

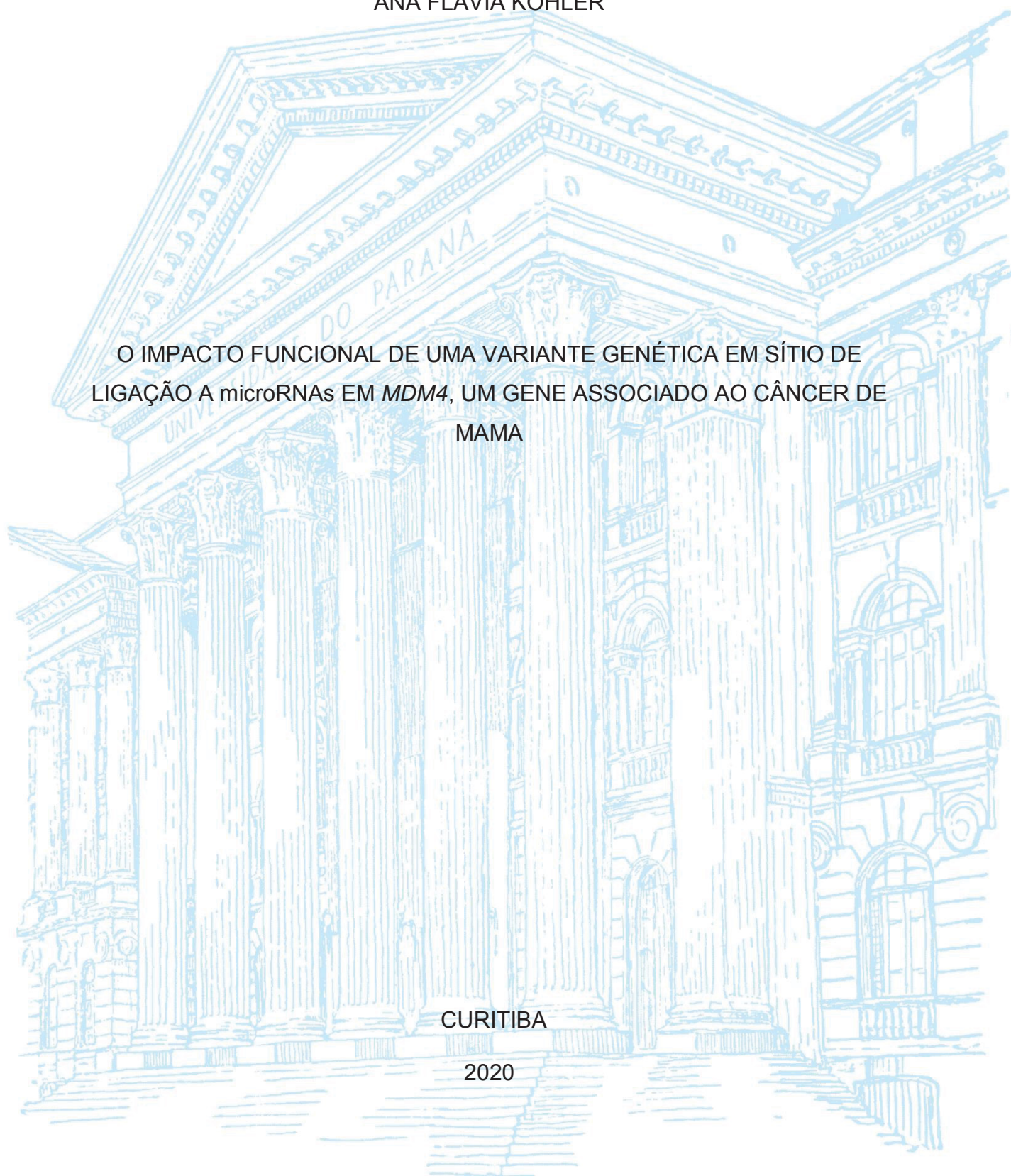
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA FLÁVIA KOHLER

O IMPACTO FUNCIONAL DE UMA VARIANTE GENÉTICA EM SÍTIO DE
LIGAÇÃO A microRNAs EM *MDM4*, UM GENE ASSOCIADO AO CÂNCER DE
MAMA

CURITIBA

2020



ANA FLÁVIA KOHLER

O IMPACTO FUNCIONAL DE UMA VARIANTE GENÉTICA EM SÍTIO DE
LIGAÇÃO A microRNAs EM *MDM4*, UM GENE ASSOCIADO AO CÂNCER DE
MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética, Setor de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Fiori Gradia

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Karin Braun Prado

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Kohler, Ana Flávia

O impacto funcional de uma variante genética em sítio de ligação a microRNAs em *MDM4*, um gene associado ao câncer de mama. / Ana Flávia Kohler. – Curitiba, 2020.
128 p.: il.

Orientadora: Daniela Fiori Gradia
Coorientadora: Karin Braun Prado

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas – Câncer. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Luciferases. I. Título. II. Gradia, Daniela Fiori. III. Prado, Karin Braun. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 614.5999449



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA FLÁVIA KOHLER** intitulada: **O impacto funcional de uma variante genética em sítio de ligação a microRNAs em MDM4, um gene associado ao Câncer de Mama**, sob orientação da Profa. Dra. DANIELA FIORI GRADIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 13:51:08.0

DANIELA FIORI GRADIA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/03/2020 11:44:05.0

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 15:41:39.0

CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar proteção, força e serenidade.

À minha família, porque minha vida acadêmica e realização profissional só são possíveis graças a vocês. A eles eu agradeço por tudo. À minha mãe por ser meu porto seguro, pelo amor, pelo carinho e incentivo. Ela é minha inspiração e meu maior exemplo de SER humano. Foi ela quem me ensinou a disciplina, dedicação e responsabilidade desde o ensino primário. O sonho de ser professora começou com o quadrinho de giz e o jaleco dela. Ao meu pai por sempre me apoiar e me dar colo. A minha felicidade é sentir o amor e o orgulho que ele sente por mim. Ao meu irmão por ser meu melhor amigo, por me entender e compartilhar o gosto pela pesquisa e sede de conhecimento. É quem me faz rir e com quem eu divido os melhores momentos. Vocês são minha base. Obrigado por me segurar nos momentos mais difíceis e cansativos dessa trajetória e me incentivar a seguir em frente.

Aos demais familiares que do seu modo permitiram tudo acontecer desde o início. Tia Dri e Eliane vocês fazem parte disso. Ao vô Pedro, que no meio desse caminho se tornou meu anjo da guarda e intercessor.

Aos amigos do LabCHO com quem eu divido os meus dias e os meus sonhos. Vocês tornam meus dias mais alegres. Em especial as meninas que me consolam quando – todas as vezes - os experimentos não funcionam e por terem me ensinado tanto, da PCR ao cultivo. Carolina, Érika, Jéssica, Tamyres, Tayana, Rafaela, Vanessa, Nina e Branca vocês são geneticistas maravilhosas. Nossas conversas sobre a vida também foram essenciais. Aprendo e me surpreendo todos os dias com vocês. Aos meninos – Rafael, Guillermo e Leandro - que me fazem rir da chegada à mesa do RU. À Juliana que me acompanhou em vários períodos durante esse trabalho e me ajudou muito.

Em especial à Carolina e à Vanessa. Carol, você foi a primeira a me acolher quando eu cheguei e me pegou de mascote. Teu carinho e companhia (um pouco excessivos) são fundamentais. Será minha eterna consultora para assuntos de bioinformática. Vanessa, minha primeira amiga desde os tempos de ReMendel. Admiro muito a profissional que é. Admiro também tua animação com

os pequenos fatos do dia. Carolina e Vanessa nossa amizade seria bem improvável, somos tão diferentes.

As técnicas, Priscila por me socorrer com os números e a química; e a Ana Luiza por me abrir tantas portas (literalmente), pelas conversas diárias e se dispor a ajudar sempre.

Aos professores orientadores do LabCHO. Obrigada por compartilharem o conhecimento e fazer parte da minha formação. A cada aula ou reunião semanal minha admiração por vocês aumenta. Me sinto imensamente feliz e orgulhosa em construir minha vida acadêmica e aprender genética no LabCHO. Jaque, muito obrigada pela ajuda durante esse trabalho. Tuas “dicas” sempre fizeram a diferença.

Dani, obrigada. Agradeço por ter me acolhido quando eu apareci como aluna ouvinte cheia de medo e expectativas. Você sempre me acalma e me faz acreditar que vai dar certo, desde a prova do mestrado até a dissertação. Teus rabiscos em qualquer folha de papel durante nossas conversas na tua sala sempre trazem a solução. Obrigada pela orientação, por compartilhar o gosto pela biologia molecular e pela amizade. Me sinto tranquila ao saber que tenho você do meu lado nos próximos quatro anos.

À professora Karin, que me apresentou este trabalho e se sentou do meu lado na bancada. O gosto pelo “fazer acontecer” é o teu diferencial. Obrigada pela orientação e disposição sempre em tempo integral e permitir que eu fizesse parte do LGMH onde eu aprendi muita coisa e fiz muitas amizades.

A todos os demais professores do departamento de genética com quem tive a oportunidade de aprender e conviver. Em especial as professoras Ana Cláudia e Márcia que fizeram parte da banca de acompanhamento e contribuíram muito para esse trabalho.

À Capes e CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória, meu abraço bem apertado.

O gosto e a dedicação por esse trabalho me inspiraram a batizar meu cãopanheiro de SNP, vulgo Snip, que nasceu em 2018 junto com esse mestrado.

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer de maior incidência no mundo, sendo o de maior mortalidade entre as mulheres. O controle da progressão tumoral é dado, entre outros fatores, pela ação de genes supressores tumorais, entre eles o gene *TP53*, essencial na resposta aos danos ao DNA. Dessa forma, mudanças nos níveis de p53 e de seus reguladores podem afetar a função como supressor de tumor e predispor ao desenvolvimento de câncer. As proteínas MDM2 e MDM4 participam dessa regulação, pois inibem a função de transativação de p53 bloqueando o sítio de ligação de fatores basais de transcrição, além de participar da via de poliubiquitinação marcando a proteína p53 para posterior degradação por proteossomo. As proteínas MDM2 e MDM4 podem ser reguladas ao nível de mRNA, por meio de regulação pós-transcricional mediada por miRNA. A interação entre miRNA e mRNA ocorre pelo pareamento de bases de sequências complementares entre a região *seed* do miRNA e a região 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA alvo. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) situados nestes sítios de interação podem alterar a afinidade de ligação entre miRNAs e mRNA alvo. As análises computacionais de predição *in silico* são capazes de fornecer uma lista de genes alvos candidatos de regulação por miRNAs, levando em consideração a ocorrência de SNPs dentro dos sítios alvos de miRNA. Este trabalho parte da integração de dados de bioinformática e de regulação gênica relevantes ao câncer de mama previamente realizadas, que resultou na identificação de miRNAs que podem estar envolvidos no câncer de mama de maneira dependente de polimorfismos no sítio alvo. Foram selecionados como candidatos para a validação funcional, o SNP (rs4245739) A>C do gene *MDM4* e os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p, preditos para se ligar ao mRNA na presença do alelo C. O ensaio de gene repórter luciferase foi utilizado com o objetivo de validar experimentalmente a predição *in silico*. A sequência 3'UTR do gene *MDM4* contendo o SNP rs4245739 foi clonada à jusante do gene da *firefly* luciferase, presente no vetor pmirGLO. A linhagem celular MDA-MB-231 foi utilizada para a co-transfecção dos vetores contendo os insertos A e C do SNP rs4245739 e o pre-miR-887-3p ou os miRNAs *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p. A partir do ensaio luciferase foi possível observar a ligação específica dos miRNAs 887-3p e 191-5p ao vetor contendo a variante C e que as concentrações de mimic transfectedo, de 50nM e 100 nM, não mostraram diferenças significativas na interação miRNA-mRNA. Células transfetadas apenas com os *mimics* foram usadas para avaliação dos níveis de mRNA do gene *MDM4* por RT-qPCR. Apesar de observarmos uma diminuição na expressão do RNA de *MDM4*, esta não foi estatisticamente significativa, sugerindo que outros mecanismos de regulação, como o bloqueio de tradução do mRNA mediado por miRNAs seja o modelo mais relevante. Desta forma, foi demonstrado que a variante genética rs4245739 no sítio de ligação para os miRNAs 887-3p 191-5p é relevante do ponto de vista funcional, uma vez que modula a afinidade de ligação destes de maneira diferencial, ou seja, dependente da presença das variantes A ou C.

Palavras-chave: Câncer de mama. MDM4. Polimorfismo. miRSNPs. Ensaio de Luciferase.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most prevalent cancer in the world, with the highest mortality among women. Tumor progression is controlled among other factors due to tumor suppressor genes including the TP53 gene, essential in response to DNA damage. Thus, changes in levels of p53 and their regulators may affect tumor suppressor function and predispose to cancer development. MDM2 and MDM4 proteins participate in this regulation as they inhibit the transactivation function of p53 by blocking the basal transcription factors binding site as well as participating in the polyubiquitination pathway by marking the p53 protein for further proteasome degradation. MDM2 and MDM4 proteins can be regulated at the mRNA levels by miRNA-mediated post-transcriptional regulation. The interaction between miRNA and mRNA occurs by base pairing between the miRNA seed region and target mRNA 3' untranslated region (3' UTR). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) within these interaction sites may alter the binding affinity between miRNAs and mRNA targets. In silico prediction, computational analysis provides a list of target genes candidates to miRNA regulation considering the occurrence of SNPs within the target sites. This study is based on previously performed bioinformatics integration of gene regulation data relevant to breast cancer, which resulted in the identification of miRNAs that may be involved in breast cancer in polymorphisms-depending manner. MDM4 SNP (rs4245739) A>C and miR-887-3p and miR-191-5p predicted to bind to mRNA in the presence of the C allele, were selected for functional validation. The luciferase reporter gene assay was used to experimentally validate in silico prediction. MDM4 3'UTR sequence containing the rs4245739 SNP was cloned downstream of the firefly luciferase gene in the pmirGLO vector. MDA-MB-231 breast cancer cell line was used for the co-transfection of vectors containing SNP rs4245739 A and C inserts and the pre-miR-887 or the miRNA mimics miR-887-3p and miR-191-5p. From the luciferase assay was possible to observe the specific binding of the mimics 887-3p and 191-5p to the vector containing the C allele and the concentrations of transfected mimics – 50nM and 100nM - did not show significant differences in the miRNA-mRNA interaction. The transfected cells with *mimics* were used to assesses *MDM4* mRNA levels by RT-qPCR. Although we observed a decrease in mRNA level from MDM4, this was not statistically significant, suggesting that other regulatory mechanisms, such as miRNA-mediated blocking of mRNA translation are the most relevant model. Thus, it has been shown that the genetic variant rs4245739 at the binding site for the miRNAs 887-3p and 191-5p is functionally relevant, since it modulates their binding affinity in a differential way, i.e., dependent on the presence of variants A or C.

Keywords: Breast cancer. MDM4. Polymorphisms. miRSNPs. Luciferase Assay.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE miRNAs E GENES PREDITOS.....	31
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE miR-887-3p E miR-191-5p E A REGIÃO 3'UTR DO GENE <i>MDM4</i>	33
FIGURA 3– DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA p53.....	39
FIGURA 4 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS MDM2 E MDM4...43	
FIGURA 5 – VIAS DE INTERAÇÃO ENTRE MDM4 E OUTRAS PROTEÍNAS...44	
FIGURA 6 – VIAS DE REGULAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS p53 - MDM2 - MDM4.....	46
FIGURA 7 – BIOGÊNESE E FUNÇÃO DO miRNA EM CÉLULAS ANIMAIS.....	49
FIGURA 8 – PLANO DE TRABALHO.....	59
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO VETOR pmirGLO.....	63
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO DO PRIMER RT <i>STEM-LOOP</i> UTILIZADO NA SÍNTESE DE cDNA DOS miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p E DOS RNU44 E RNU48.....	73
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DOS <i>PRIMERSFORWARD</i> E <i>REVERSE</i> UTILIZADOS NA RT-qPCR DOS miRNAs 887-3p e 191-5p E DOS RNU44 E RNU48.....	75
FIGURA 12 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS VARIANTES DE <i>MDM4</i>	78
FIGURA 13– ELETROFORESE DA PCR DE COLÔNIAS DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739A SELECIONADOS EM MEIO DE CULTURA LA COM AMPICILINA.....	79
FIGURA 14 – ELETROFORESE DA PCR DE COLÔNIAS DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739C SELECIONADOS EM MEIO DE CULTURA LA COM AMPICILINA.....	80
FIGURA 15 – ELETROFORESE DA PCR DO PRODUTO DE MINIPREP DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739A.....	80

FIGURA 16– ELETROFORESE DA PCR DO PRODUTO DE MINIPREP DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739C.....	80
FIGURA 17– ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739A E pmirGLO-MDM4_739C.....	81
FIGURA 18 – ELETROFORESE DO ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA SÍNTESE DE DNA MOLDE PARA TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> DO pre-miR 887.....	82
FIGURA 19 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS A TRANSFEÇÃO APENAS DOS VETORES.....	84
FIGURA 20 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 1 pmol DO pre-miR 887-3p.....	84
FIGURA 21 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 3,5 pmol DO pre-miR 887-3p.....	85
FIGURA 22 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 5 pmol DO pre-miR 887-3p.....	86
FIGURA 23 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 7 pmol DO pre-miR 887-3p.....	86
FIGURA 24 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 14 pmol DO pre-miR 887-3p.....	87
FIGURA 25 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 40 pmol DO pre-miR 887-3p.....	88
FIGURA 26 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24h APÓS TRANSFEÇÃO DO miRNA <i>MIMIC</i> miR-191-5p.....	89
FIGURA 27 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 48h APÓS TRANSFEÇÃO DO miRNA <i>MIMIC</i> miR-191-5p.....	90
FIGURA 28 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24h APÓS TRANSFEÇÃO DO miRNA <i>MIMIC</i> miR-887-3p.....	91
FIGURA 29 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 48h APÓS TRANSFEÇÃO DO miRNA <i>MIMIC</i> miR-887-3p.....	92

FIGURA 30 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE ENTRE OS VETORES A E C 24h APÓS TRANSFECCÃO DOS miRNAs <i>MIMICS</i> miR-887-3p e miR-191-5p.....	93
FIGURA 31 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE ENTRE OS VETORES A E C 48h APÓS TRANSFECCÃO DOS miRNAs <i>MIMICS</i> miR-887-3p e miR-191-5p.....	94
FIGURA 32 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24h APÓS TRANSFECCÃO DE 50 E 100 nM DOS miRNAs <i>MIMICS</i> miR-887-3p e miR-191-5p.....	95
FIGURA 33 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 48h APÓS TRANSFECCÃO DE 50 E 100 nM DOS miRNAs <i>MIMICS</i> miR-887-3p e miR-191-5p.....	95
FIGURA 34– ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 e 48h APÓS TRANSFECCÃO DE 50 E 100 nM DO miRNA <i>MIMICS</i> miR-191-5p.....	96
FIGURA 35 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 e 48h APÓS TRANSFECCÃO DE 50 E 100 nM DO miRNA <i>MIMICS</i> miR-887-3p.....	97
FIGURA 36 – EXPRESSÃO DO GENE <i>MDM4</i> EM LINHAGENS NÃO TUMORAL E TUMORAIS DE MAMA SEM TRANSFECCÃO.....	97
FIGURA 37 – EXPRESSÃO DO miRNA miR-887-3p APÓS TRANSFECCÃO DO <i>MIMIC</i>	98
FIGURA 38– EXPRESSÃO DO miRNA miR-191-5p APÓS TRANSFECCÃO DO <i>MIMIC</i>	99
FIGURA 39 – EXPRESSÃO DO GENE <i>MDM4</i> APÓS TRANSFECCÃO COM OS miRNAs <i>MIMICS</i> miR-887-3p E miR-191-5p.....	100

