros anos após o diagnóstico, além de maiores recorrências metastáticas, em especial nos órgãos viscerais (OVCARICEK *et al.*, 2011).

Os tumores TN são muitas vezes chamados de tumores do tipo basal (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012), porém existem 6 subtipos de acordo com o perfil de expressão gênica, que são basal 1 e 2 (BL1 e BL2), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M), tronco mesenquimal (MSL) e receptor androgênico luminal (LAR) (LEHMANN *et al.*, 2011).

2.2 MDM4

A mutação do gene *TP53* é mais comum em tumores de mama triplo negativos, sendo relatada sua mutação em 88% dos casos, com a maioria levando à produção da proteína p53 truncada (DUMAY *et al.*, 2012). A proteína p53 é um fator de transcrição que funciona como um importante supressor de tumor, estando envolvida na regulação de diversos mecanismos como controle da progressão do ciclo celular, reparo do DNA, limitação da angiogênese, indução de apoptose, senescência e autofagia (VARNA *et al.*, 2011). Sob condições normais os níveis intracelulares de p53 devem ser controlados. Essa regulação é feita principalmente pelos reguladores negativos MDM2 e MDM4, proteínas que estão superexpressas em aproximadamente 15% dos casos de câncer de mama (BURGESS *et al.*, 2016). Em função das mutações em *TP53* e alterações em seus reguladores, a via de p53 encontra-se inativa na maioria dos tumores (BASU & MURPHY, 2016).

MDM2 induz a degradação proteossômica de p53 através de um domínio RING-finger na região carboxi-terminal com atividade de ubiquitina ligase E3 (SHI & GU, 2012). Além disso, MDM2 que costuma estar localizada no núcleo celular apresenta sequências de sinal de localização nuclear e de exportação nuclear, podendo exportar p53 ativa para o citoplasma e impedir que ative a transcrição gênica (SHADFAN, LOPEZ-PAJARES & YUAN, 2012).

Em 1996 foi descrita outra proteína com capacidade de se ligar à p53 e devido a certas semelhanças estruturais com MDM2, ela foi chamada de MDMX (SHVARTS *et al.*, 1996). Atualmente conhecida como MDM4, é composta por 490 aminoácidos e codificada pelo gene *MDM4*, este está localizado em 1q32 e apresenta 11 exons, compreendendo 41.4741 pb (MANCINI, DI CONZA & MORETTI, 2009). Entre as semelhanças estruturais da proteína MDM4, representada na FIGURA 1, com MDM2 estão um domínio N-terminal que se liga à p53, um domínio central ácido e um domínio RING-finger na porção carboxi-

terminal, porém esse domínio não apresenta atividade de ubiquitina ligase E3 como em MDM2 (KARNI-SCHMIDT, LOKSHIN & PRIVES, 2016). A proteína MDM4 apresenta como característica única uma sequência auto inibitória, chamada de elemento WWW, a variante da proteína sem esse elemento é superexpressa em alguns tumores agressivos (BISTA, PETROVICH & FERSHT, 2013).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA PROTEÍNA MDM4



Os domínios essenciais da proteína MDM4 estão destacados. Entre os resíduos 19 e 102 está o domínio ligante de p53, entre 190 e 210 o domínio inibitório WWW; entre 215 e 255 o domínio central ácido; entre 290 e 332 o dedo de zinco e entre 437 e 483 o domínio RING-finger. Destacado em marrom, está a região essencial para a formação de heterodímero com MDM2, entre os resíduos 483 e 490. Adaptado de KARNI-SCHMIDT, LOKSHIN & PRIVES (2016).

MDM2 e MDM4 interagem formando um heterodímero através de seus domínios RING-finger (TANIMURA et al., 1999) e com essa interação, MDM4 age como estimulador da ubiquitinação de p53 por MDM2 (LINATES et al., 2003). A função de MDM4 na regulação de p53 não se restringe à interação com MDM2. Apesar de não apresentar atividade de ubiquitina ligase, MDM4 inibe a função de p53 como fator de transcrição ao ligar-se ao seu domínio de ativação transcricional, o que também impede a ativação por acetilação pela p300 (SABBATINI & MCCORMICK, 2002).

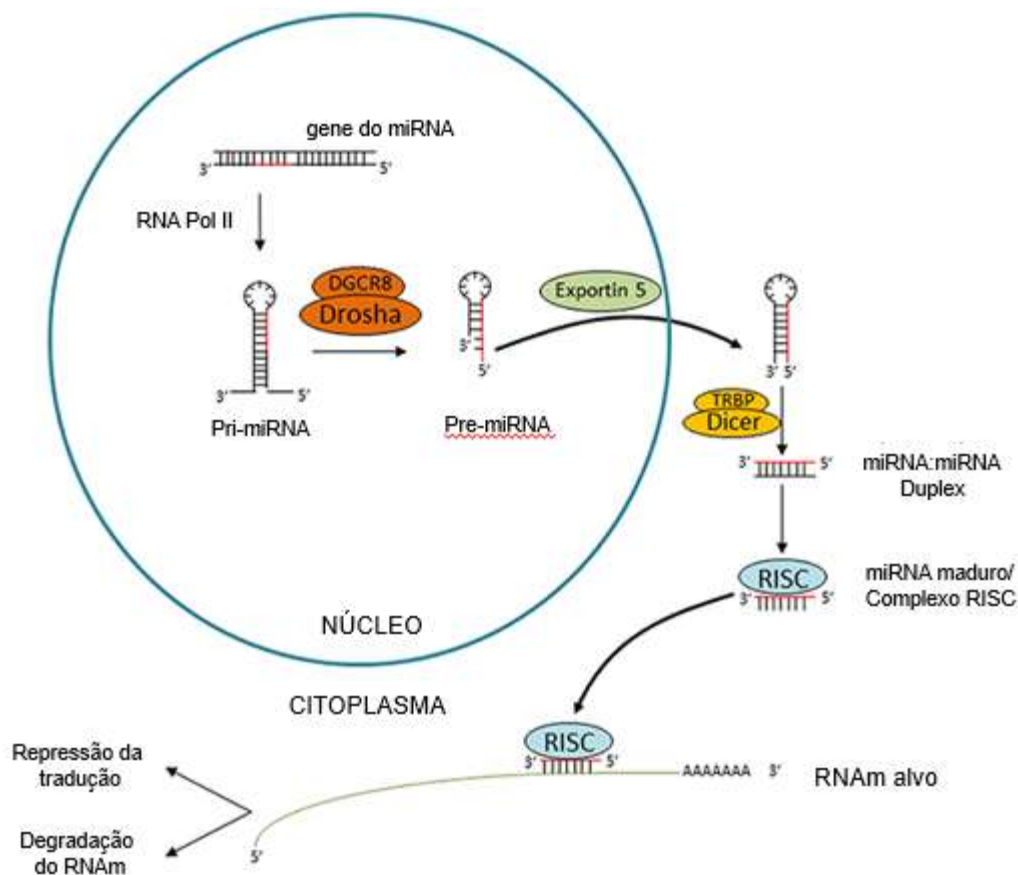
Além do seu papel de regulação negativa de p53, MDM4 interage com outras proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Liga-se à subunidade S2 do proteossomo 26S e promove degradação proteossômica do inibidor dependente de ciclina p21, capaz de interromper o ciclo celular (JIN et al., 2008). MDM4 interfere na atividade de p300, diminuindo a acetilação de p53 e ainda prejudica a interação com Smad3 e Smad4, que seria responsável pela ativação desses fatores de transcrição que induzem apoptose pela via TGF- β (KADAKIA et al., 2002). E2F1 é um fator de transcrição que pode induzir apoptose de forma dependente ou independente de p53 e MDM4 tem a capacidade de inibir sua transativação, consequentemente inibindo sua função apoptótica (WUNDERLICH et al., 2004). Outra forma de regular negativamente E2F1 é

através da inibição da ubiquitinação de pRB por MDM2, permitindo que pRB iniba E2F1 e outros membros da família E2F (UCHIDA *et al.*, 2006).

2.3 MICRORNAS

Os miRNAs são ácidos ribonucleicos pequenos não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos (FELEKKIS *et al.*, 2010). Eles podem ser codificados por um gene, tendo região promotora própria, ou ainda estarem localizados em regiões intrônicas (MELAMED *et al.*, 2013). Sua biogênese começa no núcleo, onde é sintetizado um transcrito primário pela RNA polimerase II ou III (RNA pol II ou III), chamado de pri-miRNA (SCHANEN & LI, 2010). O pri-miRNA é longo (maior que 1 kb), poliadenilado na porção 5', tem uma estrutura de stem-loop e pode conter sequência para vários miRNA maduros (CAI, HAGEDORN & CULLEN, 2004). A Drosha, uma endonuclease RNase tipo III, que se encontra em um complexo enzimático com co-fatores, como DGCR8, é responsável pelo processamento do pri-miRNA em um RNA pequeno (aproximadamente 65 pb) em forma de hairpin (DAVIS & HATA, 2009). O pre-mir é exportado pelo complexo exportina-5/Ran-GTP para o citoplasma, onde é clivado na região próxima ao seu loop terminal pela Dicer, que também é uma endonuclease RNase tipo III, formando um RNA dupla fita de aproximadamente 22 nucleotídeos (KIM & HA, 2014). Esse RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que contém a endonuclease catalítica Argonata2, e uma das fitas é degradada (GREGORY *et al.*, 2005). O processamento do miRNA até sua forma madura é representado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DO MIRNA



O processamento do miRNA começa no núcleo com a transcrição pela RNA Pol II, originando o pri-miRNA. A endonuclease Drosha juntamente a co-fatores cliva a molécula em pre-miRNA, que é transportado para o citoplasma. No citoplasma, a endonuclease Dicer cliva o pre-miRNA e resulta em miRNA-dupla fita. Esse miRNA liga-se ao complexo RISC e uma das fitas é degradada. O miRNA na sua forma madura, pode então se ligar ao RNAm alvo e levar a degradação ou reprimir a tradução. Adaptado de SCHNEEBERGER et al. (2015).