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SNPs E miRNAs DO GENE <i>MDM4</i> SELECIONADOS A PARTIR DE INTEGRAÇÃO DE DADOS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA, GWAS E eQTL.....	32
QUADRO 2 – SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS FORWARD</i> E <i>REVERSE</i> PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'UTR DO GENE <i>MDM4</i> CONTENDO O SNP rs4245739.....	60
QUADRO 3 – REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO <i>MDM4_739A</i> A PARTIR DO DNA DA LINHAGEM MDA-MB-468.....	60
QUADRO 4 – REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO <i>MDM4_739C</i> A PARTIR DO DNA DA LINHAGEM MDA-MB-231.....	61
QUADRO 5 – CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS 3'UTR DE <i>MDM4</i>	61
QUADRO 6 – REAÇÃO DE DIGESTÃO DOS INSERTOS <i>MDM4_739A</i> E <i>MDM4_739C</i> E DO VETOR <i>pmirGLO</i>	64
QUADRO 7 – REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS INSERTOS <i>MDM4_739A</i> E <i>MDM4_739C</i> AO VETOR <i>pmirGLO</i>	65
QUADRO 8– OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ANELAMENTO E TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	68
QUADRO 9 – REAÇÃO DE ANELAMENTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	68
QUADRO 10 – REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	68
QUADRO 11 – SEQUÊNCIA DOS miRNAs MIMETIZADORES ENDÓGENOS 887-3p e 191-5-p.....	70
QUADRO 12 – REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA COM O KIT <i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)</i> PARA A SÍNTESE DE cDNA DO GENE <i>MDM4</i>	73
QUADRO 13 – SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS RT STEM-LOOP</i> UTILIZADOS NA SÍNTESE DE cDNA DOS miRNAs 887-3p E 191-5p E DOS RNU44 E RNU48.....	74

QUADRO 14 - REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA COM O KIT *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* PARA A SÍNTESE DE cDNA DO miR-887-3p, miR-191-5p, RNU44 e RNU48.....74

QUADRO 15 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS FORWARD* E *REVERSE* UTILIZADOS NA RT-qPCR DOS miRNAs 887-3p E 191-5p E DOS RNU44 E RNU48.....76

QUADRO 16 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS FORWARD* E *REVERSE* UTILIZADOS NA RT-qPCR DO GENE *MDM4*, *GUS-B* E *U6*.....76

APÊNDICE

FIGURA 1 - CURVA DE <i>MELT</i> PARA A EXPRESSÃO DO miRNA-191-5p UTILIZANDO PRIMERS RT- <i>STEM LOOP</i>	126
FIGURA 2 – CURVA DE <i>MELT</i> PARA A EXPRESSÃO DO miRNA-887-3p UTILIZANDO <i>PRIMERS RT-STEM LOOP</i>	126
TABELA 1 – VALORES DE <i>CT</i> PARA A EXPRESSÃO DO miR-887-3p APÓS TRANSFECCÃO COM <i>MIMIC</i>	127
TABELA 2 – VALORES DE <i>CT</i> PARA A EXPRESSÃO DO miR-191-5p APÓS TRANSFECCÃO COM <i>MIMIC</i>	127
TABELA 3 – VALORES DE <i>CT</i> PARA A EXPRESSÃO DO GENE ALVO MDM4 APÓS TRANSFECCÃO COM OS miRNAs <i>MIMICS</i> miR-887-3p e miR-191-5p.....	127
FIGURA 3 – ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE PARTE DA REGIÃO 3'UTR DE <i>MDM4</i>	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO – Argonauta

Akt/PKB – *Protein kinase B serine/threonine kinase 1*

ARF ou CDKN2A – *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

ATM – *protein kinase ataxia-telangiectasia mutated*

ATR - *ATR serine/threonine kinase*

BAX - *BCL2 associated X, apoptosis regulator*

BCL2 – *BCL2 apoptosis regulator*

BIM ou BCL2L11 – *BCL2 like 11*

BRCA1 – *BRCA1 DNA repair associated*

BRCA2 – *BRCA2 DNA repair associated*

CASP8 – caspase 8

CBP – *CREB-binding protein*

CDC25 - *cell division cycle 25C*

CHK1 - *checkpoint kinase 1*

CHK2 – *checkpoint kinase 2*

CK5 – Citoqueratina 5

CK17 – Citoqueratina 17

COP-1 - *COP1 E3 ubiquitin ligase*

DGCR8 - *DGCR8 microprocessor complex subunit*

EGFR – Receptor do fator de crescimento epitelial, do inglês *Epidermal growth factor receptor*

EMT – Transição epitelial-mesenquimal, do inglês *epithelial–mesenchymal transition*

ERBB2 ou HER2 – receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano, do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*

ER – Receptor de estrogênio, do inglês *estrogen receptor*

eQTL - *Expression quantitative trait loci*

E2F1 - *E2F Transcription Factor 1*

E4F1 - *E4F transcription factor 1*

FBXL7 - *F-box and leucine rich repeat protein 7*

FISH – Hibridização fluorescente in situ, do inglês *Fluorescent In Situ Hybridization*

GADD45 - *growth arrest and DNA damage inducible alpha*

GTP – *Guanosine-5'-triphosphate*

GWAS – *genome-wide association study*

HDHC3 – *HD domain containing 3*

Hsc70 - *Heat shock 70-kDa protein*

Hsp90 - *heat shock protein 90*

IGFBP3 - *insulin like growth factor binding protein 3*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INDELS – Inserções e deleções, do inglês *Insertions and Deletions*

Ki-67 ou MKI67 - *marker of proliferation Ki-67*

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

MDM4 – *Mouse Double Minute 4*

MDM2 – *Mouse Double Minute 2*

mRNA – RNA mensageiro

miRNA - microRNA

mTOR - *mechanistic target of rapamycin kinase*

MUSTN1 – *musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1*

MYCL1 – *proto-oncogene, bHLH transcription factor*

NDUFAF3 - *NADH: ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3*

NFKB - *nuclear factor kappa B subunit 1*

NOXA ou PMAIP1 - *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

ORF – *open reading frame*

PARP-1 – *Poly (ADP-ribose) polymerase 1*

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PDCD4 – *programmed cell death 4*

PIRH2 ou RCHY1 - *ring finger and CHY zinc finger domain containing 1*

PI3K – *phosphoinositide 3-kinase*

PR – Receptor de progesterona, do inglês *progesterone receptor*

Pre-miRNA – miRNA precursor

Pri-miRNA – miRNA primário

PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

PUMA - *p53 upregulated modulator of apoptosis* ou BBC3 - *Bcl-2-binding component 3*

p27 ou CDKN1C – *cyclin dependent kinase inhibitor 1C*

p21 ou CDKN1A – *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

P57 ou CDKN1C - *cyclin dependent kinase inhibitor 1C*

RAD52 – *RAD52 homolog, DNA repair protein*

RISC – Complexo de silenciamento induzido por miRNA, do inglês *RNA-induced silencing complex*

RNU ou snoRNA – *small nucleolar RNA*

Ser – Serina

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

TGF-B - *transforming growth factor beta*

TNFAIP2 - *TNF alpha induced protein 2*

TOP β P1 – *DNA topoisomerase II binding protein 1*

TIMP1 – *IMP metallopeptidase inhibitor 1*

TIMP3 – *TIMP metallopeptidase inhibitor 3*

TP53 – Gene da proteína supressora de tumor, do inglês *Tumor protein 53*

TP63 - *tumor protein p63*

TP73 – *tumor protein p73*

TSC2 - *TSC complex subunit 2*

USP7 - *ubiquitin specific peptidase 7*, ou HAUSP - *herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*

USP10 - *Ubiquitin specific peptidase 10*

USP2 - *ubiquitin specific peptidase 2*

UTR – Região não traduzida, do inglês *untranslated region*

VEGFA - *vascular endothelial growth factor A*

LISTA DE SÍMBOLOS

μL microlitros

pb pares de base

ng nanogramas

pmol picomol

mM milimolar

U unidades da enzima

mL mililitros

μg microgramas

rpm rotações por minuto

nM nanomolar

M molar

V volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	CÂNCER.....	24
2.2	CÂNCER DE MAMA.....	25
2.3	SELEÇÃO DE miRSNPs e miRNAs.....	28
2.4	<i>TP53</i>	34
2.4.1	p53 e câncer de mama.....	40
2.5	MDM2 E MDM4.....	42
2.6	miRNAs.....	47
2.7	SNPs NO SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA miRNA.....	52
2.8	SNP rs4245739.....	53
2.9	SNP rs4245739 DE <i>MDM4</i> E OS miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p...53	
3	JUSTIFICATIVA	56
4	OBJETIVOS	58
4.1	OBJETIVO GERAL.....	58
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
5	MATERIAL E MÉTODOS	59
5.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR.....	59
5.1.1	Preparo do inserto 3'UTR do gene <i>MDM4</i>	59
5.1.2	Preparo do vetor.....	62
5.1.3	Digestão enzimática.....	63
5.1.4	Ligação.....	64
5.2	CLONAGEM.....	65
5.2.1	Obtenção de células <i>E. coli</i> DH10B competentes.....	65
5.2.2	Transformação das células <i>E. coli</i> DH10B com os vetores pmirGLO MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C.....	66
5.2.3	Sequenciamento.....	66
5.3	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	67
5.4	ENSAIO DE LUCIFERASE.....	69
5.4.1	Linhagem e cultivo celular.....	69

5.4.2	miRNA <i>mimic</i>	69
5.4.3	Transfecção.....	70
5.4.4	Ensaio de luciferase.....	71
5.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO.....	72
5.5.1	Extração de RNA.....	72
5.5.2	Síntese de cDNA.....	72
5.5.3	RT-qPCR.....	74
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
6	RESULTADOS	78
6.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR.....	78
6.1.1	Amplificação dos insertos MDM4_739A e MDM4_739C.....	78
6.2	CLONAGEM.....	78
6.2.1	Obtenção dos clones pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C.....	79
6.2.2	Sequenciamento.....	81
6.3	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	82
6.4	ENSAIO DE LUCIFERASE.....	83
6.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO.....	97
7	DISCUSSÃO	101
8	CONCLUSÃO	111
9	PERSPECTIVAS	112
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICE	126

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer de maior incidência no mundo, e o mais comum em mulheres (INCA, 2020). O câncer de mama é uma doença heterogênea de curso clínico variável, sendo que o prognóstico e as taxas de sobrevivência variam dependendo do tipo de câncer, estadiamento e resposta ao tratamento (SUN *et al.*, 2014).

O controle da progressão tumoral é dado, entre outros fatores, pela ação de genes supressores tumorais. O gene *TP53* é um supressor de tumor essencial na resposta aos danos ao DNA e exerce importante papel na manutenção da estabilidade genômica, controle do ciclo celular e apoptose. Dessa forma, mudanças nos níveis de p53 e de seus reguladores podem afetar sua função como supressor de tumor e predispor ao desenvolvimento de câncer (PIETSCH; HUMBEY; MURPHY, 2006; WYNENDAELE *et al.*, 2010; SUDA *et al.*, 2011). A atividade de p53 pode ser regulada por componentes da via de degradação por ubiquitinação. Entre estes últimos, a atividade de p53 é regulada predominantemente por MDM2 (*murine double minute 2*) e seu homólogo MDM4 (*murine double minute 4*) (THUT; GOODRICH; TIJAN, 1997). Estas proteínas inibem a função de transativação de p53, bloqueando o sítio de ligação de fatores basais de transcrição, além de participar da via de poliubiquitinação marcando o substrato para posterior degradação. Uma das formas de regular a expressão das proteínas MDM2 e MDM4, acontece ao nível de mRNA, por meio de regulação pós-transcricional mediada por miRNA.

Os miRNAs (microRNAs) são curtas sequências de nucleotídeos (18-25 nucleotídeos) não codificantes com a capacidade de regular a expressão gênica por um mecanismo pós-transcricional e apresentam potencial como biomarcadores de suscetibilidade a doença, de diagnóstico, prognóstico e direcionamento de terapia adequada (McGUIRE; BROWN; KERIN, 2015; MULRANE, *et al.*, 2013; CIPOLLINI; LANDI; GEMIGNANI, 2014). Os miRNAs atuam nas vias regulatórias associadas ao câncer, incluindo proliferação celular, migração e apoptose. A interação entre miRNA e mRNA ocorre pelo pareamento de bases de sequências complementares entre a região *seed* do miRNA e a região 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA alvo. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) situados nestes sítios de interação podem alterar a afinidade de

ligação entre miRNAs e mRNA alvo (BARTEL, 2009; MULRANE, *et al.*, 2013; CIPOLLINI; LANDI; GEMIGNANI, 2014; ANWAR; WULANINGSIH; WATKINS, 2017) criando ou desfazendo sítios de reconhecimento para um determinado miRNA, alterando assim o padrão de regulação existente.

O SNP rs4245739 A>C situado na 3'UTR do gene *MDM4* tem sido associado com vários tipos de câncer, entre eles câncer de mama. Em 2016 Gansmo *et al.* observaram que indivíduos portadores do alelo C do SNP rs4245739 de *MDM4* têm elevado risco ao câncer de ovário quando comparado aos portadores do alelo A. O alelo C do SNP rs4245739 cria um sítio de ligação para dois miRNAs, miR-191-5p e miR-887-3p. Stegeman *et al.* (2015) observaram a ligação de ambos os miRNAs com o mRNA do gene *MDM4*, através de ensaio com gene repórter luciferase. A capacidade de ligação do miRNA ao alelo A ou C na 3'UTR do gene *MDM4* regula a expressão deste gene e sua subsequente função na via do p53.

A integração de dados GWAS, ocorrência de SNPs em sítio de ligação 3'UTR – miRSNPs, e efeito *eQTL* previamente realizada pelo nosso grupo de pesquisa, resultou na identificação de 160 miRNAs que podem estar envolvidos no câncer de mama de maneira dependente de 43 SNPs. Para testar essa abordagem de bioinformática realizada previamente foram selecionados como candidatos para a validação funcional, o miRSNP rs4245739 A>C do gene *MDM4* e os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p, como já reportados em outros estudos, mas que ainda não foram analisados em linhagens de câncer de mama.

Aqui, pretende-se validar esta estratégia de predição *in silico*, explorando o impacto da variação genética em sítios-alvo destes miRNAs e seu efeito na expressão de *MDM4*, no contexto do câncer de mama.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer refere-se ao conjunto de mais de 100 doenças que apresentam crescimento desordenado – maligno- de células que invadem os tecidos e órgãos e podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2020).

Trata-se de uma doença caracterizada por alterações que ocorrem no material genético de uma célula e são transmitidas às suas descendentes por multiplicação clonal. A população de células derivada dessa célula ancestral comum é denominada monoclonal. As mudanças genéticas sucessivas acumuladas em uma célula e que conferem uma vantagem proliferativa leva estas células à transformação de um estado normal a células cancerosas (HANAHAN, WEINBERG, 2000; WEINBERG, 2008). As mutações gênicas, cromossômicas e mecanismos epigenéticos podem resultar em alterações nos programas de crescimento celular levando ao surgimento de grandes populações de células incompatíveis com a organização estrutural e fisiológica de um tecido normal. O desenvolvimento de um tecido maligno compreende um processo de progressão tumoral com múltiplas etapas, nos quais populações celulares se desenvolvem progressivamente com graus de anormalidade crescentes até chegar às formas mais agressivas e invasivas. Nesta progressão, um tecido saudável se torna hiperplásico, em seguida displásico e se torna uma neoplasia, que pode ainda se tornar metastático (WEINBERG, 2008). As alterações genéticas que ocorrem na tumorigênese podem ser resultado de fatores internos (fatores genéticos herdados) ou externos, que incluem agentes físicos, químicos e biológicos. A maioria dos casos de câncer resulta de mutações somáticas, porém as mutações herdáveis da linhagem germinativa contribuem para uma predisposição a vários tipos de câncer, dependendo do gene afetado (WEINBERG, 2008; ELLISEN, HABER, 2010).

Os dois principais conjuntos de genes envolvidos no desenvolvimento tumoral são os genes supressores de tumor e os proto-oncogenes. Os genes supressores de tumor atuam regulando negativamente a proliferação celular, sendo que a inativação de ambos os alelos desses genes leva à proliferação celular descontrolada. Os proto-oncogenes estimulam o crescimento e divisão

das células. A ocorrência de mutações gênicas ou cromossômicas (translocações) transforma os proto-oncogenes em oncogenes, de modo que a superexpressão ou expressão constitutiva desses produtos gênicos leva à proliferação desregulada (WEINBERG, 2008).

Hanahan e Weinberg (2011) destacaram a existência de traços moleculares, bioquímicos e celulares – capacidades adquiridas - comuns a maioria dos tipos de câncer que caracterizam seu fenótipo: sinalização proliferativa sustentada, capacidade de evadir os mecanismos de supressão de crescimento, escape do sistema imune, imortalidade replicativa, inflamação promovida pelo tumor, invasão e metástase, indução de angiogênese, instabilidade genômica e mutação, resistência a morte celular e metabolismo energético desregulado.

2.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer de maior incidência no mundo, e o mais comum entre as mulheres. Estima-se que no triênio 2020-2022 serão diagnosticados 66.280 novos casos no Brasil por ano (INCA, 2020).

É uma doença heterogênea de curso clínico variável, sendo que o prognóstico e as taxas de sobrevivência variam dependendo do tipo de câncer, seu estadiamento e resposta ao tratamento (SUN *et al.*, 2014).

O câncer de mama pode ser classificado de acordo com o tipo histológico e grau (ELSTON, ELLIS, 1991; ELLIS *et al.*, 1992). O tipo histológico corresponde ao padrão de crescimento dos tumores, sendo que o tipo mais comum de carcinoma de mama é o carcinoma ductal invasivo de tipo não especial (IDC-NST, *invasive ductal carcinoma of no special type*). A classificação por graus, refere-se ao nível de diferenciação, como o grau de formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e atividade proliferativa. O grau varia de 1 a 3 e reflete a agressividade, de modo que, os tumores de grau 1 são os mais diferenciados, e, portanto, menos agressivos, enquanto os de grau 3 são menos diferenciados, e conseqüentemente mais agressivos (WEIGELT, GEYER, REIS-FILHO, 2010; VUONG *et al.*, 2014).

Na prática clínica quatro biomarcadores são comumente utilizados para a classificação do câncer de mama de modo a auxiliar na definição do prognóstico

e direcionamento de terapia; a expressão do receptor de estrogênio (ER), do receptor da progesterona (PR), receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2 ou ERBB2) e Ki-67, avaliados por imunohistoquímica e/ou FISH (para HER2) (PRAT, PEROU, 2011; GOLDBIRTSCH *et al.*, 2013; CHEANG *et al.*, 2015).

Ao longo das últimas décadas, a grande quantidade de dados gerados a partir de abordagens moleculares permitiu uma nova forma de classificação do câncer de mama. Com base no perfil de expressão gênica gerado por microarranjo, inicialmente o trabalho desenvolvido por Perou *et al.* (2000) e posteriormente ampliado e validado por Sorlie *et al.* (2001, 2003), estabeleceu uma classificação molecular para o câncer de mama. Segundo os autores, existem quatro subtipos moleculares de câncer de mama ou *intrinsic subtypes of breast cancer*: Luminal, subdividido em Luminal A e Luminal B; HER2-*enriched*; basal-*like* e normal-*like*. Além das diferenças moleculares esses subtipos apresentam diferenças de incidência, resposta ao tratamento e sobrevivência (PRAT, PEROU, 2011). O subtipo luminal A é o mais comum, representando 50-60% dos casos. É caracterizado pela positividade para ER e PR e negativo para HER2, e apresenta baixa expressão de genes relacionados a proliferação celular, como o *MKI67* que codifica a proteína Ki-67, observados na imunohistoquímica. É um tumor de baixo grau histológico e, portanto, de bom prognóstico (WEIGELT, GEYER, REIS-FILHO, 2010; EROLES, *et al.* 2012). A taxa de recorrência é em torno de 27,8%, e menor do que nos demais subtipos. O tratamento destas pacientes é realizado principalmente com terapia hormonal, como o Tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio e com inibidores de aromatase em pacientes pós-menopausa (EROLES *et al.*, 2012).

O subtipo luminal B representa 10-20% dos casos de câncer de mama. Assim como o luminal A, é positivo para a expressão de ER, mas pode ser PR positivo ou negativo e HER2 positivo ou negativo. Em comparação ao luminal A, o subtipo luminal B apresenta maior grau histológico, pior prognóstico e um fenótipo mais agressivo com alto índice proliferativo demonstrado pela maior expressão de Ki67 por imunohistoquímica (WEIGELT, GEYER, REIS-FILHO, 2010; PRAT, PEROU, 2011; EROLES *et al.*, 2012; VUONG *et al.*, 2014;). O tratamento utilizado é a base de terapia hormonal, como Tamoxifeno, e quimioterapia neoadjuvante (EROLES, *et al.* 2012).

O subtipo *HER2-enriched* compreende 15-20% de todos os casos de câncer de mama. Este subtipo tumoral é caracterizado pela alta expressão de HER2 e negatividade para os receptores hormonais ER-/PR-. O gene do receptor para o fator de crescimento epidermal humano está localizado no cromossomo 17q12 e pode ser superexpresso como resultado de amplificação gênica. Como consequência, esse aumento da sinalização leva as células à proliferação descontrolada e as protege da morte celular programada (apoptose) (WEINBERG, 2010). Este subtipo apresenta uma alta expressão de genes relacionados à proliferação celular e tem alto grau histológico, e dessa forma não apresenta um prognóstico favorável, no entanto o tratamento com anticorpo monoclonal anti-HER2 – Transtuzumab® - tem melhorado a sobrevivência dessas pacientes tanto nos estágios iniciais da doença como em metástase (EROLES, *et al.* 2012).

O subtipo *basal-like* representa 10-20% dos casos de câncer de mama. É assim denominado por expressar genes que estão normalmente presentes em células mioepiteliais da mama normal, como citoqueratinas *CK5* e *CK17*, P-caderina, caveolina 1 e 2, nestina, *CD44* e *EGFR*. É caracterizado pela negatividade para os três receptores (ER-/PR-/HER2-). Costumam ocorrer em mulheres jovens, apresentam alto grau histológico e comprometimento de linfonodos com alta frequência. Tendem a ser carcinomas ductais infiltrantes, com necrose tumoral, margens em expansão e alto índice mitótico. Possuem um fenótipo agressivo, com padrão de metástase para o pulmão e sistema nervoso central (WEIGELT, GEYER, REIS-FILHO, 2010; EROLES *et al.*, 2012). Os tumores do subtipo *basal-like* frequentemente apresentam mutações do gene *TP53* e mutações de *BRCA1* (*BRCA1 DNA repair associated*), que caracterizam tumores agressivos e de prognóstico ruim (EROLES *et al.*, 2012). O uso de inibidores de PARP-1 (*poly-ADP ribosepolymerase-1*) é uma das alternativas no tratamento desse tipo de tumor, uma vez que a inibição da atividade de PARP-1 no reparo de quebras de DNA leva ao acúmulo dessas quebras e induz a célula a morte celular (PEROU, 2010; PRAT, PEROU, 2011; EROLES, *et al.*, 2012). Na prática clínica o termo triplo negativo é muito utilizado para referir-se ao subtipo *basal-like* devido a expressão negativa dos três receptores: ER, PR e HER2. Porém, muitas evidências têm demonstrado que a ausência de expressão destes marcadores, não é restrita ao subtipo *basal-like* (PEROU, 2010; PRAT, PEROU,

2011; EROLES *et al.*, 2012; PRAT *et al.*, 2013). O subtipo normal-*like* representa 5-10% de todos os casos de câncer de mama. São negativos para os receptores ER, PR e HER2, e podem ser classificados também como triplo negativos. Ao contrário do subtipo basal-*like* são negativos para CK5 e EGFR e expressam genes característicos de tecido adiposo. Apresentam um prognóstico intermediário entre os subtipos luminal e basal-*like*, porém é pouco caracterizado, havendo controvérsias sobre a sua real existência ou ser resultado de artefato técnico por contaminação com tecido normal (EROLES *et al.*, 2012). Desde a descrição inicial dos subtipos moleculares intrínsecos, a disponibilidade de técnicas moleculares tem contribuído para o surgimento e caracterização de outros subtipos moleculares, incluindo claudina baixa e apócrino molecular. Os tumores do subtipo apócrino molecular parecem ser similares ao subtipo HER2 e apresentam ativação da sinalização do receptor de androgênio (WEIGELT, GEYER, REIS-FILHO, 2010; VUONG, *et al.*, 2014). Os tumores do subtipo claudina baixa apresentam baixa expressão dos genes claudina, envolvidas nas junções epiteliais do tipo junções de oclusão, incluindo claudinas 3, 4 e 7, além da proteína E-caderina envolvida na junção célula-célula. Apresentam superexpressão de um conjunto de genes relacionados a resposta imune com intensa infiltração de células imunes. Possuem maior característica mesenquimal e baixa diferenciação luminal-epitelial, característica de transição epitelial-mesenquimal (EMT). A maioria dos tumores claudina baixa também são triplo negativos (ER-/PR-/HER2-) e portanto, podem ser considerados um subgrupo juntamente com o subtipo basal-*like*, porém alguns tumores são positivos para os receptores hormonais (PEROU, 2010; PRAT *et al.*, 2010; WEIGELT, GEYER, REISFILHO, 2010; PRAT, PEROU, 2011; EROLES *et al.*, 2012).

2.3 SELEÇÃO DE miRSNPs e miRNAs

Doenças complexas como o câncer não são determinadas por um único gene, mas por um conjunto de genes e variantes genéticas, assim como pelas interações gene-ambiente. Nesse contexto, estudos GWA (genome-wide association studies) realizam uma análise do genoma com o objetivo de

identificar variações na sequência de DNA que regulam uma característica complexa ou alteram o risco a uma doença. A abordagem empregada por estudos GWA compara a frequência de alelos encontradas em casos e controles e permitem identificar variantes genéticas associadas ao aumento do risco a uma determinada doença (UITTERLIDEN *et al.*, 2016; VISSCHER *et al.*, 2017; DEGHAN *et al.*, 2018). Estudos genômicos de associação (GWAS) têm identificado milhares de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) associados com diferentes doenças (GOULART *et al.*, 2015; VOSA *et al.*, 2015). Os SNPs consistem na mudança de uma única base na sequência de DNA com frequência maior que 1% entre a população, sendo o tipo mais comum de variação genética (HASSAN *et al.*, 2016; WILK and BRAUN, 2018).

A presença dessas variações polimórficas na região alvo de ligação de miRNA pode afetar a regulação gênica pós-transcricional, criando ou desfazendo sítios de reconhecimento para um determinado miRNA, e levar a uma maior ou menor suscetibilidade a doenças. Por isso, a importância de identificar SNPs que possam exibir um papel regulatório. Assim como estudos GWA, as análises de predição de alvos de miRNAs consistem em uma metodologia de integração de dados usando um conjunto de critérios que permitem identificar alvos de ligação de miRNAs e fornecer uma lista de genes alvos candidatos para estudos funcionais (ALVAREZ, 2014, ABIDIN *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2018; OULAS *et al.*, 2014). Cada ferramenta de predição emprega uma combinação de critérios para predição de alvos (TARANG, WESTON, 2014), porém, há três características que são comumente utilizadas pelos algoritmos: pareamento entre a região *seed* e o sítio alvo, conservação do sítio de ligação e a energia mínima livre (KUHN *et al.*, 2008, HAMZEIY, ALLMER, YOUSEF, 2013; PETERSON *et al.*, 2014, OULAS *et al.*, 2014). A maioria das ferramentas de predição leva em consideração o pareamento de bases entre a região *seed* do miRNA e o sítio alvo em 3'UTR, porém, também existem sítios alvos na 5'UTR e dentro da região codificante (MARTINEZ-SANCHEZ, MURPHY, 2013; PETERSON *et al.*, 2014). Com relação a conservação, tais ferramentas de predição identificam sequências 3'UTR ortólogas e realizam uma análise de conservação entre as espécies. Maior grau de conservação reflete uma predição mais confiável (TARANG, WESTON, 2014). A energia livre é empregada para avaliar a estabilidade do complexo miRNA-mRNA. Quanto menor a energia livre

disponível, maior a estabilidade termodinâmica (HUANG *et al.*, 2010; PETERSON *et al.*, 2014, TARANG, WESTON, 2014). Outras características que podem ser incorporadas aos algoritmos de predição incluem: a acessibilidade do sítio alvo; composição dos nucleotídeos flanqueando os sítios de ligação; proximidade de sítios de ligação na mesma região 3'UTR; possibilidade de GU *wobble* no pareamento e pareamento fora da região *seed* (OULAS *et al.*, 2014; HAMZEIY, ALLMER, YOUSEF, 2013; PETERSON *et al.*, 2014).

A complexa interação entre miRNA e mRNA pode dificultar a predição de alvos. Além disso, um miRNA pode ter como alvo vários transcritos, os quais por sua vez, podem ser regulados por múltiplos miRNAs (HAMZEIY, ALLMER, YOUSEF, 2013; PETERSON *et al.*, 2014; AMIRKHAH *et al.*, 2017).

Além da complexidade da interação descrita, ela torna-se ainda maior quando são detectados SNPs na região alvo de miRNA. Por isso, foram desenvolvidos algoritmos que levam em consideração a ocorrência de SNPs dentro dos sítios alvos de miRNA (AKHTAR *et al.*, 2015; AMIRKHAH *et al.*, 2017). Uma vez que as ferramentas *in silico* fornecem uma lista de alvos, podem ser realizadas abordagens experimentais para validação (KUHN *et al.*, 2008; ALVAREZ, 2014; AMIRKHAH *et al.*, 2017; ANKASHA *et al.*, 2018).

Sabendo do efeito que os SNPs apresentam sobre o risco a uma determinada doença e considerando a sua ocorrência em regiões regulatórias 3'UTR com sítio de ligação para miRNAs (miRSNPs), este trabalho buscou uma maneira de integrar predições oriundas de diferentes bancos de dados para verificar a influência de diferentes genótipos (miRSNPs) nos níveis de expressão de mRNA alvo de miRNAs e validá-las experimentalmente. Essa integração de dados é fundamental visto que apesar de dados GWAS possibilitarem a identificação de variantes associadas a doença, o impacto funcional desses SNPs em sítios regulatórios 3'UTR na regulação gênica precisa ser explorado de acordo com a associação ao miRNA predito e seu efeito sobre o gene alvo. Dessa forma, essa abordagem permite identificar variantes associadas a doenças complexas, como o câncer, que afetam a expressão gênica (efeito *eQTL*).

Este trabalho é a continuidade de um estudo de integração de dados de bioinformática e de regulação gênica relevantes ao câncer de mama, cujas análises foram executadas pelos professores Dr. Rodrigo Coutinho Almeida do

Laboratório de Genética Molecular Humana (Leiden University Medical Center) e Dr. Mauro Castro (UFPR).

Para a seleção dos SNPs candidatos aplicou-se uma estatística Bayesiana Ingênuo de acordo com os parâmetros de Von Mering *et al.* 2004, no qual os *scores* de predição fornecidos por cada ferramenta: PolymiRts v.3 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>); miRSNP (<http://bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/>); e miRSNPscore (<http://www.bigr.medisin.ntnu.no/mirsnpscore/>) foram normalizados a fim de se obter um *score* padronizado. Quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de a predição ser verdadeira. Nesta análise foram consideradas apenas predições com *score* maior que 0.7.

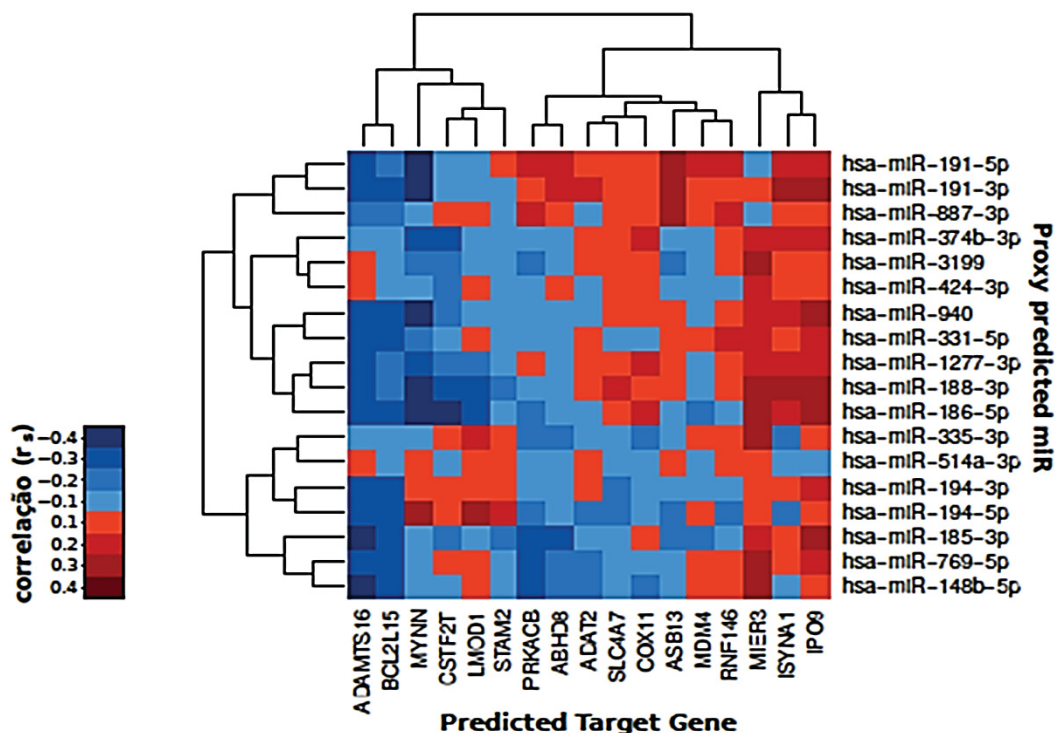
Em seguida, para identificar SNPs que estão correlacionados com expressão gênica (eQTL - *expression quantitative trait loci*), foram usados 3 bancos de dados: GTEx eQTL browser (<http://www.gtexportal.org/home/>), BloodeQTL browser (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>) e METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium).

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

Foram considerados candidatos os SNPs que obedeciam aos seguintes critérios concomitantemente: 1. SNPs com alta probabilidade de alterar a afinidade de ligação entre miRNA e mRNA de acordo com a Bayesiana Ingênuo Classificatória; 2. SNPs com efeito eQTL; 3. SNPs associados com câncer de mama de acordo com dados de GWAS.

A análise resultou em 338.894 miRSNPs candidatos ($\text{score} > 0,7$). Desses, 43 foram associados ao câncer de mama ($p < 10^{-8}$) e preditos por alterar a interação de 160 miRNAs com 20 genes alvos. Na análise de eQTL foram identificados miRSNPs com efeito cis-eQTL e a análise de correlação confirmou a predição de 18 miRNAs e 17 alvos ($p < 0,05$) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE miRNAs E GENES PREDITOS



Análise de correlação de Pearson entre a expressão de miRNAs e genes alvos preditos. FONTE: O autor (2020).

Entre os miRNAs preditos, para a validação funcional, optou-se por aqueles que interagem com genes de função conhecida e relacionados ao câncer. Desse modo, foi selecionado o gene *MDM4* e os miRNAs com os quais interage, visto que este gene está relacionado com a regulação da proteína p53, que tem reconhecido papel na regulação do ciclo celular e envolvimento no desenvolvimento do câncer (PIETSCH, HUMBEY, MURPHY, 2006; WYNENDAELE *et al.*, 2010; SUDA *et al.*, 2011; MEEK, 2015). Nesta análise foram preditos 6 miRNAs que interagem com 3 SNPs do gene *MDM4* e que estão relacionados ao câncer de mama (QUADRO 1), e selecionados os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p que interagem com o SNP rs4245739 da região 3'UTR do gene *MDM4* e que apresentam os maiores escores (FIGURA 2). O gene *MDM4* apresenta 11 éxons e o transcrito mais comum desse gene possui 10050 pb que codifica uma proteína de 490 aminoácidos. O SNP rs4245739 encontra-se na região 3'UTR do mRNA de *MDM4* e está localizado no chr1:204549714.

QUADRO 1 - SNPs E miRNAS DO GENE *MDM4* SELECIONADOS A PARTIR DE INTEGRAÇÃO DE DADOS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA, GWAS E *eQTL*

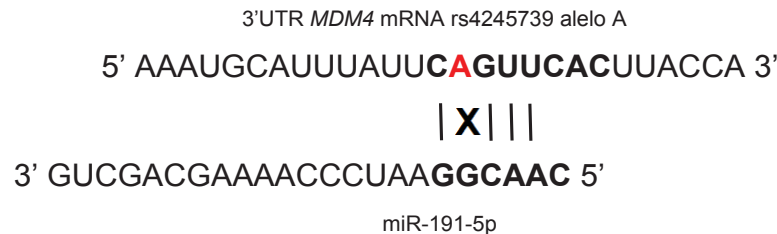
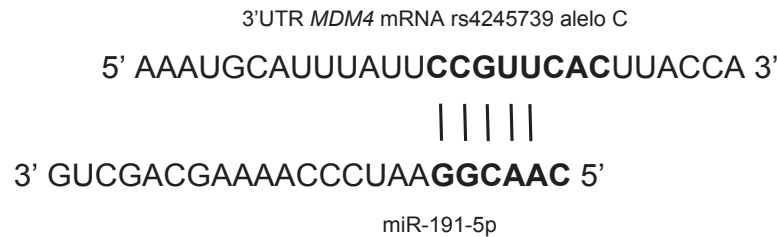
SNP	miRNA	Score	Efeito eQTL	MAF*	Alelo predito para ligação	Alvo
rs4245739	miR-887-3p	0.9861151	Down	C	C	MDM4
rs4245739	miR-203b-3p	0.9067668	Down	C	A	MDM4
rs4245739	miR-191-5p	0.9672482	Down	C	C	MDM4
rs4245739	miR-4427	0.8636520	Down	C	A	MDM4
rs10900596	miR-1257	0.9325023	Down	T	C	MDM4
rs10900597	miR-5589-3p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

*Alelo de menor frequência (MAF) para a população 'global' de acordo com o 1000 Genomas.