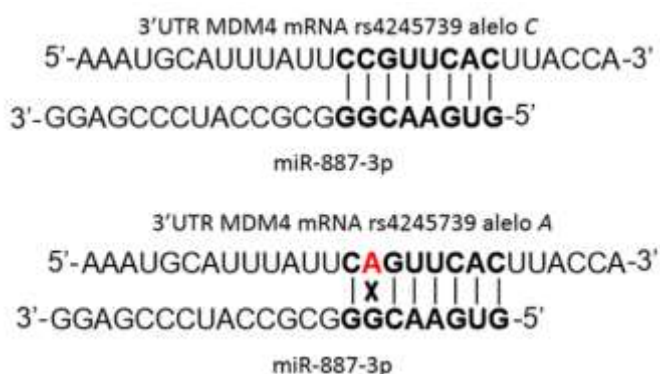
Essas moléculas ligam-se a 3'UTR do RNAm, o que depende da complementariedade da sequência "seed", constituída de 2-7 nucleotídeos na região 5', com a 3'UTR de um RNAm (LEWIS, BURGESS & BARTEL, 2005). O miRNA pode levar ao silenciamento da tradução ao impedir que os ribossomos liguem-se ao mRNA ou ainda permitir a degradação do mRNA pela exonuclease XRN1 (DALMAY, 2013).

Segundo HRDLICKOVA e colaboradores, as variações genéticas localizadas em regiões não codificadoras e associadas a doenças podem ter seu envolvimento explicado por interferir na regulação feita por miRNAs e RNAs

longos não codificadores; SNPs localizados 3'UTR podem fortalecer a ligação de miRNAs, impedir ou criar novos sítios de ligação (HRDLICKOVA *et al.*, 2014). No câncer, a presença de SNPs em sítios de ligação para miRNAs podem estar relacionados ao risco, resposta ao tratamento ou mesmo ao prognóstico do paciente (HARRIS, ROBLES & RYAN, 2010).

O SNP rs4245739 em 3'UTR interfere na ligação do miR-887-3p, cuja afinidade apenas pelo alelo C do SNP já foi comprovada. (STEGEMAN *et al.*, 2015). A interação entre o miRNA e a 3'UTR do RNAm de MDM4 é representada na FIGURA 3. Através de estudo de associação, o alelo A de rs4245739 localizado em 3'UTR do gene MDM4 foi apontado como de maior risco ao subtipo triplo negativo de câncer de mama (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2013). O mesmo alelo do SNP já foi previamente associado com câncer de ovário, de próstata e de pulmão de pequenas células (WYNENDAELE *et al.*, 2010; STEGEMAN *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2015). A presença do alelo A em pacientes, poderia oferecer maior risco à doença devido a uma possível superexpressão de MDM4 em função da ausência da regulação pelo miR-887-3p (GAO *et al.*, 2015).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MIR-887P E A 3'UTR DE MDM4 DEPENDENTE DO SNP RS4245739



As sequências complementares que permitem a ligação do miRNA com 3'UTR do mRNA do gene *MDM4* estão destacadas em negrito. A interação ocorre apenas quando o alelo C do rs4245739 está presente (parte superior), tornando-se inviável na presença do alelo A (em vermelho). Fonte: O autor (2016).

No estudo de Stegeman e colaboradores (2015), que provou a ligação do mir-887 com o RNAm do gene *MDM4*, foi realizado ensaio com luciferase e com mimetizadores de miRNA, molécula sintetizada comercialmente que mimetiza miRNAs. Os mimetizadores são RNAs pequenos dupla-fita quimicamente modificados que aumentam a regulação feita por miRNAs

(Thermo Fisher Scientific). Esses mimetizadores foram usadas tanto para testar a interação com o RNAm alvo, como também para testar a função do miRNA na biologia da célula tumoral testada. Sua capacidade de agir na regulação como um miRNA endógeno apresenta diversas possibilidades de uso, como tornar células mais sensíveis a quimioterapia ao regularem genes envolvidos na resposta a danos ao DNA (MOGNATO & CELOTTI, 2015) ou aumentando a expressão em tumores de miRNAs com função de supressores tumorais (TRANG *et al.*, 2011).

Para o estudo do processamento dos miRNAs são sintetizados por transcrição *in vitro* o pri-miRNA (LIZ *et al.*, 2014) ou o pre-miRNA (CHEN *et al.*, 2016). O pre-miRNA já foi usado para ensaios de luciferase após testes da atividade da endonuclease Dicer (LEE & DOUDNA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologia para avaliar a interação entre miRNAs, seus alvos e variantes genéticas associadas ao câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Averiguar o genótipo de *MDM4* em relação aos SNPs rs10900596 e rs4245739 em linhagens normais e tumorais de mama.

Avaliar a expressão do gene *MDM4* nas linhagens celulares de mama.

Preparar vetor e inserto para ensaio com luciferase.

Otimizar síntese de pre-miRNA in vitro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE SNPS CANDIDATOS

Toda a parte de integração de grandes dados, assim como as análises de predição, foram realizadas utilizando a infraestrutura do Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas, liderado pelo Professor Mauro Castro.

4.1.1 Integração de Dados e Classificação Bayesiana

Para prever SNPs que afetam a afinidade de miRNA com os RNAm de seus respectivos genes alvos, foram utilizadas três ferramentas de bioinformática: PolymiRts v.3 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>); miRSNP (<http://202.38.126.151/hmdd/mirsnp/search/>); e miRSNPscore (<http://www.bigr.medisin.ntnu.no/mirsnpscore/>). Essas ferramentas se diferenciam essencialmente pelo algoritmo utilizado em cada uma delas para prever genes alvos de miRNAs. A ferramenta PolymiRTS considera dados de SNPs e INDELS nas seqüências de miRNA e mRNA, dados experimentais de interação entre miRNA-mRNA (CLASH - cross linking, ligation and sequencing of hybrids) e predições do TargetScan (<http://www.targetscan.org/>); (BHATTACHARYA, ZIEBARTH & CUI, 2014). O miRSNP utiliza o mirSVR, uma estratégia de aprendizado de máquina sobre sítios alvo de miRNA, assim como predições do algoritmo miRanda (LIU *et al.*, 2012). Finalmente, a ferramenta miRSNPscore baseia-se em dados de haplótipos e miRNA do miRBase (<http://mirbase.org/>) (THOMAS, SAITO & SÆTROM, 2011).

Para selecionar SNPs candidatos foi aplicado uma estatística Bayesiana *Ingênua* seguindo os parâmetros pré-estabelecidos por VON MERING *et al.*, 2004, em que os escores de predição inferidos por cada ferramenta são normalizados para obtenção de um escore padronizado. Quanto mais próximo de 1 for o escore, maior é a probabilidade daquela predição ser verdadeira. Para este estudo foi considerado apenas predições maiores que 0.7.

4.1.2 Integração de Dados de eQTL

Em seguida, para identificar SNPs que estão correlacionados com expressão gênica (eQTL - do inglês *expression quantitative trait loci*), foram usados 3 bancos de dados: GTEx eQTL browser (<http://www.gtexportal.org/home/>), BloodeQTL browser

(<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>) e METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*). O banco de dados GTEx (*Genotype-Tissue Expression*) contém dados de genotipagem e de expressão gênica de mais de 7.000 amostras (microarranjo e sequenciamento de RNA) em cerca de 44 tecidos, incluindo 183 amostras de tecido mamário (LONSDALE *et al.*, 2013), BloodeQTL contém dados de genotipagem e de expressão gênica através de microarranjos de 5.311 amostras de sangue total (WESTRA *et al.*, 2013). O METABRIC contém cerca de 2.000 amostras de tumores com dados de expressão gênica e genotipagem do genoma inteiro (CURTIS *et al.*, 2012).

4.1.3 Integração Com Dados de GWAS

Posteriormente, esses dados foram intersectados com resultados de estudos genômicos de associação (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*) de câncer de mama disponíveis no banco de dados GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

Foram considerados candidatos somente SNPs que obedecem aos seguintes critérios concomitantemente: (1) SNPs com alta probabilidade de alterar a afinidade de miRNA com RNAm de acordo com a Bayesiana Ingênua Classificatória; (2) SNPs com efeito eQTL; (3) SNPs associados com câncer de mama de acordo com dados de GWAS.

4.1.4 Escolha de miRNA e SNP para Ensaios Funcionais

A integração de dados resultou em 160 miRNAs candidatos. Para guiar a escolha do candidato para testes funcionais foram pesquisadas informações sobre os genes, SNPs e miRNAs preditos nos seguintes sites: OMIM (<http://www.omim.org/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). Foram usadas como palavras-chave (individualmente e/ou combinadas) o nome do gene, miRNA e SNP preditos e ainda as palavras “cancer, tumor/tumour, function”.

Entre os vários miRNAs obtidos das análises de integração de dados, optou-se pela escolha de miRNAs que estavam interagindo com genes de função conhecida, pois assim seria possível prever os resultados dos ensaios funcionais que tiveram sua metodologia desenvolvida nesse projeto. Com os resultados desse projeto pretende-se explorar novos candidatos e verificar o seu papel na

patologia do câncer de mama. Assim sendo, foi selecionado o gene *MDM4*, que em geral está relacionado com a inibição de proteínas relacionadas com o ciclo celular.

Foram preditos 6 miRNAs que interagem com 3 SNPs do gene *MDM4* e que estão relacionados com o câncer de mama (TABELA 1):

TABELA 1. SNPS E MIRNAS SELECIONADOS PARA O GENE *MDM4* A PARTIR DE INTEGRAÇÃO DE DADOS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA, GWAS E EQTL

SNP	miRNA	Escore	Efeito eQTL	Alelo ancestral	Alelo predito	Alvo predito
rs4245739	miR-887-3p	0.9861151	Down	A	C	MDM4
rs4245739	miR-203b-3p	0.9067668	Down	A	A	MDM4
rs4245739	miR-191-5p	0.9672482	Down	A	C	MDM4
rs4245739	miR-4427	0.8636520	Down	A	A	MDM4
rs10900596	miR-1257	0.9325023	Down	T	C	MDM4
rs10900597	miR-5589-3p	0.7397210	Down	T	C	MDM4

Fonte: o autor (2016).