Fonte: dbSNP, disponível em < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4245739#frequency_tab>.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE miR-887-3p E miR-191-5p E A REGIÃO 3'UTR DO GENE *MDM4*





Em negrito a região *seed* do miR-887-3p e miR-191-5p e o sítio de interação na região 3'UTR de *MDM4*. A presença do SNP rs4245739*C cria um sítio de ligação para estes miRNAs. FONTE: O autor (2020).

2.4 *TP53*

O controle da progressão tumoral é dado, entre outros fatores, pela ação de genes supressores tumorais. O gene *TP53* é um supressor de tumor essencial na resposta aos danos ao DNA e em resposta ao estresse celular atua em diferentes vias, provocando a parada do ciclo celular e interrupção da proliferação; facilita o reparo de danos ao DNA e induz a apoptose. Entre os vários genes que regula estão: *WAF1/CIP1*, *GADD45*, *14-3-3-σ*, *CDC25* e *ciclina B1* – de controle do ciclo celular; *p21*, *BAX*, *PUMA*, *NOXA* – que induzem apoptose; *PTEN*, *TSC-2* *IGF-BP3* – envolvidos na via m-TOR que controlam o crescimento e divisão celular através de regulação do metabolismo (MEEK, 2015).

O gene ancestral que deu origem ao gene *TP53* em anêmonas tinha como função proteger os gametas da linhagem germinativa dos danos ao DNA. Essa função persiste ao longo de milhões de anos em diversos organismos, como insetos, vermes, vertebrados e humanos, destacando assim a sua importância (BELYI *et al.*, 2010; HAUPT, 2017). O gene *TP53* mantém sua função atuando na manutenção da integridade e fidelidade do DNA nas células somáticas e na duplicação das células progenitoras prevenindo a replicação dos danos (BELYI *et al.*, 2010).

De acordo com o papel central desse gene, mutações germinativas do

gene *TP53* são a causa da síndrome Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-Like Síndrome. Essas síndromes de predisposição hereditária ao câncer, caracterizam-se pelo aparecimento precoce de tumores, incluindo sarcomas, carcinoma de adrenal, câncer de mama e de cérebro (KAMADA *et al.*, 2016).

A família de genes *TP53* compreende os genes *TP63* e *TP73* (BELYI *et al.*, 2010; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018; KAMADA *et al.*, 2016). O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17p13.1 e é composto de 11 éxons, sendo que a sequência codificante começa no segundo éxon. A isoforma completa da proteína p53 possui 393 aminoácidos (BELYI *et al.*, 2010; KAMADA *et al.*, amada, 2016). O gene *TP63* está localizado no cromossomo 3q27-29 e composto por 14 éxons, assim como o gene *TP73* localizado no cromossomo 1p36.3 (BELYI *et al.*, 2010). Cada uma dessas proteínas tem a capacidade de regular a transcrição de um conjunto de genes em comum, como aqueles envolvidos no reparo de danos ao DNA nas células germinativas; assim como de genes específicos (BELYI *et al.*, 2010). Os nucleotídeos que formam o motivo de reconhecimento de ligação ao DNA são altamente conservados entre esses genes, cujas proteínas exibem algumas diferenças nas características estruturais como tetramerização e estabilidade (KAMADA *et al.*, 2016; MEEK, 2015; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018). A proteína p53 é expressa de maneira constitutiva e em maiores níveis, enquanto as proteínas p63 e p73 são expressas em células e condições fisiológicas específicas. A proteína p53 atua como importante fator de transcrição de genes envolvidos em inúmeras das vias descritas como hallmarks do câncer, destacando seu efeito antiangiogênese, no controle da inflamação e resposta imune, na repressão de metástase e na estabilidade genômica (BERTHEAU *et al.*, 2013).

A proteína MDM2 é a principal reguladora da via p53, inibe sua atividade transcricional, promove realocização celular e interfere na estabilidade da proteína. MDM2 possui um domínio RING com atividade E3 ligase e exerce papel central na degradação da proteína p53 via ubiquitinação e degradação pelo proteossomo 26S (INOUE, FRY, FRAZIER, 2016; LIU *et al.*, 2016; KWON, SAINDANE, BAEK, 2017; MANSOUR, 2018). A ubiquitinação é uma modificação covalente que envolve a adição de moléculas de ubiquitil altamente conservadas a resíduos de lisina da proteína, que é posteriormente degradada pelo proteossomo 26S (LINARES *et al.*, 2003; MENDOZA, MANDANI, MOMAND,

2014). As proteínas alvo podem ser monoubiquitinadas, multiubiquitinadas ou poliubiquitinadas. A monoubiquitinação atua sobre o transporte de proteína e exporte nuclear; a multiubiquitinação desencadeia endocitose e a poliubiquitinação da proteína alvo, promove a degradação via proteossomo 26S (BROOKS, GU, 2011; KWON, SAINDANE, BAEK, 2017; MANSOUR, 2018; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018). Entre as proteínas com atividade E3 de poliubiquitinação estão MDM2, Pirh2 e COP-1 (KWON, SAINDANE, BAEK, 2017; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018). A ubiquitinação pode ativar ou bloquear vias relacionadas ao câncer, seja pela desregulação da atividade e expressão de E3 ligases e deubiquitina ligases que atuam sobre agentes promotores ou supressores tumorais (MANSOUR, 2018). O processo de ubiquitinação pode ser revertido pela ação de enzimas de deubiquitinação (DUB). Essas enzimas separam a ligação entre o resíduo glicina da ubiquitina e o resíduo lisina da proteína alvo. Podem atuar diretamente sobre p53 ou estabilizando E3 ligases. USP7 (ubiquitin-specific protease 7) ou HAUSP (herpes virus-associated ubiquitin-specific protease) deubiquitina e estabiliza p53, assim como MDM2 de uma maneira independente de p53. Enquanto USP10 interage e estabiliza apenas p53. A enzima USP2a tem como alvo as proteínas MDM2 e MDM4 e por isso, mantém a estabilidade de p53 (BROOKS, GU, 2011; CHAO, 2015; KWON, SAINDANE, BAEK, 2017).

A interação entre p53 e MDM2 ocorre através do domínio de transativação da porção N-terminal de p53 e uma fenda na porção N-terminal de MDM2. Essa interação é possível devido a complementariedade estérica entre as regiões, porém a superfície de contato entre as proteínas é relativamente pequena (SAHA, KAR, SA, 2015). p53 atua como fator de transcrição e controla a expressão de vários genes, entre eles MDM2 – seu principal regulador negativo. Dessa forma, estabelece um mecanismo de regulação por feedback negativo (BROOKS, GU, 2011; CHAO, 2015; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018).

Em resposta ao estresse celular alguns mecanismos interferem na interação entre MDM2 e p53, como a fosforilação dos resíduos Ser15 e Ser20 de p53 por ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 e Chk2 e dessa forma, estabilizam p53. De outro modo, a acetilação de resíduos lisina na porção C-terminal de MDM2 pode competir e impedir a função de ubiquitinação em p53 (BROOKS, GU, 2011).

Meios de perturbar a interação MDM2-p53 têm sido alvo de estudos como estratégias terapêuticas. Nutlin, um composto da classe imidazolina, foi desenvolvido e vem sendo testado para competir na ligação e desfazer o complexo formado entre essas duas proteínas. RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) tem a capacidade de ligar-se a porção N-terminal de p53 com alta afinidade e impede a interação MDM2-p53, levando a reativação da parada do ciclo celular e indução de apoptose (BROOKS, GU, 2011; SAHA, KAR, SA, 2015; HIENTZ *et al.*, 2017; MANSOUR, 2018; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018).

Apesar de MDM2 exercer papel central no controle dos níveis de p53, outras proteínas também são capazes de promover ubiquitinação. Enzimas E3 ligases com diferentes domínios catalíticos RING tais como Pirh2, COP1, ARF-BP1, CHIP, WWP1, UBE4B, p300/CBP, UBC13 e E4F1 induzem ubiquitinação de p53 de modo independente de MDM2 e levam a degradação mediada pelo proteossomo. A ubiquitina ligase associada a chaperona (CHIP, do inglês *chaperone-associated ubiquitin ligase*) exerce sua função dependente da associação com chaperonas Hsc70 e Hsp90 (BROOKS, GU, 2011; CHAO, 2015; KWON, SAINDANE, BAEK, 2017; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018).

A ativação de p53 ocorre em resposta a diversos estímulos durante o estresse celular e danos ao DNA. A proteína ARF codificada pelo gene *CDKN2A/INK4A* é um inibidor de MDM2. A ativação de oncogenes, como *Ras*, *Myc*, *E2F-1* e *B-catenina* induzem aumento dos níveis de ARF, seja por estímulo da transcrição, inibição da degradação ou separação da ubiquitina ligase da qual é alvo. Dessa forma com a estabilização de ARF, esta interage com MDM2 e inibe sua função de ubiquitina ligase. Além disso, ARF também é capaz de promover o sequestro nucleolar de MDM2. A ação E3 ligase de MDM2 também é inibida pela ligação de proteína ribossomais específicas em resposta ao estresse ribossomal/nucleolar (MEEK, 2015).

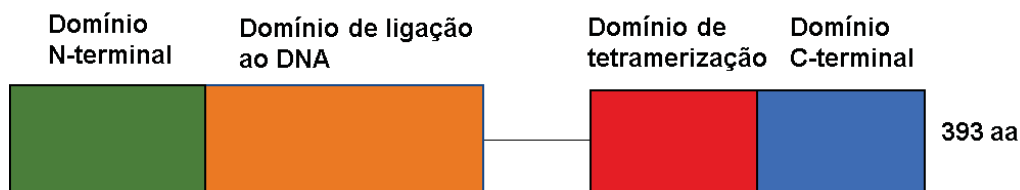
A proteína MDM4 atua em conjunto com MDM2 na regulação dos níveis proteicos de p53. Embora MDM4 não apresente a função de enzima E3 ligase, sua associação com a proteína MDM2 garante a eficiência do processo de ubiquitinação. Os níveis de MDM4 podem ser regulados pela fosforilação dos resíduos Ser342 e Ser367 por CHK2 e Ser403 por ATM. O resíduo Ser367

fosforilado permite a ligação de 14-3-3- γ que ubiquitina e leva MDM4 a degradação (MEEK, 2015).

Duas proteínas quinases relacionadas – ATM (ataxia teleangiectasia mutated) e ATR (ataxia teleangiectasia- and Rad3-related) – estimulam a ativação de p53 em resposta a quebras de dupla e simples fita, respectivamente. ATM induz a fosforilação de resíduos serina de MDM2, sendo a principal a Ser395 localizada no domínio C-terminal. Essa modificação alostérica inibe a associação de MDM2 a outras proteínas e sua atividade de ubiquitinação, estabilizando p53. A proteína quinase c-Abl ativada por ATM também induz a fosforilação de MDM2 inativando-a (MEEK, 2015).

A proteína p53 possui diferentes domínios relacionados as funções que desempenha. Na porção amino-terminal estão localizados dois domínios de transativação (TAD) TAD1 (aminoácidos 1-42) e TAD2 (aminoácidos 43-63). Esses domínios são essenciais para sua atividade transcricional, e onde ocorre a interação com diversas proteínas, como os fatores de transcrição TFII e proteínas de ligação ao TATA box. O principal regulador negativo de p53 que atua por meio de modificação pós-traducional liga-se a resíduos de aminoácidos específicos localizados nesse domínio. O domínio rico em prolina (PRD, do inglês pro-rich domain) (aminoácidos 61-92) está envolvido na apoptose, na estabilização da proteína e interação com outras proteínas. A região central (aminoácidos 101- 300) compreende o domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês DNA binding domain) que tem a capacidade de ligar-se a um sítio específico no DNA, que consiste numa região com quatro repetições de cinco nucleotídeos, cujos aminoácidos são críticos na formação do domínio de ligação ao DNA. O domínio de tetramerização (aminoácidos 326-356) medeia a formação da estrutura tetramérica característica da proteína p53 funcional e, portanto, essencial em sua função de transativação e supressor de tumor. O domínio C-terminal – último domínio – está relacionado a estabilidade e ligação a sequências não específicas no DNA (BELYI *et al.*, 2010; KAMADA *et al.*, 2016; MEEK, 2015) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA p53



Representação esquemática dos domínios estruturais da proteína p53 *full-length*. Em verde o domínio N-terminal, em laranja o domínio de ligação ao DNA, em vermelho o domínio de tetramerização e em azul o domínio C-terminal. A porção amino-terminal é essencial para a atividade como fator de transcrição e através da qual ocorre interação com os reguladores negativos, MDM2 e MDM4. FONTE: O autor (2020).

A proteína p53 funcional apresenta uma estrutura tetramérica essencial para a ligação sítio-específica ao DNA, interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais. No DNA, a sequência elemento de resposta a p53 contém 4 repetições de 5 nucleotídeos (dois decâmeros) em que cada DBD de p53 reconhece uma dessas unidades de repetição (KAMADA *et al.*, 2016; SAHA, KAR, SA, 2015; BRAZDA, COUFAL, 2017; NIAZI, PUROHIT, NIAZI, 2018). A maioria das mutações do gene *TP53* são do tipo *missense* e ocorrem predominantemente no domínio de ligação ao DNA. As mutações que ocorrem no domínio de tetramerização desestabilizam a formação do tetrâmero (KAMADA *et al.*, 2016). Células da linhagem germinativa assim como células cancerosas com mutações de um dos alelos de *TP53* podem apresentar heterotetrâmeros formados por proteínas mutadas e do tipo selvagem. Essas células podem formar uma estrutura tetramérica, porém sem a capacidade de exercer sua função, visto que a presença de uma única subunidade mutada pode comprometer a funcionalidade do tetrâmero em um efeito conhecido como dominante negativo (KAMADA *et al.*, 2016; WEINBERG, 2008).

Além da ubiquitinação, outras modificações pós-traducionais como acetilação, metilação, fosforilação, nedilação e sumoilação têm efeitos sobre a estabilidade e função da proteína p53 (BROOKS, GU, 2011; CHAO, 2015).

miRNAs atuam em nível pós-transcricional no controle dos níveis de p53 ao se ligar a região 3'UTR de seu mRNA, entre eles miR-125b e miR-504. Elevada expressão do miR-125b em câncer colorretal foi associada com pior prognóstico e diminuição de sobrevida (LE *et al.*, 2009). Em neuroblastoma a

ligação do miR-380-5p a 3'UTR diminuiu os níveis de p53. Ao contrário, a inibição deste miRNA induziu apoptose em células tronco embrionárias e células de neuroblastoma (SWARBRICK *et al.*, 2010).

miRNAs também se ligam a reguladores de p53, como MDM2 e MDM4. miR-29b, miR-25, miR-32, miR-18b e miR-192/194/215 têm como alvo MDM2 e os miRNAs miR-191-5p, miR-887-3p, miR-34a, miR-10a e let-7 tem como alvo MDM4 (Li, 2016). De modo contrário, p53 também regula a expressão de vários miRNAs envolvidos nas vias de resposta ao estresse celular e dano ao material genético. A família de genes do miR-34 foi a primeira descrita por ser diretamente regulada por p53 (RAVER-SHAPIRA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2016).

2.4.1 p53 e câncer de mama

Mudanças nos níveis de p53 e de seus reguladores podem afetar a função como supressor de tumor e predispor ao desenvolvimento de câncer (PIETSCH, HUMBEY, MURPHY, 2006; WYNENDAELE *et al.*, 2010; SUDA *et al.*, 2011;). *TP53* está frequentemente mutado em vários tipos de cânceres (PIETSCH, HUMBEY, MURPHY, 2006) e, aproximadamente metade de todos os tumores possuem alterações deste gene (GREENBLATT *et al.*, 1994).

Em câncer de mama, o gene *TP53* encontra-se mutado em 20-30% dos casos, sendo que a frequência da mutação está relacionada ao subtipo tumoral (BERTHEAU *et al.*, 2013; DUFFY, *et al.* 2018). 17% dos tumores luminal A e 41% dos tumores luminal B apresentam a mutação e uma maior frequência entre os subtipos molecular apócrino e basal-*like*, sendo 69% e 88% dos casos, respectivamente. Aproximadamente 50% dos casos com amplificação de HER2 também possuem a mutação. O tipo de alteração envolvida também exhibe um padrão de distribuição por subtipos. Tumores do subtipo luminal apresentam maior frequência de mutações por substituição de bases, que podem levar a proteína com novas funções. Entre os tumores molecular apócrino e basal-*like*, as mutações do tipo *Indel* (inserção/deleção) podem resultar em proteína p53 truncada e não funcional (BERTHEAU *et al.*, 2013). Em geral, a maioria são mutações de ponto, com 73% dos casos de substituições de uma única base, 19% de pequenas deleções e 5% de inserções. Em relação ao local em que ocorrem, a grande maioria (81%) está localizada nos éxons 5-8, 10% no éxon 4,

6% no éxon 10 e com menor frequência (~ 2%) nos éxons 2, 3, 9 e 11. Além do subtipo molecular, a frequência das mutações também está associada a classificação histológica, sendo mais comum entre os tumores ductal, linfonodo-positivo, ER-negativo e HER2-positivo (DUFFY, SYNNNOTT, CROWN, 2018). O *status* desse gene também influencia na resposta ao tratamento, em que tumores ER positivos com *TP53* selvagem se mostram resistentes a quimioterapia, enquanto aqueles com mutações em *TP53* são sensíveis (BERTHEAU *et al.*, 2013).

Devido à alta prevalência, o *status* do gene *TP53* exibe potencial como biomarcador e alvo terapêutico no câncer de mama, sendo que na maioria dos casos, a presença de mutação é correlacionada com um pior prognóstico. Apesar disso, a avaliação do tecido tumoral feita por imunistoquímica tem limitações em relação a presença de mutações e a estabilização da proteína, uma vez que mutações podem levar a proteínas truncadas e não estáveis. Assim a avaliação ao nível proteico por esta técnica não é empregada para determinação do prognóstico ou direcionamento da terapia (BERTHEAU *et al.*, 2013; DUFFY, SYNNNOTT, CROWN, 2018).

A busca por estratégias terapêuticas que têm como alvo a proteína p53 deve-se ao fato de que grande parte dos casos (~80%) de câncer de mama do subtipo triplo negativo, assim como aqueles com metástase no cérebro (~90%) não apresentam uma terapia efetiva. Alguns dos compostos voltados a reativação das proteínas mutantes são PRIMA-1 (2,2-bis(hydroxymethyl)quinuclidin-3-one ou APR-017), APR-246 (2(hydroxymethyl)-2-(methoxymethyl)quinuclidin-3-one), PK1007 (5-chloro-2-(methylsulfonyl)-4-pyrimidinecarboxylic acid) e COTI-2 (N'-(5,6,7,8-Tetrahydroquinolin-8-ylidene)-4-(2-pyridyl)piperazine-1-carbothiohydrazide) (SAHA, KAR, SA, 2015; HIENZT *et al.*, 2017; DUFFY, SYNNNOTT, CROWN, 2018). PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis 1) atua para restaurar as características da proteína, como a sequência específica de ligação ao DNA e a capacidade de induzir apoptose. Tumores derivados das linhagens BT-474, HCC-1428 e T47-D em modelos animais tiveram o crescimento inibido pela administração de PRIMA-1, o que não aconteceu com os tumores derivados da linhagem MCF-7 que apresenta o gene *TP53* selvagem (DUFFY, SYNNNOTT, CROWN, 2018). Linhagens celulares de câncer de mama p53 mutantes exibiram diminuição da

migração e indução de apoptose com o uso de APR-246. Porém sem associação com ER, HER2 *status* e subtipo molecular (SYNNOTT *et al.*, 2017).

2.5 MDM2 E MDM4

O gene *MDM2* (*murine double minute 2*) ou *HDM2* (GeneID: 4193) está localizado no cromossomo 12q14.3-q15 e expressa uma proteína de 491 aminoácidos. A proteína MDM2 regula negativamente a proteína p53 por meio de poliubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossomo. O gene *MDM4* (*murine double minute 4*) ou *HDMX* (GeneID: 4194) está localizado no cromossomo 1q32 e codifica uma proteína de 490 aminoácidos. *MDM2* e *MDM4* são parálogos e fazem parte da família do gene *MDM2*. A similaridade de sequência indica que eles se originaram da duplicação de um gene ancestral (WADE, WANG, WAHL, 2010).

As proteínas MDM2 e MDM4 possuem 31% de identidade entre os resíduos de aminoácidos e apresentam padrões similares de organização dos domínios proteicos. Estas proteínas contêm um domínio amino-terminal de ligação ao p53 pelo qual inibem a função de transativação de p53, e um domínio *RING-finger* carboxi-terminal; ambos bem conservados entre MDM2 e MDM4. Através dos domínios *RING-finger* as proteínas MDM2 e MDM4 formam um heterodímero que aumenta a eficácia da atividade inibitória de MDM2 (LINARES *et al.*, 2003; MENDOZA, MANDANI, MOMAND, 2014). O domínio *RING* de MDM2 tem uma atividade intrínseca de enzima E3 da via de ubiquitinação que promove a ligação de subunidades de ubiquitil aos resíduos de lisina da proteína alvo (LINARES, *et al.*, 2003; MENDOZA; MANDANI; MOMAND, 2014). Ao contrário, MDM4 não possui essa função enzimática intrínseca ao domínio *RING*. O domínio central ácido auxilia na atividade de E3 ubiquitina ligase. A MDM2 apresenta em seguida ao domínio N-terminal um sinal de localização nuclear (NLS) na posição 178 e um sinal de exportação nuclear (NES) na posição 192. A proteína MDM4 não possui NLS, e assim, localiza-se primariamente no citoplasma. Em situações de dano ao DNA, MDM4 é transportada ao núcleo (FIGURA 4) (KARNI-SCHMIDT, LOKSHIN, PRIVES, 2016; MARKEY, 2011).

FIGURA 4 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS MDM2 E MDM4



Representação esquemática dos domínios estruturais das proteínas MDM2 e MDM4. Em azul o domínio de ligação a p53. Em laranja o domínio ácido, seguido pelo domínio *Zinc finger* representado em verde. Em roxo representado o domínio RING. As proteínas MDM2 e MDM4 interagem através dos domínios *RING-finger* formando um heterodímero. FONTE: O autor (2020).

Assim como MDM2, a MDM4 inibe a função de transativação de p53, bloqueando o sítio de ligação de fatores basais de transcrição, além de atuar na via de poliubiquitinação da proteína p53 em conjunto com MDM2 através da formação do heterodímero (MENDOZA, MANDANI, MOMAND, 2014).

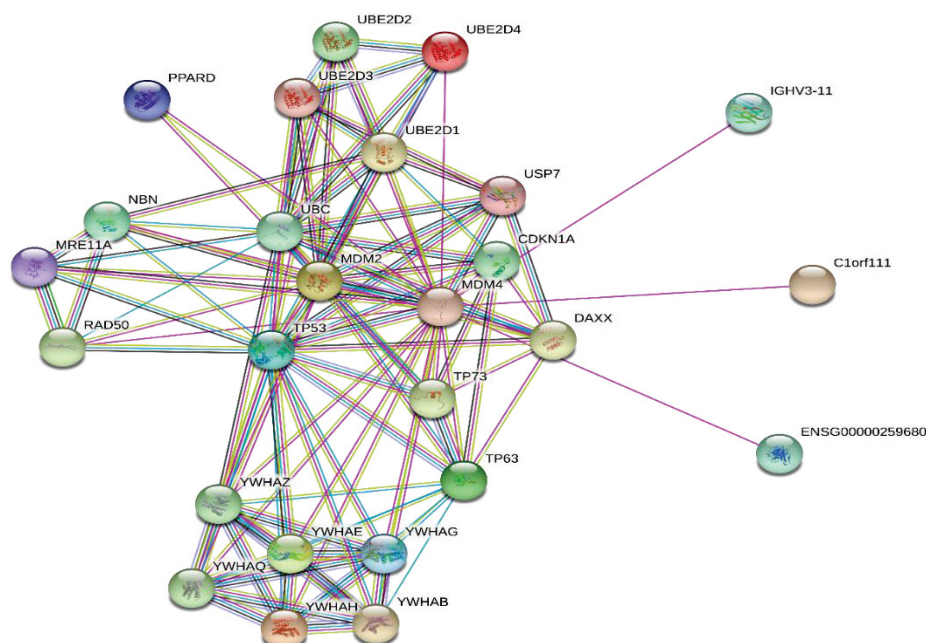
De acordo com a função regulatória desempenhada por MDM4 sobre p53, níveis elevados de mRNA são observados em muitos casos de câncer, sendo que em alguns desses o aumento do número de cópias leva a esse aumento. A proteína MDM4 está superexpressa e o gene *MDM4* amplificado em torno de 10-20% dos tumores, entre eles de pulmão, cólon, retinoblastoma e câncer de mama. Portanto, níveis aumentados da proteína MDM4 podem levar à inativação de p53 aumentando os riscos de desenvolvimento tumoral (LAURIE *et al.*, 2006; TOLEDO, WAHL, 2006; MENDOZA, MANDANI, MOMAND, 2014).

Da mesma forma que a proteína MDM2 marca p53 para degradação, a proteína p53 é capaz de controlar a transcrição de MDM2 devido a presença do elemento de resposta a p53 localizado no primeiro íntron do gene. Por meio desse mecanismo de retroalimentação negativa os níveis de p53 são mantidos em níveis relativamente baixos sob condições normais (MENDOZA, MANDANI, MOMAND, 2014).

O principal alvo de MDM2 e MDM4 é a proteína p53, porém são capazes de interagir com outras proteínas que podem estar envolvidas no desenvolvimento, morfogênese e tumorigênese (FIGURA 5) (WADE, WANG, WAHL, 2010). A proteína MDM4 atua sobre outras vias relacionadas ao câncer assumindo um papel oncogênico. Níveis elevados dessa proteína foram correlacionados com a transição epitélio-mesênquimal em linhagens celulares

de mama e próstata (AIELLO *et al.*, 2018). A alteração do metabolismo lipídico e termogênese foi relacionada a ausência de MDM4 em modelos animais, evidenciando o papel de p53 sobre a regulação dessa via. Essa observação destacou que em condições de elevados níveis da proteína MDM4 e inibição de p53 uma dieta rica em gordura resulta em acúmulo de gordura branca nos adipócitos, com aumento do risco relacionado a obesidade e câncer (KON *et al.*, 2018; DENG *et al.*, 2016). MDM4 também pode estar envolvida no crescimento celular por meio da estimulação da via de sinalização NF- κ B (QI *et al.*, 2015).

FIGURA 5 – VIAS DE INTERAÇÃO ENTRE MDM4 E OUTRAS PROTEÍNAS



Vias de interação entre a proteína MDM4 e outras proteínas obtidos pela plataforma STRING. Os nós coloridos representam a proteína central e os *edges* representam a interação entre as proteínas. Os *edges* em azul correspondem a interações previstas a partir de bases de dados e em rosa aquelas validadas experimentalmente. FONTE: STRING v11 (2019), disponível em < <https://version11.string-db.org/cgi/network.pl?taskId=r415JO6SQH93> >.

Modificações pós traducionais podem interferir na estabilidade das proteínas MDM e conseqüentemente regular os níveis de p53. As AKT quinases, por exemplo, que estão envolvidas nas vias de crescimento celular e ativadas em muitos tipos de câncer, tem como alvos MDM2 e MDM4. A fosforilação das Ser166 e Ser186 de MDM2; e da Ser367 de MDM4 promove a estabilização dessas proteínas e, portanto, está associada com a inibição de p53 (MARKEY, 2011).

Além das modificações pós traducionais, as vias de sinalização

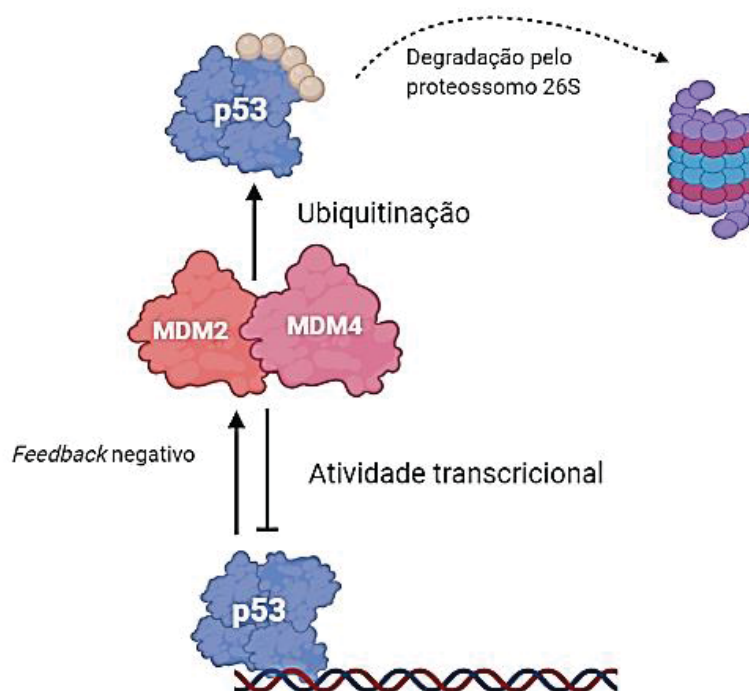
intracelular também participam da regulação das proteínas MDM. A via de ativação PI3K- Akt/PKB quinase relacionada a sobrevivência celular, promove a fosforilação de MDM2 e o deslocamento dessa proteína para o núcleo, que irá desencadear a ubiquitinação de p53 (WEINBERG, 2008). A expressão do receptor alfa de estrogênio induz a expressão de MDM4 (SWETZIG, WANG, DAS, 2016).

Outra via de sinalização mitogênica que regula os níveis de MDM2 é a via Ras→Raf→MAPK, que através dos fatores de transcrição Ets e AP-1, ativam a transcrição do gene MDM2, elevando os níveis da proteína, e consequentemente a supressão de p53 (WEINBERG, 2008). Essa via de sinalização também está relacionada a elevados níveis de expressão de MDM4 em alguns tipos de câncer, como observado na linhagem celular MCF-7 de câncer de mama (GILKES *et al.*, 2008).

Sob condições de dano ao DNA, as quinases ATM e CHK2 podem fosforilar resíduos de serina no domínio RING de MDM2 e MDM4 provocando a dissociação do heterodímero e/ou a desestabilização dessas proteínas (WADE, 2013) e permite a ubiquitinação por MDM2 (MARKEY, 2011).

A proteína ARF também atua como regulador de MDM2, liga-se a essa proteína e a sequestra no nucléolo (WEINBERG; SHADFAN, 2012). Além disso, ARF parece ser capaz de promover a ubiquitinação de MDM4 (MARKEY, 2011; SHADFAN, LOPEZ-PAJARES, 2012). Por regular negativamente as proteínas MDM, ARF atua como supressor tumoral. Níveis elevados do fator de transcrição E2F promovem a transcrição de ARF (FIGURA 6) (WEINBERG, 2008; SHADFAN, LOPEZ-PAJARES, 2012).

FIGURA 6 – VIAS DE REGULAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS p53 - MDM2 - MDM4



Representação esquemática das duas principais vias regulatórias envolvendo as proteínas p53, MDM2 e MDM4. A proteína MDM2 no heterodímero MDM2/MDM4 promove a poliubiquitinação da proteína p53 encaminhando-a para degradação no proteossomo 26S. A ligação das proteínas MDM2 e MDM4 a proteína p53 impede sua função como fator de transcrição. A proteína p53, por sua vez, é capaz de controlar a transcrição de MDM2, estabelecendo um mecanismo de feedback negativo. FONTE: O autor (2020).

Diferentes isoformas da proteína MDM4 são geradas a partir do *splicing* alternativo do pre-mRNA e de modificações pós-traducionais. As duas principais isoformas são MDM4-FL (MDM4-full length) e MDM4-S (MDM4-short) que diferem pela exclusão do éxon 6 na segunda isoforma. A isoforma MDM4-S possui o domínio de ligação a p53, mas não o domínio central e a região C-terminal. Cada um das isoformas exibe diferente estabilidade e influencia os níveis proteicos, sendo a MDM4-FL mais estável (HAUPT *et al.*, 2019).

A prevalência de uma das isoformas e sua capacidade de regular p53 é alvo de muitos estudos. MDM4-S foi apontada pela maior habilidade em inibir a atividade de p53 (RALLAPALLI *et al.*, 2003) e exibir altos níveis em vários cânceres (BARTEL *et al.*, 2005; LENOS *et al.*, 2012, LIU *et al.*, 2012). p53 parece não ser afetada pela inibição promovida por MDM4-FL em condições de estresse, devido a maior síntese da isoforma MDM4-S (BARDOT, TOLEDO, 2017). Defeitos de *splicing* em tumores aumentam os níveis de MDM4-S favorecido pelo perfil oncogênico (PANT *et al.*, 2017).

Entre os miRNAs que tem MDM4 como alvo estão miR-191, miR-887, miR-10a, miR-370 e miR-766. O miR-191 mantém MDM4 em baixos níveis na retina fetal humana, porém no retinoblastoma sua expressão está aumentada (McEvoy *et al.*, 2012). O miR-10a por sua vez, encontra-se aumentado em leucemia mieloide aguda (OVCHARENKO *et al.*, 2011). O risco de câncer colorretal e os níveis do miR-370 estão inversamente correlacionados, em concordância ao seu efeito sobre MDM4 e conseqüentemente p53 (SHEN *et al.*, 2018).

O mecanismo de regulação de MDM4 por miRNAs também pode influenciar na resposta a terapia. O miR-885-3p promove resposta positiva ao tratamento com cisplatina. Esse composto desencadeia ligação do miRNA a região 5'UTR de *MDM4* e leva a realocização da proteína do citoplasma para a mitocôndria onde é capaz de se ligar a BCL2 e induzir apoptose (HUANG, CHUANG, RATOVITSKI, 2011). A relação entre os baixos níveis do miR-1307 e aumento de MDM4 foram associados a resistência a cisplatina (WANG, ZHU, 2018).

2.6 miRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são curtas sequências de nucleotídeos (18-25) não codificantes com a capacidade de regular a expressão gênica por um mecanismo pós-transcricional, por inibição da tradução ou degradação do mRNA. Tal regulação acontece pelo pareamento de bases de sequências complementares entre a região *seed* do miRNA, nucleotídeos 2-7, e a região 3' UTR (*untranslated region*) do mRNA alvo (MULRANE *et al.*, 2013; CIPOLLINI, LANDI, GEMIGNANI, 2014; MATAMALA *et al.*, 2015; McGUIRE, BROWN, KERIN, 2015).

Os miRNAs e seus sítios alvo são altamente conservados, e aproximadamente 60% dos genes codificantes de proteínas contém sítios de ligação de miRNA em sua região 3'UTR (DAVIS, 2009; ESTELLER, 2011; LUO, CUI, CROCE, 2018; SALZMAN, WEIDHAAS, 2013). A regulação gênica mediada por miRNAs é um processo complexo em que um miRNA é capaz de se ligar a vários mRNAs, da mesma forma que um único mRNA contém sítios de ligação para vários miRNAs distintos (DAVIS, 2009; CROCE, 2009;

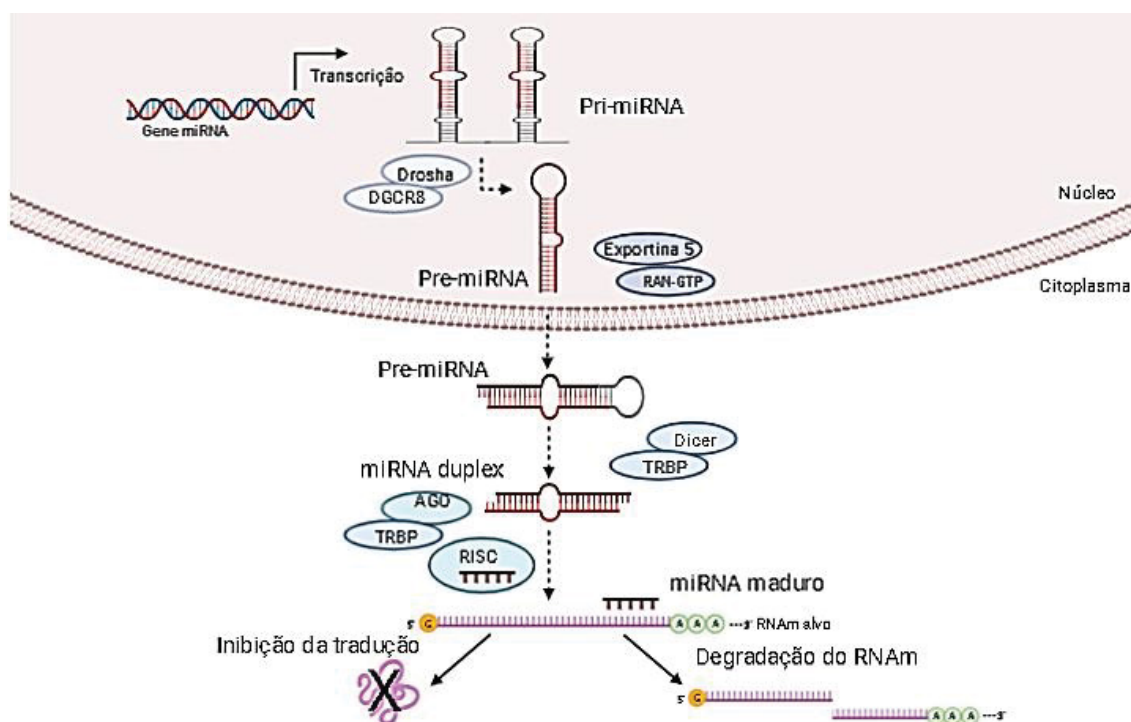
HAMZEIY, ALLMER, YOUSEF, 2013; TARANG, WESTON, 2014; PALANICHAMY, RAO, 2014; LUO, CUI, CROCE, 2018).