Entre os SNPs preditos, foi decidido excluir o rs10900597, uma vez que o único miRNA predito apresentava um escore baixo (0.73) em comparação as outras predições (TABELA 1). Os outros 2 SNPs rs10900596 e rs4245739 foram sequenciados nas linhagens celulares de mama como descrito em 4.3.

Porém para o desenvolvimento de ensaios com miRNAs empregando-se pre-miRNA sintetizado *in vitro*, optou-se pela escolha daquele microRNA (miR-887-3p) com reconhecida ligação com SNP rs4245739 do gene *MDM4*, representada na FIGURA 3. O rs4245739 já teve seu alelo A associado a tumores de mama TN e com outros tumores, como de ovário e próstata (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2013; WYNENDAELE *et al.*, 2010; STEGEMAN *et al.*, 2015).

4.2 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares tumorais e normal de mama utilizadas foram cedidas gentilmente pelo Departamento de Genética- Laboratório de

Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), chefiado pela profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e pela Prof Dra. Cláudia Aparecida Rainho do departamento de Genética, da UNESP Botucatu. Elas pertencem à subtipos com diferentes prognósticos e respostas a tratamento: Luminal A: MCF7; Luminal B: BT-474 e ZR-75-1; HER2+: SKBR3; Triplo Negativo: MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e linhagem epitelial normal de tecido mamário imortalizada: 184B5.

As linhagens celulares foram cultivadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com 10% soro fetal bovino. Após a expansão das células, e confluência de 70-90%, as células foram tratadas com TrypLE™ Express (Gibco) (tripsina 0,25%) para desagregação das células do frasco de cultura. As células foram então submetidas à extração de DNA e RNA total concomitantemente seguindo o protocolo do All prep DNA/RNA mini kit (QIAGEN). O RNA obtido foi utilizado para identificar a expressão do gene *MDM4* e o DNA utilizado na amplificação da 3'UTR de *MDM4*.

4.3 RT-PCR

Após a quantificação das amostras, 1000 ng de RNA total foi transcrito reversamente à primeira fita de cDNA com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem), o qual utiliza de iniciadores randômicos e da enzima MultiScript, seguindo as indicações do fabricante. As condições usadas para a reação no termociclador foram 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e terminando em 4°C.

O cDNA obtido foi usado para Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os iniciadores para o cDNA de *MDM4*, estão descritos na TABELA 2. O gene de expressão constitutiva HPRT foi utilizado como controle para analisar a eficiência de síntese e qualidade do cDNA nas amostras.

TABELA 2. INICIADORES PARA CDNA DE *MDM4* E DE *HPRT*

GENE	Iniciador Direto 5'-3'	Iniciador Reverso 5'-3'
<i>MDM4</i>	TGAACATTTACCTTGCGCACCTG	CAACATCTGACAGTGCTTGCAGG
<i>HPRT</i>	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT

O par de iniciadores para *MDM4* foi sintetizado como descrito por WYENENDALE *et al.*, 2010, para *HPRT* os iniciadores foram sintetizados de acordo com FIGUEIRA *et al.*, 2009. Fonte: o autor (2016).

As condições de ciclagem para a PCR estão descritas na TABELA 3:

TABELA 3. CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO CDNA DE *MDM4*

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	35
Anelamento	65,3°C	30 segundos	
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1

Fonte: o autor (2016).

O resultado da reação foi verificado em gel de agarose 1% com corrida eletroforética a 80V por 30 minutos.

4.4 GENOTIPAGEM

Para verificar os SNPs rs4245739 e rs10900596 do gene *MDM4* nas linhagens celulares de mama foi realizado sequenciamento de Sanger de parte da 3'UTR de *MDM4*, a partir do DNA extraído de linhagens como descrito em 4.2. A região de interesse foi amplificada através de PCR usando 2 µl de DNA de cada linhagem, tampão 1X de PCR (Invitrogen), 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 U Taq Platinum I (Invitrogen) e 0,5 pmoles de iniciadores específicos, em um total de 10 µl de reação. Os iniciadores específicos utilizados para a amplificação da região contendo rs4245739 ou rs10900596 estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4. INICIADORES ESPECÍFICOS PARA REGIÃO CONTENDO O SNP DE INTERESSE

SNP	Iniciador Direto 5'-3'	Iniciador Reverso 5'-3'
rs10900596	ACTGCCACTAAACTAAAGCAA	CATCCAAATGAAGAGGTTTCAAAG
rs4245739	TATTCATGGAAGGACGGGCCATCT	GCCTAAGAACATTCTCTGACAGGTTGG

Os iniciadores para o SNP rs4245739 foram previamente descritos por Stegeman et al., 2015 e os iniciadores para o SNP rs10900596 foram desenhados para esse trabalho com o auxílio das ferramentas Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e OlygoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Fonte: O autor (2016).

As condições de ciclagem para os respectivos oligonucleotídeos estão descritas na TABELA 5:

TABELA 5. CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTENDO O SNP DE INTERESSE

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	45 segundos	35
Anelamento	60°C / 68°C	30 segundos	
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1
Hold	15°C	15 minutos	1

Na etapa de anelamento a temperatura é diferente para cada par de iniciadores. Para o SNP rs10900596, a temperatura será 60 °C e para rs4245739, 68°C. Fonte: O autor (2016).

Os resultados da amplificação foram verificados em gel de agarose 1% com corrida eletroforética a 80V por 30 minutos.

Em seguida, o produto amplificado foi usado para purificação enzimática usando Exonuclease I (20 U/μL) e Fosfatase Alcalina termosensitível (FastAp) (20 U/μL), ambas da Thermo Scientific, com o intuito de degradar os reagentes da PCR. As condições para a purificação estão descritos na TABELA 6:

TABELA 6. CICLOS DA PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR

Etapa do ciclo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Ação enzimática	37°C	60 minutos	1
Inativação das enzimas	80°C	20 minutos	1
Hold	4°C	-	-

Fonte: O autor (2016).

Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento pelo método de Sanger. Foi usada para cada amostra purificada, tampão de sequenciamento BigDye® Terminator v1.0 & v3.0 5X (Applied Biosystems™), BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems™) e 0,02 mM de iniciador específico para cada SNP. Para rs10900596 foi usado o iniciador direto e para rs4245739, o reverso. As condições de sequenciamento estão descritas na TABELA 7:

TABELA 7. ETAPAS DO CICLO DE SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS PURIFICADAS

Etapas do Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	1 minuto	1
Desnaturação	95°C	10 segundos	25
Anelamento	50°C	5 segundos	
Extensão	60°C	4 minutos	
Hold	4°C	1 minuto	1

Fonte: O autor (2016).

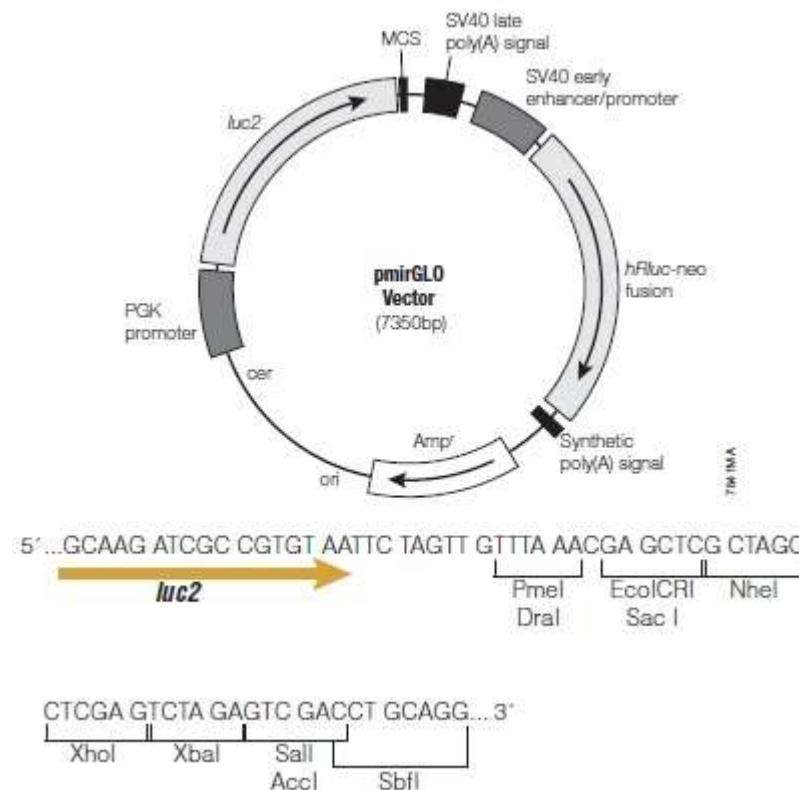
Em seguida, as amostras foram purificadas por precipitação usando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 125mM e etanol absoluto. Foi feita homogeneização por inversões sucessivas da placa, que foi então centrifugada por 45 minutos a 18°C, 3220 g. O sobrenadante foi descartado e etanol 70% adicionado. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 25°C, 3220 g. O sobrenadante é descartado e todo etanol foi evaporado antes da ressuspensão das amostras com Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) para sequenciamento no 3500xl Genetic Analyser (Life Technologies). Os resultados foram analisados com o *software* Mutation Surveyor.