Os genes de miRNAs podem estar localizados em íntrons ou éxons de genes que codificam proteínas, além de regiões intergênicas (DAVIS, 2009; ALLEGRA *et al.*, 2012; LUO, CUI, CROCE, 2018). A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA-polimerase II e apresentam *cap* 7-metilguaninosina na extremidade 5' e cauda poli-A na extremidade 3' (DAVIS, 2009; ALLEGRA *et al.* 2012).

Os miRNAs são formados a partir de moléculas precursoras, denominadas pri-miRNA que são clivadas no núcleo pela ação de uma enzima endonuclease RNase III, a *Drosha/DGCR8*. Essa clivagem dá origem a um segundo precursor com estrutura de *stem loop*, denominado pre-miRNA, de aproximadamente 60-100 nucleotídeos. O pre-miRNA é transportado do núcleo ao citoplasma pela proteína exportina-5/Ran-GTP. Nesse transporte, a molécula de GTP é hidrolisada e o pre-miRNA é liberado pela exportina. Essa interação entre exportina e RNA não depende da sequência de nucleotídeos, mas requer uma região de dupla fita de pelo menos 16pb, além de nucleotídeos *overhang* na extremidade 3' (DAVIS, 2009). No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela Dicer/TRBP (*TAR RNA binding protein*), outra endonuclease RNase III e origina um duplex de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos, o miRNA maduro. No citoplasma, a TRBP (*TAR RNA binding protein*) uma proteína de ligação ao RNA dupla fita reconhece o RNA e auxilia a incorporação ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) contendo a proteína Argonata, componente central do complexo RISC. Após o duplex de miRNA se ligar ao complexo RISC, a dupla fita é separada e uma das fitas geralmente é degradada enquanto a outra fita permanece ligada ao complexo RISC. A seleção da fita a ser incorporada ao complexo RISC ocorre com base na estabilidade termodinâmica das extremidades do RNA duplex. A fita com menor estabilidade termodinâmica da extremidade 5' é incorporada. O miRNA maduro fita simples ligado ao complexo RISC é então capaz de se ligar ao mRNA alvo e controlar a expressão gênica (DAVIS, 2009; BARTEL, 2004; CROCE, 2009; MULRANE *et al.*, 2013; HA, KIM, 2014; MATAMALA *et al.*, 2015; MCGUIRE, BROWN, KERIN, 2015). O pareamento entre o miRNA e seu alvo pode levar a repressão da tradução ou degradação do mRNA. Em animais, o bloqueio da tradução é o processo mais

comum. Porém, também pode ocorrer degradação do mRNA que se inicia pela desestabilização da molécula. A ligação ao complexo RISC envolve proteínas, como GW182, que recrutam fatores que promovem a deadenilação e assim, facilitam a degradação do mRNA (PASQUINELLI, 2012; DALMAY, 2013; IWAKAWA, TOMARI, 2015) (FIGURA 7). Os miRNAs podem ser derivados do braço 5' ou 3' do duplex precursor, e, portanto, são chamados de miRNA-5p ou miRNA-3p, respectivamente (CHOO, *et al.*, 2014).

FIGURA 7- BIOGÊNESE E FUNÇÃO DO miRNA EM CÉLULAS ANIMAIS



Representação da biogênese de miRNA e seu mecanismo pós-transcricional de regulação da expressão gênica. O pri-miRNA transcrito é clivado pela Drosha em pre-miRNA que é exportado ao citoplasma. No citoplasma a enzima Dicer cliva o pre-miRNA, originando um miRNA duplex que se associa a proteína Argonauta formando o complexo RISC. Uma das fitas é degradada e a outra permanece no complexo RISC. O miRNA maduro é capaz de ligar-se ao mRNA complementar alvo. Por meio dessa ligação o miRNA regula a expressão gênica seja pela inibição da tradução ou degradação do mRNA. FONTE: O autor (2020).

A interação entre miRNA e o mRNA alvo ocorre através do pareamento de bases entre a região *seed* do miRNA e a sequência complementar 3' do mRNA. Porém, esse tipo de ligação não é a única interação existente. Os sítios canônicos, de um modo geral, envolvem o pareamento completo da região *seed*, e podem ser: *7mer-A1*, consiste no pareamento da região *seed* e na presença de uma A (adenina) no mRNA alvo, oposta ao nucleotídeo 1 da região *seed*; *7mer-m8-site*, pareamento da região *seed* (nucleotídeos 2-7) mais o pareamento

do nucleotídeo 8 da região *seed*; *8mer*, que além do pareamento da região *seed* e do pareamento do nucleotídeo 8 da região *seed*, possui uma A no mRNA oposta ao nucleotídeo 1 da região *seed*; *6mer*, consiste no pareamento da região *seed* (nucleotídeos 2-7). Os sítios atípicos, incluem pareamento fora da região *seed*, e podem ser 3'-suplementar ou 3'-compensatório. No primeiro caso, além do pareamento entre a região *seed* (nucleotídeos 2-7), ocorre pareamento de 3-4 nucleotídeos, entre os nucleotídeos 13-16 do miRNA. No caso do pareamento compensatório, o pareamento de 4-5 nucleotídeos, entre os nucleotídeos 13-16 do miRNA, compensam um *mismatch* na região *seed* (BARTEL, 2009; MOSZYNSKA *et al*, 2017; SALZMAN, WEIDHAAS, 2013).

A complementariedade entre o nucleotídeo 8 do miRNA e o mRNA alvo, e a presença de uma adenina no mRNA alvo oposta ao nucleotídeo 1 da região *seed* aumentam o reconhecimento do alvo (SALZMAN, WEIDHAAS, 2013). Além da especificidade da sequência, alguns fatores influenciam a ligação ao alvo. Sítios flanqueados por sequências ricas em AU parecem aumentar a acessibilidade do miRNA. Além disso, tendem a evitar sequências imediatamente após o códon de parada (aproximadamente 15 nucleotídeos) que são encobertas pelo ribossomo, antes deste se dissociar do mRNA (PASQUINELLI, 2012).

O controle pós-transcricional feito pelos miRNAs atua nas vias regulatórias associadas ao câncer, incluindo proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose (CROCE, 2009; CIPOLLINI, LANDI, GEMIGNANI, 2014; MATAMALA *et al.*, 2015). Desse modo, miRNAs têm sido muito estudados por apresentarem potencial como biomarcadores de suscetibilidade a doenças, de diagnóstico, prognóstico e direcionamento de terapia adequada em diferentes doenças, como o câncer de mama (CROCE, 2009; MULRANE *et al.*, 2013; SALZMAN, WEIDHAAS, 2013; CIPOLLINI, LANDI, GEMIGNANI, 2014).

Os miRNAs envolvidos no desenvolvimento tumoral podem atuar como oncomiRs ou miRNAs supressores de tumor. Os membros da família *let-7*, por exemplo, regulam negativamente a expressão do oncogene *RAS*. A perda da expressão de miRNAs dessa família, resulta no aumento da expressão de *RAS*, que está envolvido na patogênese de vários tipos de câncer. Desse modo, tais miRNAs atuam como supressores tumorais (CROCE, 2009; NINA-SINKAM, CROCE, 2013). miRNAs que exibem papel oncogênico têm como alvo

importantes supressores tumorais. miR-21, tem como alvos os mRNAs de: *PTEN*, *PDCD4*, *TIMP1* e *TIMP3*; miR-221 e -222 tem como alvo *PTEN*, *p27*, *p57* e *TIMP3*. O cluster miR-17-92 tem como alvos *PTEN*, *BIM*, *p21* e o fator de transcrição E2F1 (CROCE, 2009; SEVEN, 2014; O'BRYAN *et al.*, 2017). O *cluster* miR-17-92 compreende seis genes de miRNA: miR-17, -18a, -19a, -20a, -19b-1 e -92a-1 localizados no cromossomo 13q31.3. Essa região está amplificada no linfoma de células B difusas. Os miRNAs desse *cluster* promovem proliferação celular, inibem apoptose, induzem angiogênese e auxiliam *MYC* ao acelerar o desenvolvimento de linfomas. Ou seja, atuam como oncogenes. A superexpressão desse cluster é observada em diferentes tipos de tumores e associada com pior prognóstico, incluindo pulmão, mama, cólon, pâncreas, próstata e estômago, além de linfoma (CROCE, 2009; FANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Além de afetar os processos celulares relacionados a tumorigênese, a desregulação de miRNAs também pode interferir no sucesso das terapias (CROCE, 2009; NINA-SINKAM, CROCE, 2013; MULRANE *et al.*, 2013). A superexpressão de miR-221 e -222, e a diminuição da expressão do miR-301 foram relacionadas a resistência ao tamoxifeno no tratamento de câncer de mama (SERPICO, MOLINO, COSIMO, 2014). Além de estarem presentes no espaço intracelular, miRNAs podem ser encontrados em vários fluidos corporais, de maneira estável e com diferentes padrões de expressão nos diferentes fluidos, podendo circular envolvidos em moléculas lipídicas, como exossomos e microvesículas, ou ligadas a proteínas (ALLEGRA *et al.*, 2012; LARREA *et al.*, 2016; SCHWARZENBACH, 2017). Desse modo, essa representa uma alternativa na busca de biomarcadores através de uma abordagem não invasiva (biópsia líquida) e que vem sendo cada vez mais explorada (ALLEGRA *et al.*, 2012; OZAWA *et al.*, 2020).

A ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) na sequência de qualquer um dos precursores ou do próprio miRNA maduro, pode alterar a estrutura secundária, o processamento ou mesmo o reconhecimento de alvos dessa molécula (DAVIS, 2009; SALZMAN, WEIDHAAS, 2013). Assim, a ocorrência de SNPs é capaz de alterar a função dos miRNAs e desta forma, estar associado ao desenvolvimento de doenças (RYAN, ROBLES, HARRIS, 2010; MULRANE *et al.*, 2013;

SALZMAN, WEIDHAAS, 2013). Na meta-análise de Khan *et al.* (2014) cinco SNPs no sítio de ligação de miRNA foram associados ao risco de câncer de mama: rs1045494, rs1052532, rs10719, rs4687554 e rs3134615 localizados na região 3'UTR dos genes *CASP8*, *HDCC3*, *DROSHA*, *MUSTN1* e *MYCL1*, respectivamente. Chen *et al.* (2018) avaliaram CpG-SNPs na região promotora de genes de miRNA e investigaram a associação com o risco de câncer de mama em uma população chinesa Han. Eles observaram que os SNPs rs1190983, rs155247, rs62382272, na região promotora dos miRNAs miR-342, miR-3677 e miR-378, respectivamente, estavam associados a suscetibilidade ao câncer de mama.

2.7 SNPs NO SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA miRNA

SNPs localizados na região 3'UTR de mRNA - sítio de ligação aos miRNAs – são denominados miRSNPs, e podem alterar a afinidade de ligação entre miRNAs e mRNA alvo. A ocorrência de um miRSNP pode interromper ou enfraquecer a ligação de um miRNA ao sítio alvo, ou ainda criar uma sequência complementar à região *seed* de um miRNA que de outro modo não se ligaria a esse mRNA. Consequentemente, esse processo resulta em aumento ou diminuição da tradução da proteína (CHEN *et al.*, 2008). Diversos estudos têm investigado o papel de miRSNPs como possível fator de risco no câncer de mama (CROCE, 2009; MULRANE *et al.*, 2013; SALZMAN, WEIDHAAS, 2013; CIPOLLINI, LANDI, GEMIGNANI, 2014).

Cao *et al.* (2016) observaram a associação dos genótipos G/T (OR= 1.332; CI: 1.007–1.761) e G/T+T/T (OR= 1.336; 95% CI: 1.018–1.753) do SNP rs8176318 na região 3'UTR de BRCA1 e o genótipo A/C (OR=1.524; 95% CI: 1.141–2.035) do miRSNP rs15869 de BRCA2 e o maior risco de câncer de mama entre a população chinesa. A expressão de BRCA2 diminuiu com a transfecção do miR-627 nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (CAO *et al.*, 2016). Outro estudo de miRSNP em uma população chinesa associou o alelo C (OR=0.84; 95% CI: 0.75–0.95) do SNP rs7963551 de *RAD52* com a redução do risco ao câncer de mama, devido a perda da capacidade de ligação do miRNA let-7 a região 3'UTR desse gene. *RAD52* participa do reparo

por recombinação homóloga em cooperação com *BRCA1* e *BRCA2* (JIANG *et al.*, 2013).

2.8 SNP rs4245739

O SNP rs4245739 A>C situado em 3'UTR do gene *MDM4* tem sido identificado como um fator de risco para vários tipos de câncer, entre eles câncer de mama (GANSMO *et al.*, 2015; GANSMO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2013). Segundo dados do projeto 1000 genomas, a frequência desses alelos na população americana miscigenada é de 78,6% para o alelo A e 21,4% para o alelo C.

Gansmo *et al.* (2015) não observaram associação entre o SNP rs4245739*C de *MDM4* e o risco associado ao câncer de cólon, próstata ou pulmão, enquanto uma associação significativa com diminuição do risco ao câncer de mama foi observada no modelo genético recessivo (OR = 0.77; 95% CI: 0.59–0.99). Em 2016, Gansmo *et al.* observaram que indivíduos com os genótipos *MDM4* rs4245739 A/C ou C/C (OR= 1.18; 95 % CI:1.01–1.39) têm elevado risco ao câncer de ovário quando comparados ao genótipo AA. Em uma meta análise incluindo 69.477 indivíduos Xu *et al.* (2016) demonstraram que o alelo C de rs4245739 de *MDM4* (OR = 0.84; 95% CI: 0.76–0.94). está associado a diminuição da expressão do mRNA de *MDM4*, e conseqüentemente associado com a diminuição de risco ao câncer. Em dois estudos caso-controle independentes em duas regiões da China, Liu *et al.* (2013), demonstraram que os genótipos A/C e C/C de rs4245739 (OR = 0.55; 95 % CI 0.40–0.76) de *MDM4* estavam associados com a diminuição do risco ao câncer de mama comparados ao genótipo A/A em ambos os estudos. Duas recentes meta-análises indicaram que a variante C do SNP rs4245739 do gene *MDM4* está associada a uma diminuição do risco de câncer em geral (OR=0,715; 95% CI:0,622-0,821 e OR=0,86; 95% CI:0,78-0,96) (JIN *et al.*, 2017; LIAN *et al.*, 2019).

2.9 SNP rs4245739 de *MDM4* e os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p

O SNP rs4245739 em 3'UTR de *MDM4* está localizado no sítio de ligação para dois miRNAs, miR-191-5p e miR-887-3p. O miR-887-3p é capaz de se ligar

ao SNP rs4245739*C, mas não ao rs4245739*A (STEGEMAN *et al.*, 2015; ZHAI *et al.*, 2016). A sequência do miR-887-3 tem 79 pb e está localizada na fita forward do gene *FBXL7* (*F-box and leucine rich repeat protein 7*) no cromossomo 5 (miRIAD, 2018). A sequência do miR-191-5p está localizada na fita reversa do gene *NDUFAF3* (*NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3*) no cromossomo 3.

Gao *et al.* (2015) observaram a associação entre o SNP rs4245739 e câncer de células pequenas do pulmão em dois estudos caso-controle independentes em duas regiões da China. O possível impacto do miRSNP na regulação de *MDM4* foi investigada por meio do ensaio de luciferase, onde demonstrou que rs4245739 A/C e C/C foram significativamente associados com a diminuição da suscetibilidade ao câncer em comparação ao genótipo A/A (OR = 0.53; 95% CI: 0.32–0.89 e OR = 0.47; 95% CI: 0.26–0.879). Após a co-transfecção do vetor contendo as variantes alélicas A e C do rs4245739 e dos miRNAs, observaram que miR-191-5p e miR-887-3p foram capazes de diminuir a expressão de *MDM4* no ensaio com o constructo contendo o alelo C.

A superexpressão de *MDM4* parece estar relacionada a tumorigênese por meio da diminuição da função de p53 como supressor de tumor. A identificação do SNP rs4245739 em 3'UTR de *MDM4* em carcinomas de ovário e linhagens celulares de câncer de ovário, cria um sítio alvo para a ligação do hsa-miR-191 que se encontra altamente expresso tanto em tecido normal quanto tumoral. Este estudo demonstrou uma regulação de *MDM4* pelo miR-191 na presença do alelo C, mas não do alelo A. Assim, o alelo A foi associado com aumento da expressão do mRNA de *MDM4* e níveis da proteína em carcinomas ovarianos. O genótipo AA foi relatado como mais frequente em pacientes com carcinomas de alto grau do que naqueles com carcinomas de baixo grau (WYNENDAELE *et al.*, 2010).

Muitos estudos têm reportado que o miRSNP rs4245739 cria um sítio alvo de ligação para o miR-191 resultando em diminuição da expressão de *MDM4*. Zhou *et al.* (2013) conduziram um estudo caso-controle de carcinoma de células escamosas do esôfago em duas regiões da China e demonstraram que os genótipos A/C e C/C (OR = 0.54; 95% CI: 0.35–0.82 e OR = 0.68; 95% CI: 0.45–0.99) estavam associados com a diminuição do risco ao carcinoma em comparação ao genótipo A/A e contribuíram para a hipótese de que variantes genéticas podem interferir na regulação gênica mediada por miRNA e assim

modificar o risco ao câncer.

Stegeman *et al.* (2015) observaram a ligação dos miRNAs 887-3p e 191-5p com o mRNA do gene *MDM4* em linhagem celular de câncer de próstata. A capacidade de ligação do miRNA ao alelo A ou C ao 3'UTR do gene *MDM4* regula a expressão deste gene e sua subsequente função na via do p53.

3 JUSTIFICATIVA

Doenças complexas como o câncer são desencadeadas por vários fatores distintos, alterando o metabolismo celular de modo particular em cada indivíduo. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer de maior incidência no mundo, o de maior mortalidade entre as mulheres e com curso clínico bastante variável. A heterogeneidade observada nesta patologia torna essencial a investigação de novos marcadores de diagnóstico e prognóstico. Estudos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em escala genômica associam dezenas de *loci* de risco ao câncer de mama, tornando-se fundamental o estudo destas variações e de seus possíveis significados funcionais. A maioria destes SNPs, estão situados na região 3'UTR dos genes, podendo localizar-se em sítios de interação à miRNAs. A ocorrência de SNPs nestes sítios, pode criar ou desfazer o sítio de reconhecimento para um determinado miRNA e assim alterar o padrão de regulação deste gene e a suscetibilidade a doenças (CIPOLLINI; LANDI; GEMIGNANI, 2014; ANWAR; WULANINGSIH; WATKINS, 2017; MULRANE, *et al.*, 2013; BARTEL, 2009).

O gene *TP53*, importante supressor tumoral na resposta aos danos ao DNA, tem papel essencial no processo da patogênese do câncer, sendo que o controle dos níveis da proteína p53 e das moléculas que o regulam podem afetar a função desse supressor de tumor e conseqüentemente predispor ao câncer (THUT, GOODRICH, TIJAN, 1997 PIETSCH, HUMBEY, MURPHY, 2006; WYNENDAELE *et al.*, 2010; SUDA *et al.*, 2011).