4.5 ENSAIO COM REPORTER LUCIFERASE

4.5.1 Vetor

Para avaliação da ligação de miRNA com seu respectivo alvo, foi utilizado um vetor para realizar ensaios com luciferase, o pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega), representado na FIGURA 4.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO COMERCIAL PMIRGLO DA PROMEGA



O plasmídeo apresenta 7350 pb e na sua sequência encontra-se: gene *luc2* da Firefly luciferase com promotor PGK, seguido de sítio de clonagem múltipla (MCS) e sinal poliA, gene hFluc-neo fusion da Renilla luciferase com promotor SV40 e sinal poli A e ainda, gene B-lactamase (*Amp^r*) que confere resistência a ampicilina. O sítio de clonagem múltipla é representado com os sítios para enzimas de restrição presentes na sequência do plasmídeo. Fonte: Promega Corporation

Para amplificação do DNA plasmidial foi feita a transformação em *E. coli* da cepa DH10B e posterior preparo de miniprep com kit de extração (QIAGEN) para seu isolamento. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos (GFP) da UFPR. As células DH10B foram primeiramente tornadas competentes para a transformação com o plasmídeo, para tal foi feito um pré-inóculo de DH10B em meio LB (*Lysogeny Broth*) e estreptomicina 20 ng/ul. A estreptomicina foi usada pois a cepa apresenta resistência a esse antibiótico. Esse pré-inóculo foi incubado overnight a 120 rpm 37°C. A partir do pré-inóculo, foi preparado inóculo com meio LB sem antibiótico e 0.01 volume de pré-inóculo. O inóculo foi colocado em shaker a 120 rpm 37°C

até atingir uma densidade ótica (*Optical Density* OD) de 0,4. O inóculo foi então incubado no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi feita centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet de células foi ressuspensão com CaCl₂ (0,1M) gelado. Após centrifugação nas condições anteriores foi repetida e ressuspensão final com CaCl₂ (0,1M) e glicerol.

Uma vez que as células eram competentes para quimiotransformação, o pmirGLO (1 ug/ul) foi misturado com DH10B e sofreu choque térmico para sua entrada na célula: 30 minutos no gelo, 45 segundos a 42°C no banho-seco e 1 minuto no gelo. O procedimento foi seguido do tempo de recuperação para expressão do gene B-lactamase que confere resistência a ampicilina. Para isso, foi adicionado meio LB e a bactéria foi incubada a 120 rpm 37°C por 45 minutos. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placa contendo meio LA (LB Agar) e 10 ng/ml de ampicilina e mantidas em estufa 37°C overnight.

Foram preparados inóculos com meio LB, ampicilina e 3 a 5 colônias que ficaram a 120 rpm 37°C overnight. O inóculo foi centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm. Após a retirada do sobrenadante, foram adicionadas as soluções P1, P2 e P3 do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Após centrifugação de 25 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante foi coletado e misturado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. A fase aquosa foi separada e etanol absoluto adicionado. Incubação no freezer por 30 minutos, seguida de centrifugação por 20 minutos a 12000 rpm. Lavagem do pellet com etanol 70%, centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. Pellet ressuspensão em H₂O miliQ. O resultado do miniprep foi visualizado em gel de agarose 0,8%, numa corrida de eletroforese a 80V por 70 minutos. Todos os demais géis para o plasmídeo foram realizados seguindo esse padrão.

4.5.2 Digestão Vetor

O DNA do pmirGLO resultante do miniprep foi utilizado para digestão com as enzimas NheI e Sall (Thermo Scientific™), com os tampões Tango 10x e Orange 10x (Thermo Scientific™), respectivamente. A digestão das enzimas foi testada individualmente a 37 °C overnight, foram adicionados 1 ug do DNA, 0.1 volume do tampão específico e NheI (10 U/ul) ou Sall (10 U/ul). Esse padrão foi seguido para todas as digestões. Após o teste, foi preparada digestão do

pmirGLO com NheI e Tango 10x e todo seu volume foi aplicado em gel de agarose para corte e purificação. A purificação foi feita de três maneiras: com reagente illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), o reagente High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) ou pelo método “*Freeze and Squeeze*”. Na purificação com os kits comerciais, o gel é derretido e são usadas colunas para purificação, o kit Roche contém uma etapa de adição de isopropanol que não está presente no kit da GE. O método *Freeze and Squeeze* consiste em esmagar o pedaço de gel, congelar a -80°C , descongelar a temperatura ambiente, centrifugar e separar o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido 4 vezes. A amostra é então purificada por precipitação do DNA com 0.1 volume de acetato de sódio (3M), 3 volumes de etanol absoluto e 1 ul de glicogênio, sendo incubados *overnight* a -20°C . Em seguida, foi feita centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos, lavagem com etanol 70%, centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos e ressuspensão de pellet em H₂O miliQ. A concentração do DNA das amostras após purificação foi quantificada no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

Após a purificação, o plasmídeo foi digerido com Sall seguida de purificação por precipitação como já descrito.

4.5.3 Inseto

Para desenhar os iniciadores para amplificação do inserto foi considerada uma região de aproximadamente 500 pb da região 3’UTR do gene *MDM4*, contendo o SNP rs4245739 e analisado se era cortada por uma das enzimas de restrição através do NEBcutter. Em seguida, buscou-se uma sequência que tivesse bases em comum com o sítio de restrição e possibilitasse uma amplificação específica do gene *MDM4*. No desenho do iniciador direto foi incluído o sítio de restrição para NheI e do iniciador reverso, o sítio da enzima Sall. Segundo o primer-blast, mesmo com essa alteração, os iniciadores eram específicos para *MDM4*:

TABELA 8. INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE INSERTO PARA ENSAIO DE LUCIFERASE

3'UTR	Iniciador Direto	Iniciador Reverso
MDM4	5'AGAC <u>GCTAGC</u> AGGGCTGGGGCTTCATG3'	5'TGTAG <u>GTCGAC</u> TGCTGCATAAAGTAATCCA3'

O iniciador direto foi desenhado para o amplicon conter o sítio de restrição para NheI "GCTAGC", sublinhado, alterando a sequência original "TAAAGA". O iniciador reverso foi desenhado para conter o sítio de restrição para Sall "GTCGAC", sublinhados, alterando a sequência "GTCGAC". O desenho dos iniciadores foi realizado com o auxílio das ferramentas NEBcutter (nc2.neb.com/NEBcutter2/), Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e OlygoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Fonte: O autor (2016).

A reação de amplificação foi feita com o mesmo protocolo descrito em 4.4, a ciclagem foi:

TABELA 9. CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO

Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	45 segundos	
Anelamento	60°C	30 segundos	35
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1
Hold	15°C	15 minutos	1

Fonte: O autor (2016).

A amplificação foram foi verificado em gel de agarose 1% com corrida eletroforética a 80V por 30 minutos. Os amplicons foram sequenciados, como descrito em 4.4, para conferir a amplificação da região correta.

Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados, cada amostra foi digerida com NheI, purificada, digerida com Sall e purificada. As purificações foram feitas por precipitação do DNA e assim como as digestões, estão descritas em 4.4.2. A concentração do DNA das amostras após purificação foi quantificada no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

4.6 TRANSFEÇÃO

A transfecção da linhagem MDA-MB-231 foi testada com o reagente Superfect (QIAGEN), usando o pEGFP-C1 (Clontech), que expressa proteína fluorescente verde (GFP). Essa linhagem será utilizada para os ensaios de

luciferase, pois de acordo com dados da Thermo Scientific, a linhagem MDA-MB-231 apresenta uma maior taxa de transfecção que a linhagem MDA-MB-468.

4.6.1 Teste de densidade

Foram testadas em placa de 6 poços a confluência de MDA-MB-231 após 24 e 48 horas com diferentes densidades. Para a placa de 6 poços foram testadas: 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 e 5×10^5 células/poço.

4.6.2 Teste com GFP

Para testar a transfecção, 4×10^5 células da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas. Para cada poço, foram preparados 2 μ g do pEGFP-C1 diluído em MEM e com 5 ou 10 μ l do reagente Superfect. A mistura foi incubada por 10 minutos e 600 μ l RPMI 10% FBS (com antibiótico) foram adicionados para então o mix ser colocado no poço.

A placa foi incubada na estufa de CO₂ por 2 ou 3 horas, até o meio com o reagente ser retirado e substituído por apenas RPMI 10% FBS.

4.7 TRANSCRIÇÃO IN VITRO

4.7.1 DNA MOLDE

Para sintetizar *in vitro* o pre-miRNA do miR-887, foi desenhado oligonucleotídeos complementares contendo a sequência do promotor da T7 e a sequência de DNA correspondente a do pre-miRNA. A sequência de T7 foi incluída para reconhecimento da RNA polimerase T7, que foi utilizada para realizar a transcrição *in vitro*.

TABELA 10. SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA TRANSCRIÇÃO IN VITRO

Oligonucleotídeos para DNA molde
5'TTGTAATACGACTCACTATAGGCTTGGGAGCCCTGTTAGACTCTGGATTTTACACTTGG AGTGAACGGGCGCCATCCCGAGG3'
5'CCTCGGGATGGCGCCCGTTCCTCACTCCAAGTGTAATCCAGAGTCTAACAGGGCTCCC AAGCCTATAGTGAGTCGTATTACAA3'

Sublinhado a sequência correspondente ao pre-miRNA, restante corresponde ao promotor de T7. Fonte: O autor (2016).

Para utilizar esses oligonucleotídeos como molde para a transcrição, eles foram previamente hibridizados. Quantidades equimolares de ambos foram

misturadas e diluídas em H₂O miliQ e tampão Tango 10x (Thermo Scientific™) ou apenas em H₂O miliQ. A mistura foi aquecida a 95°C por 10 minutos para desnaturação e posteriormente deixada em temperatura ambiente para renaturação *overnight*.

Foi feito gel de poliacrilamida 6% para visualizar se o procedimento de ligação foi efetivo, e corrida eletroforética a 70V por 50 minutos.

4.7.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO

Para a reação de transcrição *in vitro* foi utilizado o kit Ribomax Large Scale RNA Production System T7 (Promega). Para a reação foram usados 8 µg do DNA molde, H₂O livre de nucleases, tampão da T7, rNTPs (25mM) e mix da enzima. A reação ocorreu a 37 °C por 4 horas. Em seguida, foi tratado com DNase (1 U/ul) por 30 minutos a 37°C. O RNA foi purificado como indicado pelo kit Ribomax, extração com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1) e seguido de precipitação com 0.1 volume acetato de sódio (3M) e 1 volume de isopropanol ou apenas com a etapa de precipitação.

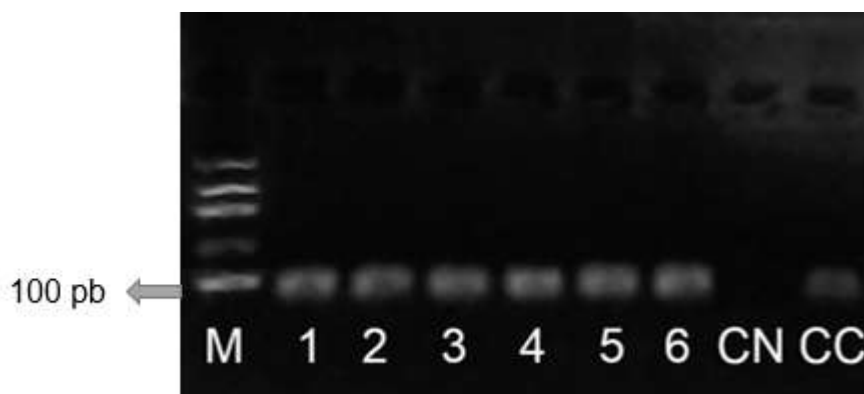
Para testar a ação da DNase, 8µg do DNA molde foram diluídos em H₂O livre de nucleases no mesmo volume da reação de transcrição e tratado ou não com DNase nas mesmas condições que a reação. Resultados foram visualizados em gel de agarose 2%, eletroforese a 80V por 30 minutos. O RNA foi quantificado no equipamento Quantus™ Fluorometer (Promega).

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DE MDM4

A FIGURA 5 traz um exemplo da amplificação do cDNA do gene *MDM4* nas linhagens celulares de mama analisadas. A presença de uma única banda indica amplificação específica e a posição da banda em relação ao marcador, indica a amplificação de produto desejado de 111 pb. Esse resultado indica que todas as linhagens estudadas expressam o gene *MDM4* ao nível de RNAm.

FIGURA 5 – ELETROFORESE DA RT-PCR PARA O GENE *MDM4*



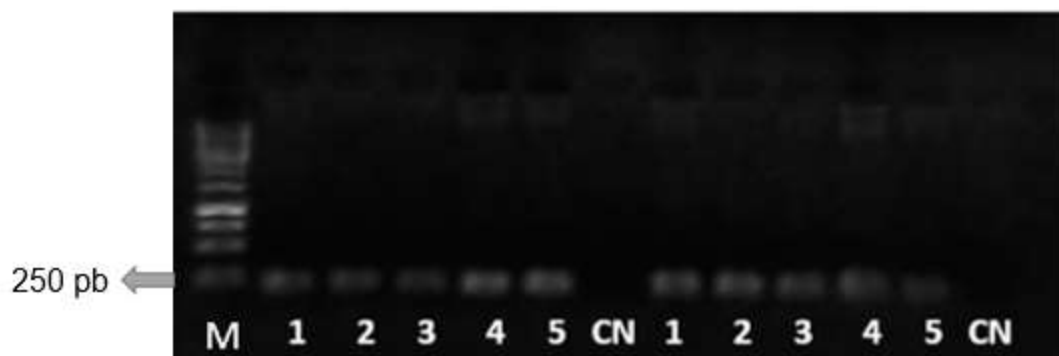
M: Marcador de peso molecular Scada de 100pb, 1- MCF-7, 2- BT-474, 3- ZR-75-1, 4- SKBR3, 5- MDA-MB-436, MDA-MB- 468, CN-controle negativo,CC- controle constitutivo gene *HPRT*, produto de 104 pb Fonte: O autor (2016).

O resultado ainda serviu para padronizar e otimizar as condições de PCR para a realização de qPCR (PCR quantitativa) com o mesmo par de iniciadores para *MDM4*.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DE 3'UTR PARA SEQUENCIAMENTO

A FIGURA 6, traz um exemplo do resultado da PCR para amplificação de 220 pb e 236 pb de 3'UTR, regiões que contém os SNPs rs10900596 e rs.4245739 do gene *MDM4*. Os iniciadores usados possibilitaram uma amplificação específica, como pode ser visualizado pela presença de uma única banda. A posição da banda, entre 200 e 300 pb, indica que o tamanho do amplicon é o esperado. Isso permitiu que os produtos da PCR fossem então utilizados na reação de sequenciamento para determinar os alelos dos SNPs em linhagens celulares de mama.

FIGURA 6 - ELETROFORESE DA PCR PARA SEQUENCIAMENTO DA 3'UTR DE *MDM4*



M- Marcador Scada de 1 Kb. Amostras: 1-MCF-7, 2-SKBR, 3- MDA-MB-436, 4- MDA-MB-231, 5- 184B5, CN- controle negativo. Fonte: O autor (2016).

5.3 SEQUENCIAMENTO

TABELA 11. GENÓTIPOS PARA OS SNPS RS10900596 E RS4245739 EM LINHAGENS CELULARES DE MAMA

Linhagens	rs10900596	miRNA 1257 (C)	rs4245739	miRNA 887-3p (C)
MCF-7	C	Liga	A	X
	C	Liga	C	Liga
BT-474	T	X	A	X
	C	Liga	A	X
ZR-75-1	C	Liga	A	X
	C	Liga	A	X
SKBR3	C	Liga	A	X
	C	Liga	C	Liga
MDA-MB-231	T	X	C	Liga
	T	X	C	Liga
MDA-MB-436	T	X	A	X
	C	Liga	C	Liga
MDA-MB-468	T	X	A	X
	T	X	A	X
184B5	C	Liga	A	X
	C	Liga	A	X

Oito linhagens foram sequenciadas e o genótipo de cada é apresentado ao lado. Na terceira coluna é indicado se o alelo permite ou não a ligação do miR-887-3p, que apresenta afinidade pela região 3'UTR de *MDM4* apenas na presença do alelo C. Fonte: O autor (2016).

Os resultados de sequenciamento mostraram que entre as linhagens analisadas, há aquelas que são homozigotas para cada um dos alelos possíveis de cada SNP, o que é interessante para ensaios funcionais com miRNAs. Para o rs4245739, as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468 foram selecionadas

para os demais ensaios, pois ambas são do subtipo triplo negativo que é associado ao SNP e apresentam respectivamente, os genótipos A/A e C/C.

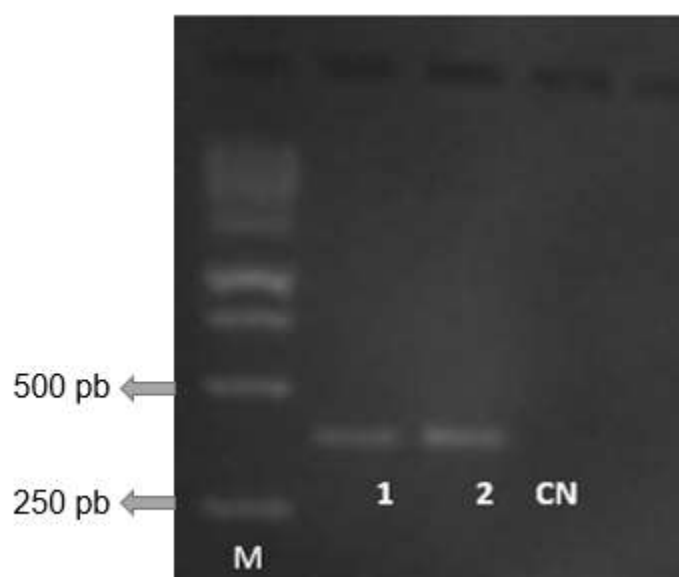
Para o rs4245739, duas linhagens do subtipo triplo negativo, MDA-MB-231 e MDA-MB-468, foram selecionadas para os demais ensaios por apresentarem, respectivamente, a genótipo A/A e C/C.

5.4 SEQUENCIAMENTO E DIGESTÃO INSERTO

Para amplificar a região de 3'UTR a ser inserida no vetor foi feito PCR usando o DNA extraído de MDA-MB-231 e MDA-MB-468, para construir, respectivamente, inserto contendo C e A, com base nos resultados de sequenciamento.

Os iniciadores desenhados para amplificação de 302 pb 3'UTR de MDM4 contendo o sítio de restrição das enzimas NheI e Sall levaram a amplificação específica de um produto entre 250 e 500 bp, como esperado (FIGURA 7).

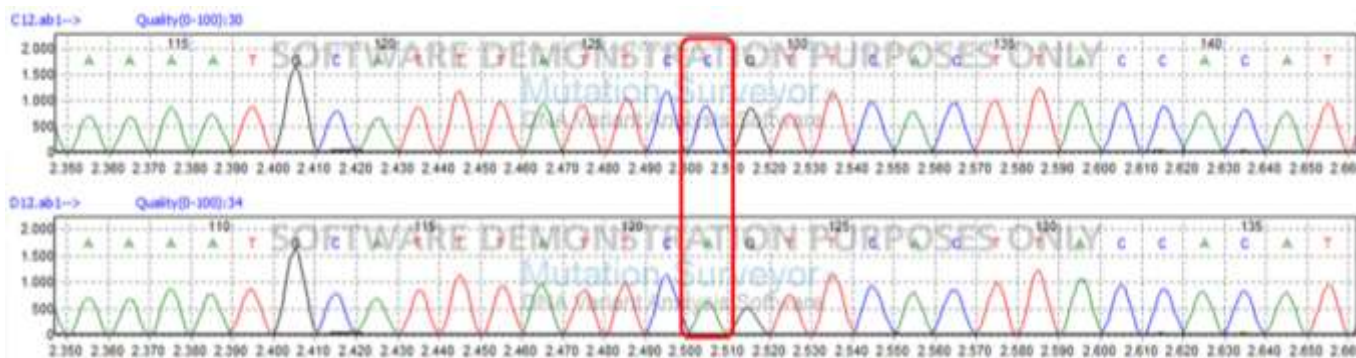
FIGURA 7 - ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR



M- Marcador Scada de 1 Kb. 1- MDA-MB-231, 2- MDA-MB-468, CN controle negativo. Fonte: O autor (2016).