As proteínas MDM2 e MDM4 ligam-se a p53 e inibem sua função como fator de transcrição, além de atuarem na via de poliubiquitinação marcando a proteína para degradação. Portanto, a alteração dos níveis dessas proteínas interfere na função de p53 e, uma das formas de controle da expressão de MDM2 e MDM4 é pela regulação pós-transcricional de seus mRNAs mediada por miRNAs (MENDOZA, MANDANI, MOMAND, 2014). Já foi previamente estabelecido em outros tipos de câncer que os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p apresentam capacidade de regulação pós-transcricional do mRNA de *MDM4* de maneira dependente do SNP (rs4245739) A>C localizado na região 3'UTR.

Assim, esta proposta pretende explorar o impacto funcional da variação genética em sítios-alvo destes microRNAs para a patogênese do câncer de

mama, através da validação da predição *in silico* que identificou miRNAs potencialmente envolvidos no câncer de mama de maneira dependente de SNP e que apresentam efeito eQTL.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se as associações genéticas já encontradas entre a variante rs4345739 do gene MDM4 e o câncer de mama podem ser explicadas pela ligação diferencial de miRNAs preditos – miR-887-3p e miR-191-5p – e modular a expressão do gene MDM4, contribuindo com o esclarecimento do impacto funcional dessa variante genética.

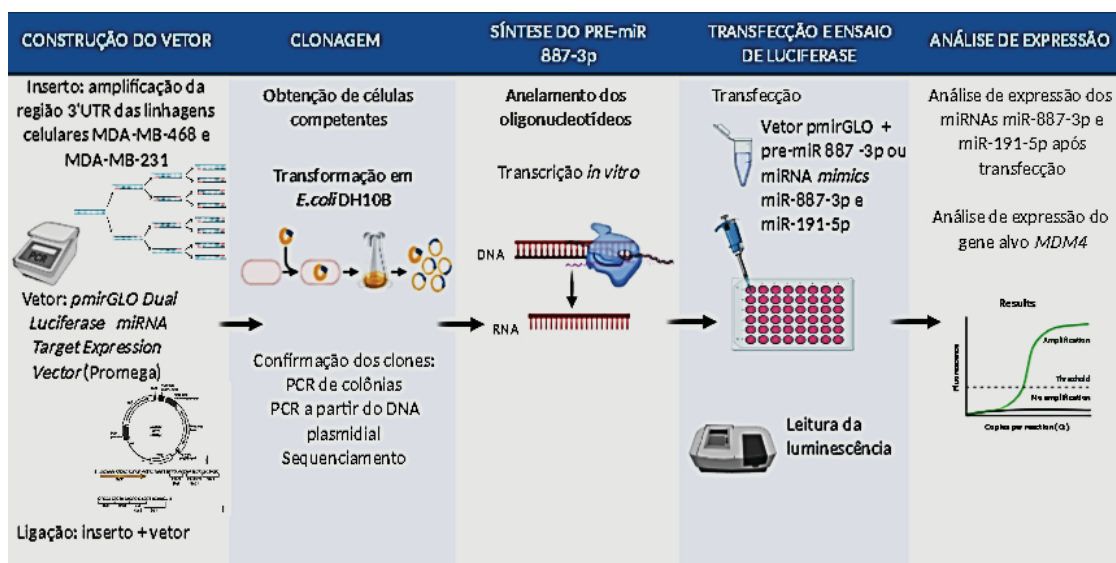
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a transcrição *in vitro* como metodologia alternativa para a obtenção do pre-miRNA a ser utilizado nos ensaios de transfecção;
- Avaliar a capacidade de ligação do pre-miRNA 887-3p, sintetizado por transcrição *in vitro*, ao sítio de ligação com o alelo C presente no vetor através de ensaio luciferase;
- Padronizar o ensaio luciferase como metodologia a ser utilizada em outros trabalhos no nosso grupo de pesquisa;
- Validar através de ensaio luciferase a ligação alelo-específica dos miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p ao vetor contendo o alelo C do SNP rs4245739 da região 3'UTR de *MDM4*, conforme predito pela análise *in silico*;
- Padronizar a transcrição reversa com o uso de primers RT-*stem loop* e qPCR com SYBR *green* para a expressão de miRNAs, para que essa metodologia possa ser empregada nos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa;
- Avaliar se a transfecção dos miRNAs *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 reduzem a expressão do mRNA do gene alvo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas necessárias para a avaliação da ligação dos miRNAs preditos a variante C do SNP rs4245739 e propostas neste trabalho estão resumidas na figura abaixo (FIGURA 8).

FIGURA 8– PLANO DE TRABALHO



Plano de trabalho que inclui as etapas de construção do vetor, clonagem, síntese do pre-miR 887-3p, transfecção, ensaio de luciferase e análise de expressão. FONTE: O autor (2020).

5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR

Com o objetivo de realizar os ensaios de luciferase para observar a interação entre os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p ao sítio alvo na 3'UTR do mRNA foi necessário construir os vetores de gene repórter contendo cada um dos alelos – A ou C – do SNP rs4245739 avaliado nesse estudo.

5.1.1 Preparo do inserto 3'UTR do gene *MDM4*

A sequência 3' UTR do gene *MDM4* contendo o SNP rs4245739, apontada como alvo do miR-887-3p e miR-191-5p foi amplificada por PCR (*Polimerase Chain Reaction*). No desenho do *primer forward* foi incluído o sítio de restrição para a enzima *NheI*; e do *primer reverse*, o sítio da enzima *Sall*. Essas enzimas foram escolhidas por estarem presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor a ser usado e por sua ausência dentro da região a ser clonada

(QUADRO 2). Segundo o *Primer Blast*, a adição desses sítios não prejudica a amplificação específica do gene *MDM4*. Os *primers* amplificam uma região de 393 pb da região 3'UTR de *MDM4* (QUADRO 2).

QUADRO 2 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS FORWARD* E *REVERSE* PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'UTR DO GENE *MDM4* CONTENDO O SNP rs4245739

<i>Primer forward</i> (5' - 3')	<i>Primer reverse</i> (5' - 3')
AGAC GCTAGC AGGCTGGGGCTTCATG	TGTAG TCTGACT GTCTGCATAAAGTAATCCA

Os nucleotídeos destacados em negrito correspondem ao sítio de restrição para as enzimas *NheI* (*primer forward*) e *Sall* (*primer reverse*). FONTE: O autor (2020).

O inserto contendo o alelo A foi amplificado a partir da linhagem MDA-MB-468, e o alelo C foi amplificado a partir da linhagem MDA-MB-231. Essas linhagens foram previamente sequenciadas, sendo a linhagem MDA-MB-468 homozigota para o alelo A, e a linhagem MDA-MB-231 homozigota para o alelo C. Ambos os alelos foram amplificados pelos mesmos iniciadores. Na PCR do inserto *MDM4_739A* foi utilizado *GoTaq Green Master Mix 2X* (Promega) para uma reação de 100 μ L, a partir de 100 ng de DNA (QUADRO 3). Na PCR do inserto *MDM4_739C* foi utilizada *Taq Polimerase High Fidelity* para uma reação de 50 μ L, a partir de 40 ng de DNA (QUADRO 4).

A verificação da amplificação do produto de PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, 80V, 60 min. Após a confirmação da amplificação foi realizada uma segunda reação de PCR nas mesmas condições, utilizando de 0,5 μ L a 1 μ L do produto da primeira PCR, com o objetivo de se obter maiores concentrações do inserto (QUADROS 3 e 4).

QUADRO 3 – REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO *MDM4_739A* A PARTIR DO DNA DA LINHAGEM MDA-MB-468

	1ª PCR do inserto MDM4_739A	2ª PCR do inserto MDM4_739A
Água	41 µL	45,5 µL
Primer <i>forward</i>	2 µL (10 mM)	2 µL (10 mM)
Primer <i>reverse</i>	2 µL (10 mM)	2 µL (10 mM)
DNA	5 µL (100 ng)	0,5 µL
GoTaq	50 µL	50 µL
Volume final	100 µL	100 µL

QUADRO 4 – REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO MDM4_739C A PARTIR DO DNA DA LINHAGEM MDA-MB-231

	1ª PCR do inserto MDM4_739C	2ª PCR do inserto MDM4_739C
Água	30,8 µL	64,75 µL
Tampão	5 µL	10 µL
MgCl ₂	2 µL	4 µL
dNTPs	5 µL	10 µL
<i>Primer forward</i>	2,5 µL	5 µL
<i>Primer reverse</i>	2,5 µL	5 µL
Taq Polimerase High Fidelity	0,2 µL	0,25 µL (1,25 U)
DNA	2 µL (40 ng)	1 µL
Volume final	50 µL	100 µL

QUADRO 5 – CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS 3'UTR DE *MDM4*

Etapa do ciclo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	30
Anelamento	68°C	45 segundos	
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1
<i>Hold</i>	15°C	15 minutos	1

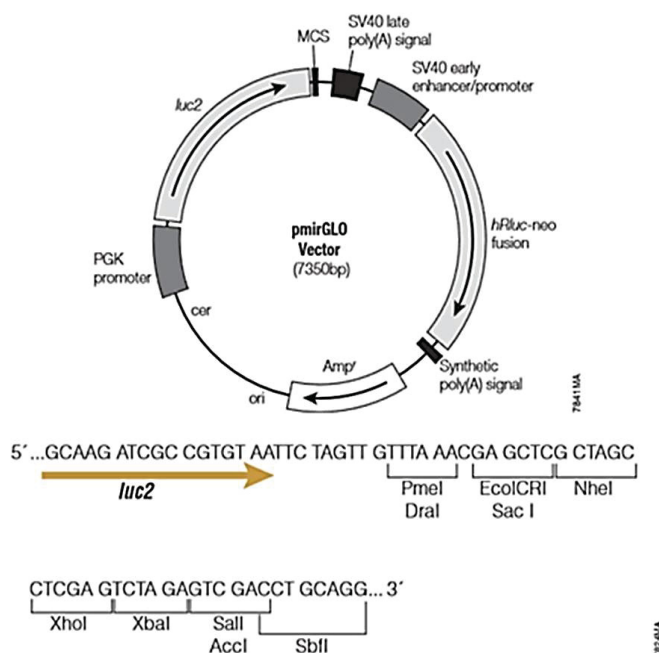
A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, 80V, 60 min.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico; acetato de amônio e etanol, e seguidas centrifugações antes de realizar a digestão enzimática. Esse protocolo consiste na adição de 40 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) ao produto de PCR e centrifugação a 16000xg por 2 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e adicionado 10% de volume de acetato de amônio 7.5 M e 2 volumes de etanol absoluto. O produto foi mantido em freezer -80°C overnight. Após isso, o material foi centrifugado a 16000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 70%. Centrifugação a 16000xg por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e esperou-se todo o etanol evaporar e o *pellet* secar a temperatura ambiente. O material foi eluído em 10 µL de água e mantido no gelo. Foram obtidos 290,9 ng/µL do inserto A e 661,2 ng/µL do inserto C.

5.1.2 Preparo do Vetor

Para avaliar a ligação do miRNA ao seu sítio alvo foi utilizado o vetor *pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega) (FIGURA 9) onde foram inseridas as sequências contendo as variantes alélicas (A e C) do SNP rs4245739 do gene MDM4. Nesse sistema, a *firefly* luciferase é o gene repórter primário que reflete a regulação do mRNA enquanto a *Renilla* luciferase atua como controle para normalização. Esse vetor permite avaliar a interação do miRNA por meio da inserção de sítios alvos para o miRNA na porção 3' do gene *firefly* luciferase. A região 3'UTR do gene de interesse, ou parte dela, é introduzida para estudar a influência desses sítios na estabilidade e atividade do transcrito. Expressão reduzida do gene repórter *firefly* luciferase indica ligação do miRNA ao sítio alvo introduzido no vetor.

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO VETOR pmirGLO



O vetor *pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega) possui 7350 pb. O vetor apresenta o gene *luc2* da *firefly* luciferase sob o promotor PGK, seguido do sítio de clonagem múltipla (MCS) e sinal poli-A. O MCS contém os sítios de reconhecimento para enzimas de restrição. Possui ainda o gene *hRluc-neo fusion* da *Renilla* luciferase sob o promotor SV40, seguido de sinal poli-A. O gene de β -lactamase (Amp) possibilita a seleção dos clones recombinantes ao conferir resistência a ampicilina. FONTE: Promega.

O vetor pmirGLO foi replicado através de transformação por choque térmico em bactérias *E. coli* DH10B competentes (com CaCl₂). Após a transformação, os clones foram selecionados em meio LA (Luria Bertani Agar) contendo ampicilina (100 μ g/mL). As colônias foram selecionadas da placa e inoculadas em 5 mL de meio LB (Luria Bertani) contendo ampicilina (100 μ g/mL). O DNA plasmidial foi obtido por mini preparação de plasmídeo com o kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

5.1.3 Digestão enzimática

Os produtos de PCR relativo aos alelos A e C do SNP rs4245739 do gene *MDM4*, assim como o vetor pmirGLO foram digeridos com duas enzimas de restrição, *NheI* e *Sall* (Thermo Scientific), com um protocolo de digestão sequencial, conforme sugerido pela ferramenta online *DoubleDigest Calculator-Thermo Scientific*, com modificação do tempo de reação, sendo 16-20 horas a 37°C de incubação para cada enzima e ambas com o tampão Tango 10X.

Conforme o protocolo, primeiramente foi realizada a incubação com a enzima *NheI* a 37°C *overnight* em tampão Tango 10x. Em seguida, foi adicionado o tampão Tango 10x, para ajuste de volume, conforme sugerido pela ferramenta *DoubleDigest Calculator* (onde o volume de tampão Tango a ser adicionado, corresponde ao volume final da reação/8). Então, adicionou-se a enzima *Sall* para a segunda digestão a 37°C *overnight* (QUADRO 6). Ao final da segunda digestão, foi realizada a inativação enzimática a 65°C por 20 min. A reação de digestão foi feita em volume final de 40 µL utilizando todo o material disponível obtido por PCR e purificação para cada alelo, sendo 2,6 µg totais para o alelo A e 5,2 µg totais para o alelo C; e 2 µg do vetor pmirGLO.

QUADRO 6 – REAÇÃO DE DIGESTÃO DOS INSERTOS MDM4_739A E MDM4_739C E DO VETOR pmirGLO

	Inserto MDM4_739A	Inserto MDM4_739C	Vetor pmirGLO
Água	26 µL	27 µL	29,3 µL
Tampão Tango 10X	4 µL	4 µL	4 µL
DNA	9 µL (2,6 µg)	8 µL (5,2 µg)	5,7 µL (2 µg)
Enzima <i>NheI</i>	1 µL (10 U)	1 µL (10 U)	1 µL (10 U)
Volume final – 1ª reação	40 µL	40 µL	40 µL
Tampão Tango 10X	5 µL	5 µL	5 µL
Enzima <i>Sall</i>	2 µL	2 µL	2 µL

5.1.4 Ligação

Após a rea o de digestão, os insertos com cada um dos alelos (A e C) e o vetor pmirGLO foram purificados com acetato de sódio 3M e etanol. Adicionou-se 10% de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto ao produto de digestão, e armazenado em freezer -80°C *overnight*. Em seguida, centrifuga o por 20 min a 16000xg. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de etanol 70%. Após isso, fez-se mais uma centrifuga o por 1min a 16000xg. O sobrenadante foi descartado e esperou-se todo o etanol evaporar e o pellet secar a temperatura ambiente. O material foi eluído em 10 µL de água e mantido no gelo. Ao final da purifica o, obteve-se 135,7 ng/µL do inserto A, 34,6 ng/µL do inserto C. A liga o entre os fragmentos de vetor pmirGLO e cada um dos insertos A ou C digeridos foi realizada com o uso da enzima T4 DNA ligase

(Thermo Scientific) por 16 horas a 16 °C. Testou-se inicialmente a razão 3:1 entre inserto e vetor, conforme o que é recomendado em protocolos de ligação, porém a reação de ligação não funcionou. A reação de ligação sugerida pelo fabricante foi adaptada e otimizada, para uma reação com volume final de 10 µL, sem adição de água, utilizando 0,5 µL (2,5 Weiss U) da enzima T4 DNA ligase e todo o produto de digestão dos insertos disponível após purificação. Para a ligação do inserto A com o vetor pmirGLO, utilizou-se 1 µg do inserto e 143,5 ng do vetor. Para a ligação do inserto C ao vetor, utilizou-se 898,36 ng do inserto e 51,5 ng do vetor pmirGLO. Além disso, como controle, fez-se uma reação contendo vetor e ligase, mas sem inserto (QUADRO 7).

QUADRO 7 – REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS INSERTOS MDM4_739A e MDM4_739C AO VETOR pmirGLO

	Inserto MDM4_739A	Inserto MDM4_739C
Vetor	1 µL (143,5ng)	1,1 µL (51,5 ng)
Inserto	7,5 µL (1µg)	7,4 µL (898,36 ng)
Tampão 10X	1 µL	1 µL
Enzima T4 DNA ligase	0,5 µL (2,5 Weiss U)	0,5 µL (2,5 Weiss U)
Volume final	10 µL	10 µL

5.2 CLONAGEM

5.2.1 Obtenção de células *E.coli* DH10B competentes

Adicionou-se 10 µL de células *E. coli* DH10B do estoque de glicerol em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (20 µg/mL). O frasco foi mantido em agitador por 37°C por 16 horas. Em seguida, adicionou-se 600 µL do cultivo em 80 mL de meio LB e as células foram mantidas em incubadora a 37°C por 3 horas. Após isso, as células foram colocadas em gelo por 15 minutos, seguida por centrifugação a 4°C, 1700xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 15 mL de MgCl₂ e nova centrifugação a 4°C, 1700xg por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuscitado em 25 mL de CaCl₂ e deixado em gelo por 20 min. Em seguida, nova centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 800 µL de CaCl₂+glicerol 20% e alíquotas de 100 µL foram armazenadas em freezer -80°C. Antes de realizar a transformação com os

insertos, foi realizado um teste de eficiência com o vetor pmirGLO vazio para verificar a competência das células bacterianas DH10B.

5.2.2 Transformação das células *E. coli* DH10B com os vetores pmirGLO – MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C

Após obter as células *E. coli* DH10B competentes, foi realizada a transformação. Adicionou-se todo o produto de ligação (10 µL) de cada um dos vetores, pmirGLO – MDM_739A e pmirGLO-MDM4_739C, em 100 µL de células bacterianas competentes. As células bacterianas foram transformadas por choque térmico, iniciando por 20 min de incubação em gelo, seguido de 2 min em termobloco a 42°C e finalizando com 2 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se 300 µL de meio LB e incubação em agitação a 37°C por 1 hora para recuperação das células. Após isso, foram semeadas 100 µL e o *pellet* (após centrifugação a 1700xg por 5 min) bacteriano em placas de Petri com meio LA contendo ampicilina (100 µg/mL), visto que o vetor pmirGLO apresenta gene de resistência a esse antibiótico. As placas que exibiram crescimento de colônias isoladas foram testadas por meio de PCR de colônias para confirmar a clonagem. Uma vez que os clones foram confirmados por PCR, foi realizado inóculo em 5 mL de meio LB e ampicilina (100 µg/µL), para posterior mini preparação de plasmídeo com kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega), conforme instruções do fabricante. O produto de miniprep foi amplificado por PCR com o objetivo de mais uma vez verificar a clonagem.