Esses amplicons, foram então sequenciados e assim, houve a confirmação da amplificação da sequência de interesse (FIGURA 8).

FIGURA 8 - SEQUENCIAMENTO INSERTO PARA 3'UTR MDM4



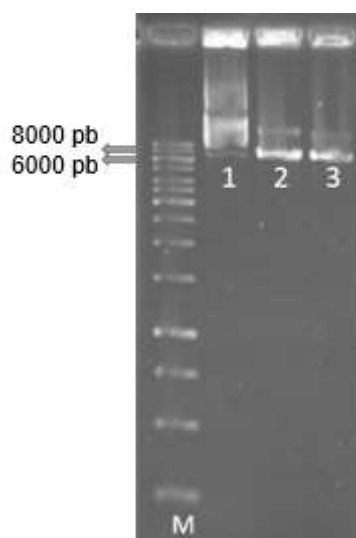
Parte superior da imagem, resultado do sequenciamento para MDA-MB-231 e na parte inferior, para MDA-MB-468. Destacado em vermelho a posição do rs4245739. Fonte: O autor (2016).

Os amplicons foram purificados por precipitação e digeridos com NheI e Sall. Foram obtidos para MDA-MB-231 e MDA-MB-468, respectivamente, 19,8 ng/ul e 16,1 ng/ul de inserto digerido e purificado.

5.5 TESTE DIGESTÃO PMIRGLO

Foi feita uma reação teste com cada enzima de restrição. De acordo com a FIGURA 9 foi visível observar que a digestão para ambas é parcial, tendo uma banda inferior que representa o pmirGLO digerido e uma superior, não digerida. Isso ocorre provavelmente pelos diferentes envelamentos do plasmídeo circular que podem dificultar a digestão. Assim, foi decidido fazer a excisão da banda do gel correspondente a porção digerida com NheI e purificá-la antes de seguir a digestão com Sall.

FIGURA 9 – ELETROFORESE DO TESTE DE DIGESTÃO PMIRGLO

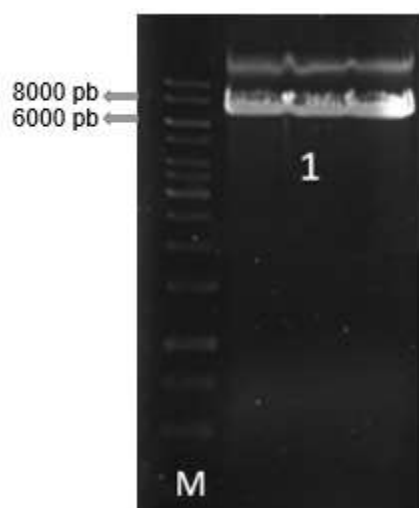


M- Marcador Gene Ruler 1 Kb (Thermo Scientific™). 1- PmirGL obtido com miniprep, 2- digestão pmirGLO com NheI 3- Digestão pmirGLO com Sall.

5.6 DIGESTÃO COM NHEI SEGUIDA DE PURIFICAÇÃO

PmirGLO foi então digerido com NheI e toda a digestão foi aplicada em gel de agarose para separação da banda contendo o plasmídeo linearizado após digestão (FIGURA 10).

FIGURA 10 - ELETROFORESE DA DIGESTÃO DE PMIRGLO COM NHEI PARA CORTE E PURIFICAÇÃO



M- Marcador Gene Ruler 1 Kb (Thermo Scientific™). 1- pmirGLO digerido com NheI. Fonte: O autor (2016).

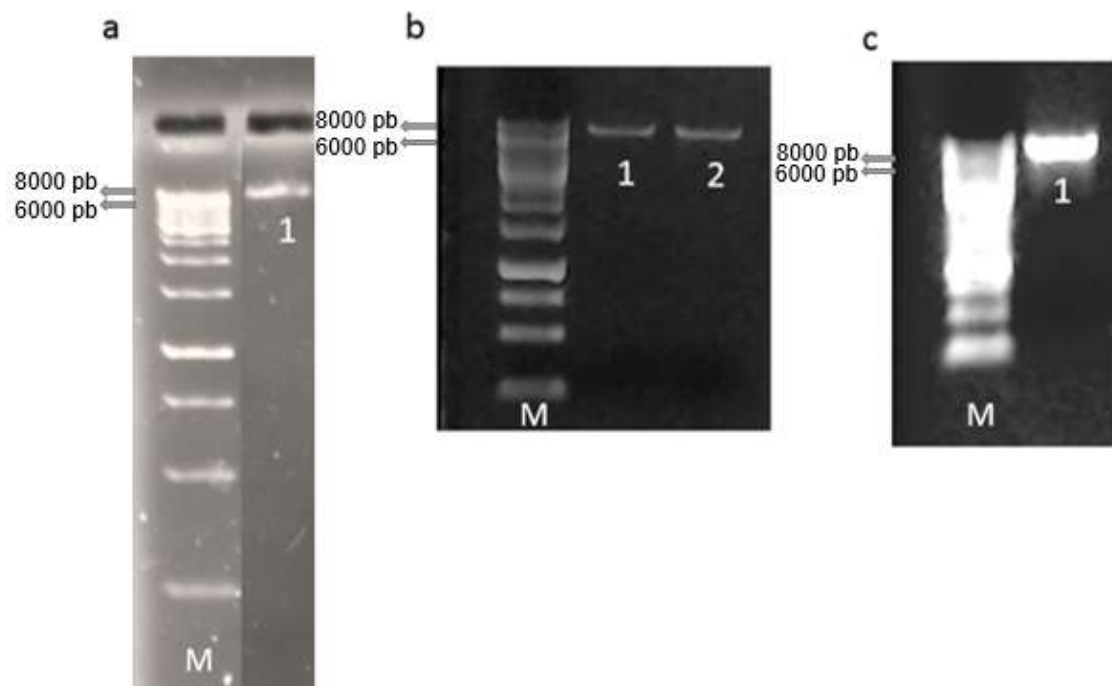
A banda recortada do gel foi então purificada. A quantidade de DNA recuperada e a pureza utilizando métodos diferentes de purificação é indicada na TABELA 12 e a FIGURA 11 representa o resultado de cada purificação.

TABELA 12 - RESULTADOS APÓS PURIFICAÇÃO DE BANDA DE GEL POR DIFERENTES MÉTODOS

Método Purificação	Quantificação	260/230
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences)	644 ng (32,2, ng/ul em 20 ul)	0,18
High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)	1638 ng (27,3 ng/ul em 60 ul)	1,13
<i>Freeze and Squeeze</i>	2260 ng (113 ng/ul em 20 ul)	1,41

Fonte: O autor (2016).

FIGURA 11 - ELETROFORESE DE PURIFICAÇÕES DE BANDA DE GEL APÓS DIGESTÃO COM NHEI



M- Marcador Gene Ruler 1 Kb (Thermo Scientific™). (a) 1- Purificação com ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), (b) 1 e 2- Purificação em duas colunas com High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), (c) Purificação pelo método *Freeze and Squeeze*. Fonte: O autor (2016).

Entre os resultados de purificação, o método *Freeze and Squeeze* foi o que possibilitou maior recuperação de DNA. Além disso, para a razão 260/230, que indica a pureza da amostra, o método teve um valor de 1,41 que foi o mais próximo entre os resultados do ideal entre 1,8 e 2.

5.7 DIGESTÃO COM SALI SEGUIDA DE PURIFICAÇÃO

Após a digestão com NheI e purificação, o pmirGLO foi digerido com Sall (FIGURA 12-a) e seu DNA foi purificado por precipitação (FIGURA 12-b), resultando em 16,6 ng/ul de DNA em 20 ul Apesar da etapa de purificação de gel, ainda permanece na amostra plasmídeo não digerido (FIGURA 12-b). A digestão do plasmídeo e da 3'UTR de MDM4 foi feita para possibilitar a sua ligação e realização de ensaio com luciferase para testar o processamento do pre-miRNA sintetizado *in vitro* (5.9) em miRNA. É esperada a ligação do miRNA no inserto contendo o alelo C para o rs4245739, resultando na diminuição da atividade da luciferase.

FIGURA 12 – ELETROFORESE DA DIGESTÃO DO PMIRGLO COM SALI E PURIFICAÇÃO

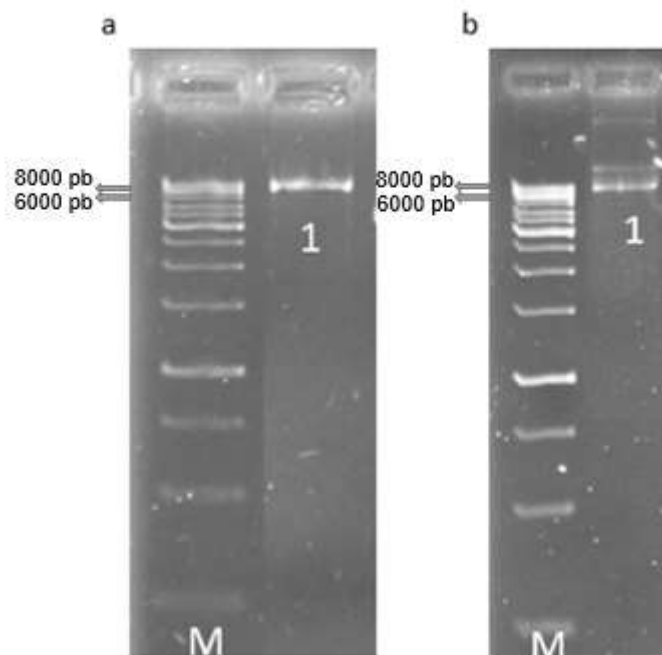
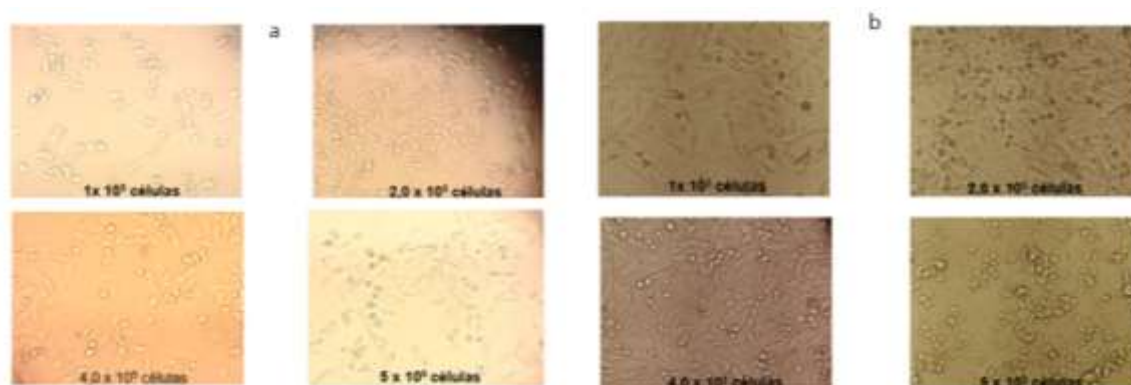


Figura 12. M- Marcador Gene Ruler 1 Kb (Thermo Scientific™). a-1- pmirGLO digerido com NheI e Sall. b- pmirGLO purificado após digestão com NheI e Sall.

5.8 TESTE DE DENSIDADE

O teste levou a escolher a densidade de 4×10^5 células para ensaios de transfecção com a linhagem MDA-MB-231, pois em 24h havia uma densidade próxima a 70% e em 48h as células estavam numa confluência próxima a 100% e sem a presença de células mortas. Na densidade $2,5 \times 10^5$, em 48 horas, grande parte das células haviam alterado sua forma alongada para arredonda por falta de espaço (FIGURA 13).

FIGURA 13 - TESTE DE DENSIDADE DA LINHAGEM MDA-MB-231



12.a- células 24 horas após plaqueamento; 12.b- células 48 horas após plaqueamento. Fonte: O autor (2016).

5.9 TRANSFECCÃO COM SUPERFECT

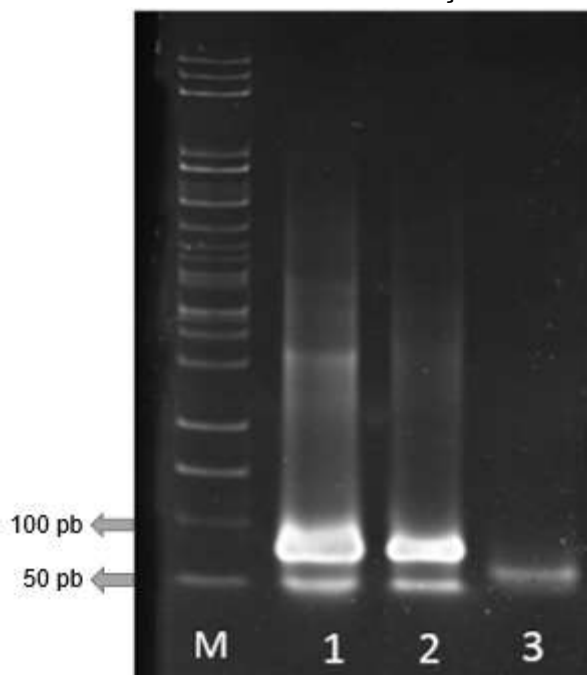
A transfecção da linhagem MDA-MB-231 foi testada com um plasmídeo expressando proteína fluorescente verde (GFP), o pEGFP-C1 (Clontech) que serviria para indicar a eficiência da transfecção em função do número de células fluorescentes, o que pode ser observado em microscopia de fluorescência. O objetivo deste teste é de otimizar as condições de transfecção para ensaio de luciferase e pre-miRNA.

O primeiro teste realizado, com 10 ul de Superfect e 3 horas de incubação antes da troca de meio, resultou em morte de grande parte das células e poucas células transfectadas. Por isso, foi testado a incubação por 2 horas com 5 ou 10 ul do reagente. Essa diminuição no tempo foi efetiva em diminuir a toxicidade observada anteriormente, porém não houve nenhuma célula transfectada. Com isso, ainda é necessário testar diferentes volumes do reagente e diferentes tempos de incubação para que a transfecção seja feita de forma eficiente e com baixa toxicidade. Além disso, pretende-se testar o reagente de transfecção lipofectamina 3000 (Invitrogen), avaliando sua toxicidade e eficiência de transfecção, que segundo dados da Thermo Scientific é de 51 a 79% para a linhagem MDA-MB-231. A linhagem MDA-MB-468 também passará pelos testes, com o intuito de ser utilizada como modelo em ensaios funcionais, simulando uma situação onde o miR-887-3p não ligaria com 3'UTR de MDM4.

5.10 HIBRIDIZAÇÃO OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os oligonucleotídeos desenhados para servir como molde na síntese do pre-miRNA foram hibridizados (FIGURA 14), que quando ocorria formava uma banda de oligonucleotídeos entre 50 e 100 pb, correspondendo ao seu tamanho de 82 bp. Quando não ocorria a hibridização, o tamanho do fragmento é próximo a 50 pb. Foi testada a hibridização na presença ou não de tampão, a banda de oligonucleotídeos hibridizados diluídos apenas em H₂O apresentou uma intensidade maior e por isso, essa amostra foi escolhida para ser usada como DNA molde.

FIGURA 14 – ELETROFORESE DA HIBRIDIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

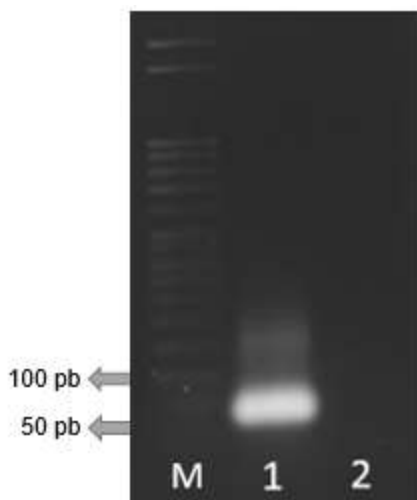


M- Marcador de DNA de 50 pb (Thermo Scientific™), 1- Oligonucleotídeos hibridizados. 2 Oligonucleotídeos hibridizados na presença de tampão Tango 10x, 3- Oligonucleotídeo antes da hibridização. Fonte: O autor (2016).

5.11 TESTE DNASE

A fim de verificar se o produto formado era de fato um RNA, foi realizado o teste com a enzima DNase. Após o emprego de 2 U de enzima, por 30 minutos tempo, foi possível visualizar que o DNA molde era degradado (FIGURA 15).

FIGURA 15 – ELETROFORESE DO TESTE DA DNASE

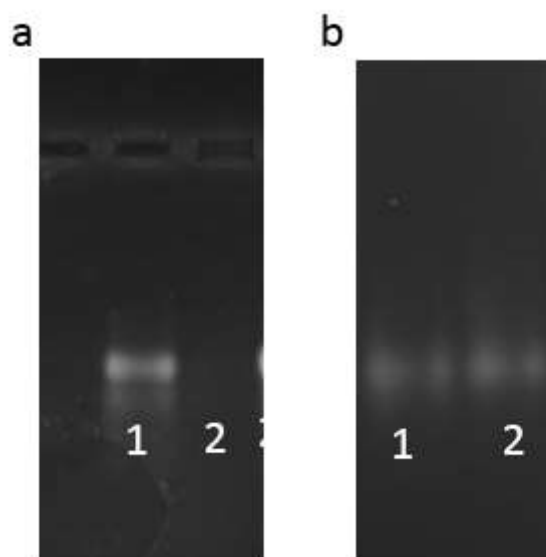


M- Marcador de DNA de 50 pb (Thermo Scientific™). 1- DNA molde 2- DNA molde tratado com DNase.

5.12 TRANSCRIÇÃO IN VITRO

A reação de transcrição após ser tratada com DNase, foi purificada. A purificação foi feita, seguindo o indicado pelo kit Ribomax Large Scale RNA Production System T7 (Promega) fazendo uma etapa de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1), seguida de purificação por precipitação com acetato. Essa purificação resultou em 14 ng/ul de RNA e não foi possível visualizar essa amostra no gel (FIGURA 16-a). Assim, foi testada a purificação apenas com a etapa de precipitação. O resultado foi de 150 ng/ul de RNA e a banda visualizada no gel apresentou intensidade próxima a antes da precipitação (FIGURA 16-b). A reação foi preparada em 20 ul totais, o que possibilita realizar 50 reações de transcrição *in vitro* com o kit.

FIGURA 16 - ELETROFORESE DO RNA OBTIDO POR TRANSCRIÇÃO IN VITRO



16-a-1 RNA antes da purificação, a-2 RNA após extração com fenol e purificação com acetato.
16-b-1 RNA antes da purificação, b-2 RNA após purificação com acetato. Fonte: O autor (2016).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

SNPs em regiões não codificadoras são frequentemente associados a doenças, inclusive ao câncer. No caso, de SNPs em 3'UTR, essa associação é possivelmente explicada pela interferência na regulação por miRNAs. Os miRNAs por sua vez, também podem desempenhar um papel na patologia do câncer agindo como oncogenes ou supressores tumorais. A compreensão da relação de SNPs e miRNAs pode auxiliar no entendimento do processo de desenvolvimento tumoral.

Para estudos dessas interações, são comumente usados os mimetizadores de miRNA vendidos comercialmente. Essas moléculas apresentam algumas alterações para sua estabilidade e tem um custo alto, especialmente para uma proposta como a desse trabalho de validar diversos candidatos.

Assim, o uso de um pre-miRNA sintetizado *in vitro* pode ser uma alternativa interessante. O trabalho realizado nessa monografia, traz o direcionamento para o uso de pre-miRNA para a investigação de miRSNPs (SNPs em sítios preditos para a ligação de miRNAs). O plasmídeo e vetor preparados para ligação, podem ser usados em ensaio com luciferase, juntamente com o pre-miRNA sintetizado. Outros estudos já utilizaram pre-miRNA para ensaio com luciferase e uma vez que essa metodologia seja estabelecida neste estudo com o pre-miRNA do miR-887-3p, seria possível testar outros miRNAs candidatos.

Espera-se ainda poder usar o pre-miRNA em ensaios para testar os efeitos dos miRNAs nas células, como na sua viabilidade. A hipótese, no caso do miR-887-3p e rs4245739 de MDM4, é que na linhagem MDA-MB-231 o miRNA ligue-se a 3'UTR do RNAm *MDM4* e faça uma regulação negativa da proteína MDM4. Essa regulação negativa foi predita pelo efeito eQTL do SNP (TABELA 1). Sendo isso, espera-se diminuir o efeito de MDM4 sobre supressores tumorais e que assim, eles possam iniciar a apoptose. Na linhagem em questão, o gene *TP53* está mutado, portando a p53 não seria capaz de exercer sua função corretamente independentemente do nível de expressão de MDM4. Apesar disso, a diminuição da proteína MDM4 ainda poderia desencadear a apoptose das células, através de outras vias, como a de TGF- β e de E2F1, interferindo da viabilidade. Além disso, o pre-miRNA pode apresentar

efeitos nas células através da ligação com outros alvos do miR-887-3p ou ainda do miR-887-5p, que também é originado da mesma sequência de pre-miRNA. Isso possibilitaria um modelo que imita a condição endógena da expressão do miRNA. O uso da linhagem MDA-MB-468 possibilitaria ver os efeitos específicos do miRNA quando a regulação de MDM4, pois essa linhagem apresenta características semelhantes a MDA-MB-231 (como mutação em TP53) e por apresentar o genótipo A/A, o miRNA não seria capaz de regular MDM4.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASU, S.; MURPHY, M.E. Genetic Modifiers of the p53 Pathway. **Cold Spring Harbor perspectives in Medicine**, v. 6, n. 4, p. a026302, 2016.
- BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J.D.; CUI, Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 42 Database issue, p. 86-91, 2014
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122-1143, 2015.
- BISTA, M.; PETROVICH, M.; FERSHT, A.R. MDMX contains an autoinhibitory sequence element. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 14, p. 17814–17819, 2013.
- CANCER GENOME ATLAS NETWORK, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, p. 61-70, 2012.
- CAI, X.; HAGEDORN, C.; CULLEN, B. et al. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA**, v.10, n.12, p. 1957-1966, 2004.
- CELOTTI, L.; MOGNATO, M. MicroRNAs Used in Combination with Anti-Cancer Treatments Can Enhance Therapy Efficacy. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 15, n.13, p. 1052-1062, 2015.
- CHEN, X. et al. Targeted resequencing of the microRNAome and 3'UTRome reveals functional germline DNA variants with altered prevalence in epithelial ovarian cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 16, p. 2125-2137, 2015.
- CHEN, Y. et al. Rbfox proteins regulate microRNA biogenesis by sequence-specific binding to their precursors and target downstream Dicer. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, p. 4381–4395, 2016.
- CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v.486, n. 7403, p. 346-352, 2012.
- DALMAY, T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. **Essays in Biochemistry**, v. 54, p. 29-38, 2013.
- DANOVI, D. Amplification of Mdmx (or Mmd4) directly contributes to Tumor Formation by Inhibiting p53 Tumor Suppressive Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v.4, n.13, 2004.
- DATASUS. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>. Acesso em: 05/12/2015.
- DAVIS, B.; HATA, A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. **Cell Communication and Signalling**, v.7, p.18, 2009.
- DENT, R. et al. Triple-negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.15, 2007.

- LEE, H., DOUDNA, J. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. **RNA JOURNAL**, v. 18, p. 2012-2019, 2012.
- DUMAY, A. et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1227-1231, 2012.
- FAN, C.; S. OH, D.; WESSELS, L. et al. Concordance among Gene-Expression-Based Predictors for Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 560-569, 2006.
- FELEKKIS, K. et al. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. **Hippokratia**, v. 14, n. 4, p. 236-240, 2010.
- FERJAY, J. et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359-286, 2014.
- FOULKES, W.; SMITH, I.; REIS-FILHO, J. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.
- FU, S.W.; CHENG, L.; MAN, Y. miRNA Biomarkers in Breast Cancer Detection and Management. **Journal of Cancer**, v. 2, p. 116-122, 2011.
- GARCIA-CLOSAS, M. et al. Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. **Nature Genetics**, v. 45, n. 4, p. 392-398, 2013.
- GAO, F. et al. A regulatory MDM4 Genetic Variant Locating in the Binding Sequence of Multiple MicroRNAs Contributes to Susceptibility of Small Cell Lung Cancer. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. 1-10, 2015.
- HARRIS, C.; ROBLES, A.; RYAN, B. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. **Nature Reviews**, v. 10, p. 389-402, 2010
- HISAOKA, M.; MATSUYAMA, A; NAKAMOTO, M. Aberrant Calreticulin Expression Is Involved in the Dedifferentiation of Dedifferentiated Liposarcoma. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 5, p. 2076-2083, 2012.
- HRDLICKOVA, B. et al.. Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, v.1842, n.10, p. 1910–1922, 2014.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde, 2015.
- JIN, Y et al. MDMX Promotes Proteasomal Turnover of p21 at G1 and Early S Phases Independently of, but in Cooperation with, MDM2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 4, p. 1218–1229, 2008.
- KADAKIA, M. et al. MdmX inhibits Smad transactivation. **Oncogene**, v. 21, p. 8776-8785, 2002.
- KALIMUTHO, M. et al. Targeted Therapies for Triple Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.36, n. 12, p. 882-846, 2015.

KARNI-SCHMIDT, O.; LOKSHIN, M.; PRIVES, C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 617-644, 2016.

KIM, N.; HA, M. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 509-524, 2014.

LDLINK. Disponível em: <<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/>>. Acesso em: 15/06/2016.

LEWIS, B.; BURGE, C.; BARTEL, D. et al. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets; **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005.

LINARES, L.K. et al. HdmX Stimulates Hdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12009–12014, 2003.

LIZ, J. et al. Regulation of pri-miRNA Processing by a Long Noncoding RNA Transcribed from an Ultraconserved Region. **Molecular Cell**, v. 55, p. 138-147, 2014.

LONSDALE, J. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nature Genetics**, v. 45, p. 580-585, 2013.

SCHANEN, B.; LI, X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. **Genomics**, v. 97, n.1, p. 1-6, 2010.

LIU, C. et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, v. 13, n. 661, p. 1-10, 2012.

MANCINI, F.; DI CONZA, G.; MORETTI, F. MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. **Current Genomics**, v. 10, p. 42-50, 2009.

MATIJASEVIC, Z. et al. MdmX Promotes Bipolar Mitosis To Suppress Transformation and Tumorigenesis in p53-Deficient Cells and Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 4, p. 1265-1273, 2008.

MELAMED, Z. et al. Alternative Splicing Regulates Biogenesis of miRNAs Located Across Exon-Intron Junctions; **Molecular Cell**, v. 50, p. 869-881, 2013.

OVCARICEK, T. et al. Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival. **Radiology and Oncology**, v. 45, n. 1, p.46-52, 2011.

PARANT, J. et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. **Nature Genetics**, v. 29, n.1, p. 92-95, 2001.

SABBATINI, P.; MCCORMICK, F. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 519-525, 2002.

SCHNEEBERGER, M. et al. Hypothalamic miRNAs: emerging roles in energy balance control. **Frontiers in Neuroscience**, v.9, p. 1-5, 2015.

SHADFAN, M.; LOPEZ-PAJARES, V.; Yuan, ZM. MDM2 and MDMX: alone and together in regulation of p53. **Translational Cancer Research**, v. 1, n. 2, 2012.

SHI, D.; GU, W. Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. **Genes & Cancer**, v. 3, n. 3-4, p. 240-248, 2012.

GREGORY, R. et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 123, p. 631-640, 2005.

SHVARTS, A. et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 19, p. 5349-5357, 1996.

STEGEMAN, S. et al. A genetic variant of MDM4 influences regulation by multiple miRNAs in prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 2, p.265-276, 2015.

TANIMURA, S. et al. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 447, n. 1, p. 5-9, 1999.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. mirVana Mimics and Inhibitors. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/mirna-profiling-/mirvana-mimics-inhibitors.html>>. Acesso em: 02/12/2016.

THOMAS LF, SAITO T, SÆTROM P. Inferring causative variants in microRNA target sites. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 16, e109, p. 1-10, 2011.

TRANG, P. et al. Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice. **Molecular Therapy**, v. 19, n.6, p. 1116-1122, 2011.

UCHIDA, C. et al. Effects of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB. **FEBS Letters**, v. 580, n. 7, p. 1753-1758, 2006.

VARNA, M. et al. TP53 Status and Response to Treatment in Breast Cancers. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

VON MERING, C. et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 33, D433-437, 2005.

WESTRA, H.J. et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. **Nature Genetics**, v. 45, p. 1238-1243, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION | CANCER. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 05/12/2015.

WUNDERLICH, M. et al. MdmX Represses E2F1 Transactivation. **Cell Cycle**, v. 3, n. 4, p. 470-476, 2004.

WYENENDALE, J. et al. An Illegitimate microRNA Target Site within the 3' UTR of MDM4 Affects Ovarian Cancer Progression and Chemosensitivity. **Cancer research**, v. 70, p. 9641-9649, 2010.