Para a confirmação dos clones por meio de PCR foram utilizados os mesmos *primers* da amplificação da região 3'UTR contendo o SNP rs4245739 e os *primers* 5' mPGK-F (CATTCTGCACGCTTCAAAG) e 3' EBV-rev (GTGGTTTGTCCAAACTCATC) para o vetor.

5.2.3 Sequenciamento

O DNA plasmidial obtido por miniprep foi sequenciado pelo método de Sanger em equipamento sequenciador *3500xl Genetic Analyzer* (Life Technologies). Os produtos de miniprep de cada um dos clones foram diluídos (1:10) e realizado PCR utilizando os *primers* para o inserto *MDM4* SNP rs4245739. Os ciclos de amplificação foram uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto; seguida por 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10

segundos, hibridação a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C, por 4 minutos.

A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em corrida 80V por 1h. Após confirmar os produtos amplificados, foi realizada purificação utilizando 2 µL do mix de Exonuclease I (20 U/µl) (Fermentas) e Fast AP (1 U/µl) (Thermo Fisher), e 5 µL do produto de amplificação, com incubação a 37°C por 1h e inativação a 80°C por 15 min. A reação de sequenciamento foi realizada com *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Standart v3.1 (Life Technologies)* e *Big Dye® Terminator v.3.1 5X Sequencing Buffer*, utilizando 2 µL do produto purificado. O sequenciamento foi realizado com os *primersforward* e *reverse* do inserto para confirmar cada clone.

Após a reação de sequenciamento e antes da injeção das amostras, o DNA foi purificado. Adicionou-se 2,5 µL de EDTA 125 mM gelado e 30 µL de etanol absoluto a cada amostra. Em seguida, foi realizada incubação por 15 min a temperatura ambiente e centrifugação a 18°C, 300xg por 45 min. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida por 6 segundos até 30xg. Adicionou-se 30 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 25°C, 300xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a placa foi novamente centrifugada invertida por 6 segundos a 30xg. A placa foi mantida a temperatura ambiente por 20 min para a evaporação do etanol. A amostra foi armazenada a -20°C até ser sequenciada. Antes de serem injetadas no sequenciador as amostras foram ressuspensas em 10 µL de Hi-Di Formamida (*Life Technologies*). O resultado do sequenciamento foi analisado com o programa *Mutation Surveyor® DNA Variant Analysis Software v5.0.1 (Softgenetics)* para alinhamento das seqüências e identificação dos vetores com cada um dos SNPs no inserto 3'UTR. O sequenciamento foi realizado em replicata experimental.

O sequenciamento foi realizado com o DNA plasmidial obtido na minipreparação de plasmídeo a partir de cinco colônias transformadas com a variante A e duas colônias transformadas com o plasmídeo para a variante C. Os clones selecionados para a obtenção do plasmídeo a ser utilizado nas transfecções foram aqueles que apresentaram a variação de nucleotídeo apenas na posição do SNP rs4245739.

5.3 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

Para a síntese do pre-miRNA do miR-887 foram utilizados oligonucleotídeos complementares contendo a sequência do promotor da T7 polimerase e a sequência de DNA correspondente a do pre-miRNA (QUADRO 8).

QUADRO 8– OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ANELAMENTO E TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

5' TTGTAATACGACTCACTATAGG CTTGGGAGCCCTGTTAGACTCTGGAT TTTACACTTGG AGTGAACGGGCGCCATCCCGAGG 3'
5'CCTCGGGATGGCGCCCGTTCACTCCAAGTGTAAAATCCAGAGTCTAAC AGGGCTCCC AAGCCTATAGTGAGTCGTATTACAA 3'

As sequências destacadas em negrito correspondem à sequência do promotor da T7 RNA polimerase.

Primeiramente, foi realizado o anelamento dos oligonucleotídeos direto e reverso com o tampão da enzima T4 DNA ligase, em uma reação final de 10 µL e incubação a 95°C por 5 minutos (QUADRO 9). Após isso, a reação foi mantida por 3 horas a temperatura ambiente. O anelamento é confirmado por eletroforese em gel agarose 2%, 95 V, 1 hora.

QUADRO 9 – REAÇÃO DE ANELAMENTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Oligonucleotídeo direto (200 µM)	2 µL
Oligonucleotídeo reverso (200 µM)	2 µL
T4 DNA ligase buffer	1 µL
Água RNase-free	5 µL
Volume final	10 µL

A reação de transcrição *in vitro* foi realizada com o kit *Ribomax Large Scale RNA Production System T7* (Promega), segundo as instruções do fabricante. Foi utilizado todo o volume do anelamento dos oligos como DNA molde, contendo entre 5-10 µg, conforme o protocolo, numa reação final de 25 µL. A reação foi incubada em termociclador a 37°C por 4 horas (QUADRO 10).

QUADRO 10 – REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

Tampão	6 μ L
rNTPs	7,5 μ L
DNA (5-10 μ g)	9 μ L
Mix enzimas	2,5 μ L
Volume final	25 μ L

Após a reação de transcrição foi realizado o processo de purificação, conforme indicado pelo fabricante. Primeiramente, o oligo de RNA foi tratado com DNase-*RNase free* (1 U/ μ g de DNA) a 37°C por 15 minutos; e em seguida, com fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (125:24:1; pH 4,7), acetato de sódio (3M), isopropanol, e etanol (70%); e seguidas etapas de centrifugação. Ao final, o *pellet* formado foi eluído em 25 μ L de água livre de nuclease.

Devido a capacidade limitante da reação de transcrição *in vitro*, para cada uma das transfecções foi realizada uma nova reação a fim de se obter quantidade suficiente de pre-miR.

5.4 ENSAIO DE LUCIFERASE

5.4.1 Linhagem e cultivo celular

A validação funcional foi realizada na linhagem celular de tumor de mama triplo negativa do subtipo basal MDA-MB-231. Essa linhagem foi previamente caracterizada por sequenciamento tendo os genótipos rs4245739 CC do gene *MDM4*. A linhagem celular foi cultivada em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), 2,5% HEPES 1M e 1% penicilina-estreptomicina (5000U/mL - 5000 μ g/mL).

5.4.2 miRNA *mimic*

Os miRNAs mimetizadores endógenos - *mirVana*[®] *miRNA mimic* (*Thermo Fisher*) para miR-887-3p e miR-191-5p utilizados nos ensaios de transfecção possuem a mesma sequência do miRNA maduro (QUADRO 11). Além dos *mimics* para os miRNAs em estudo foi utilizado um controle negativo -*mirVana*[™]

miRNA Mimic, Negative Control #1 (Thermo Fisher) – de sequência desconhecida sem capacidade de ligar-se a qualquer alvo conhecido.

QUADRO 11 – SEQUÊNCIA DOS miRNAs MIMETIZADORES ENDÓGENOS 887-3p e 191-5-p

<i>mirVana</i> [®] miRNA <i>mimic</i> hsa-miR-887-3p	GUGAACGGGCGCCAUC ³ CGAGG
<i>mirVana</i> [®] miRNA <i>mimic</i> hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG

5.4.3 Transfecção

Para verificar a validade das predições *in silico* foi realizado o ensaio com gene repórter luciferase presente no vetor pmirGLO. Cada um dos vetores contendo os respectivos insertos pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C foram transfectados na linhagem celular triplo negativa MDA-MB-231 mantida em cultivo celular. O vetor pmirGLO vazio, ou seja, sem nenhum inserto, também foi usado nos ensaios de transfecção como controle para a expressão máxima de luciferase.

Além de cada um dos constructos foi realizada a transfecção do pre-miR 887 gerado por transcrição *in vitro* ou do *mirVana*[®] miRNA *mimic* (Thermo Fisher) para o miR-887-3p e miR-191-5p. A co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A ou pmirGLO-MDM4_739C e do pre-miR 887 ou dos *mimics* foi realizada com *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) em placa de cultivo de 48 poços.

No primeiro teste foram transfectados apenas os vetores pmirGLO-MDM4_739A ou pmirGLO-MDM4_739C com o objetivo de observar se haveria alguma regulação da atividade da *firefly* luciferase a partir de miRNAs endógenos.

Com o objetivo inicial de realizar o ensaio de luciferase com a transfecção do pre-miR sintetizado por transcrição *in vitro* diferentes concentrações do oligonucleotídeo obtido foram testadas: 1 pmol, 3,5 pmol, 5 pmol, 7 pmol, 14 pmol e 40 pmol. As concentrações foram definidas baseando-se em protocolos de transfecção de miRNA *mimics* disponíveis comercialmente, e de acordo com os resultados observados. Depois da análise dos resultados dos ensaios de luciferase com o pre-mir 887 iniciou-se a transfecção da linhagem MDA-MB-231 utilizando os miRNAs *mimics* para o miR-887-3p e miR-191-5p.

A transfecção foi realizada segundo o protocolo do reagente

Lipofectamine 2000, com adaptações das quantidades para ensaio em placa de 48 poços. Em cada poço foram plaqueadas 1×10^4 células da linhagem MDA-MB-231. A quantidade ideal de células para que se obtivesse 70% de confluência no momento da transfecção foi definida por meio do teste de diferentes quantidades de células. Foram transfectados 250 ng de vetor pmirGLO-MDM4_739A ou pmirGLO-MDM4_739C ou vetor vazio por poço. O pre-miR 887 foi testado nas diferentes concentrações citadas acima. O miRNA *mimic* para cada um dos miRNAs estudado e o miRNA controle negativo, foram transfectados nas concentrações de 50nM e 100nM por poço. Cada condição experimental foi realizada em triplicata técnica e em três experimentos independentes.

No dia anterior a transfecção, as células foram colocadas em placa de cultivo de 48 poços com meio RPMI completo. O ensaio de transfecção consiste no preparo de uma solução A contendo opti-MEM 1X (Gibco) e *Lipofectamine* 2000; e no preparo de uma solução B contendo: opti-MEM 1X; vetor pmirGLO-MDM4_739A ou pmirGLO-MDM4_739C ou o vetor vazio; e o pre-miR 887 ou miRNA *mimic* miR-887-3p ou miRNA *mimic* miR-191-5p ou o miRNA controle negativo. Em seguida, essas soluções (A e B) foram misturadas numa razão 1:1 de volume, incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Por fim, 25 μ L dessa solução de transfecção final contendo um dos vetores e o pre-miR 887 ou miRNA *mimics* ou miRNA controle negativo, além da lipofectamina, foram dispensados em cada poço da placa sob as células aderidas. Em seguida, foram adicionados 175 μ L de opti-MEM 1X. As células transfectadas são mantidas em incubadora com 5% CO₂ a 37°C. Após 6 horas foi realizada a troca do meio, substituindo pelo meio RPMI completo (contendo FBS e antibióticos).

5.4.4 Ensaio de luciferase

A atividade da luciferase foi avaliada em aparelho leitor de placas Tecan Infinite M200 Pro a partir da luminescência emitida, utilizando o kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) após 24 e 48 horas de transfecção. O preparo dos reagentes e das células foi realizado conforme o protocolo do fabricante. A expressão da *firefly* luciferase reflete a regulação da região 3'UTR clonada à jusante da sua ORF; enquanto a *Renilla* luciferase

funciona como um normalizador para a eficiência de transfecção. Portanto, a expressão relativa de luciferase é obtida pela razão da luminescência da *firefly* luciferase pela *Renilla* luciferase.

Em seguida, os resultados de luminescência obtidos para cada condição experimental testada foram normalizados pela mediana do vetor vazio sem co-transfecção de miRNA *mimic* ou miRNA controle negativo, visto que este corresponde a luminescência máxima. A comparação com o miRNA controle negativo nas mesmas condições de transfecção foi realizado por meio do teste Mann-Whitney. Para a comparação entre os diferentes alelos (A ou C) e as diferentes concentrações de *mimic* (50nM ou 100nM) após normalização pelo vetor vazio foi realizada a normalização pela mediana do respectivo controle – miRNA controle negativo. Em seguida, as comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Todas as comparações foram feitas a partir das medianas obtidas pela normalização dos valores de luminescência.

5.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO

5.5.1 Extração de RNA

A extração de RNA para avaliar a expressão do gene MDM4 e dos miRNAs 887-3p e 191-5p foi realizada com o reagente TRizol (Invitrogen). O RNA foi extraído a partir das células da linhagem MDA-MB-231 em placa de 6 poços a partir de $2,5 \times 10^5$ células após 24h de transfecção com 100nM dos miRNAs *mimics* e do miRNA controle negativo. As quantidades de lipofectamina, opti-MEM, vetores, *mimic* e controle negativo foram proporcionais para a placa de 6 poços mantendo-se as concentrações utilizadas para o ensaio de luciferase. Além da análise de expressão de MDM4 a

5.5.2 Síntese de cDNA

O RNA extraído foi convertido em cDNA com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* e RNase Inhibitor (*Applied Biosystems*) numa reação final de 20uL a partir de 500ng de RNA.

A reação de síntese do cDNA posteriormente utilizado para avaliar a

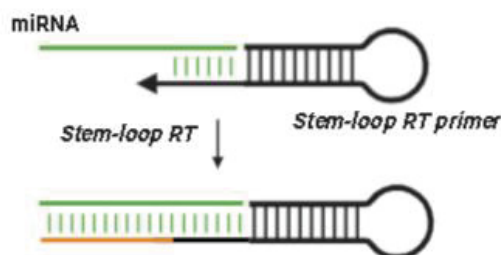
expressão do gene *MDM4* foi realizada com os *primers*– RT *Random primer* – fornecidos pelo fabricante (QUADRO 12).

QUADRO 12 – REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA COM O KIT *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* PARA A SÍNTESE DE cDNA DO GENE *MDM4*

Água	3,2 µL
Tampão 10x	2 µL
dNTP mix	0,8 µL
RT <i>Random Primer</i>	2 µL
<i>MultiScribe® Reverse Transcriptase</i> (50 U/µL)	1 µL
<i>RNase Inhibitor</i>	1 µL
Total	10 µL

Na reação para síntese de cDNA para a avaliação da expressão dos miRNAs foram utilizados *primers* específicos para cada miRNA avaliado (887-3p e 191-5p) e para os controles endógenos (RNU44 e RNU48) (QUADRO 13). O desenho do *primer* utilizado para a transcrição reversa – RT stem-loop - foi realizado conforme descrito por Varkonyi-Gasic et al. (2007) e Chen et al. (2005). O *primer* RT *stem-loop* específico consiste numa sequência geral complementar a estrutura de stem-loop do miRNA seguido pela adição de 6 a 7 nucleotídeos na porção 3' do primer. Esses nucleotídeos devem ser o reverso complementar dos 6 ou 7 nucleotídeos da extremidade 3' do miRNA (FIGURA 10). Assim, o *primer* RT *stem-loop* liga-se a porção 3' do miRNA e inicia a transcrição reversa.

FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO DO PRIMER RT STEM-LOOP UTILIZADO NA SÍNTESE DE cDNA DOS miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p E DOS RNU44 E RNU48



A sequência geral complementar a estrutura de *stem-loop* está representada em preto; em verde os nucleotídeos reverso complementar da extremidade 3' do miRNA específico; e em laranja a sequência do miRNA amplificada a partir do *primer*. FONTE: O autor (2020).

Os *primers* RT *stem-loop* para os dois miRNAs em estudo e para os dois endógenos foram adicionados na mesma reação de transcrição reversa. A mesma estratégia de desenho foi utilizada para os *primers* do miRNA e dos

controles endógenos. A quantidade de cada reagente utilizado na reação de transcrição reversa também foi adaptada. O volume total de *primers* a ser adicionado foi dividido pelo número de *primers* específicos (miR-887-3p, miR-191-5p, RNU44, RNU48) (QUADRO 14).

QUADRO 13 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* RT *STEM-LOOP* UTILIZADOS NA SÍNTESE DE cDNA DOS miRNAs 887-3p E 191-5p E DOS RNU44 E RNU48

<i>Primer RT stem-loop</i>	Sequência (5'-3')
miRNA 887-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA CTGGATACGACC CTCGG
miRNA 191-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA CTGGATACGAC CAGCTG
RNU44	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA CTGGATACGAC AGTCAGTTAG
RNU48	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA CTGGATACGAC GGTCAG

A região destacada em negrito é específica para o miRNA ou RNU alvo.

QUADRO 14 - REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA COM O KIT *HIGH-CAPACITY cDNA REVERSE TRANSCRIPTION KIT (APPLIED BIOSYSTEMS)* PARA A SÍNTESE DE cDNA DO miR-887-3p, miR-191-5p, RNU44 e RNU48.

Água	5,25 µL
Tampão 10x	2 µL
dNTP mix	0,8 µL
<i>Primer RT stem-loop</i>	0,5 µL (0,125 µL de cada primer específico)
<i>MultiScribe® Reverse Transcriptase</i> (50 U/µL)	1 µL
<i>RNase Inhibitor</i>	0,25 µL
Total	10 µL

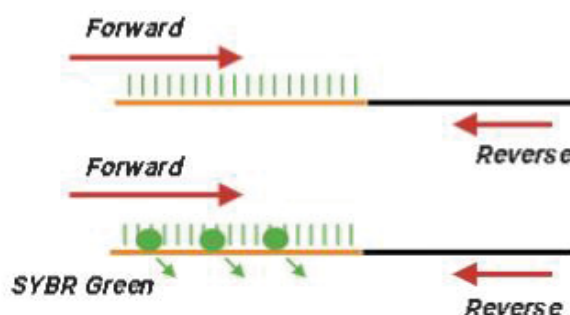
5.5.3 RT-qPCR

A expressão do gene *MDM4* e dos miRNAs 887-3p e 191-5p foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real a partir da reação com *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)* no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* em placa de 96 poços. Para cada reação foram utilizados 6 µL do mix e 4 µL da amostra de cDNA na diluição 1:50. As reações foram feitas em triplicata. A RT-qPCR foi realizada com o objetivo de verificar o

aumento da expressão de cada um dos miRNAs (887-3p e 191-5p) após 24h de transfecção com 100 nM dos miRNAs *mimics*, assim como a expressão do gene *MDM4* alvo desses miRNAs. Além das células transfectadas com miRNA *mimic*, foi realizada a análise de expressão do gene *MDM4* em duas linhagens celulares tumorais de mama do subtipo basal - MDA-MB-231 e MDA-MB-468-, duas linhagens luminal A - MCF-7 e ZR-75-1- e uma linhagem epitelial não tumoral – 184B5.

Na reação de RT-qPCR dos miRNAs 887-3p e 191-5p foi utilizado um par de *primers* para cada alvo (QUADRO 15). Os *primers forward* e *reverse* foram desenhados conforme descrito por Varkonyi-Gasic *et al.* (2007) e Chen *et al.* (2005). O *primer forward* específico consiste na sequência do miRNA maduro excluindo-se os nucleotídeos da extremidade 3' ajustando-se de acordo com a temperatura de melting. O *primer reverse* é universal, ou seja, pode ser usado com todos os alvos, visto que ele tem a mesma sequência de um trecho do primer RT-stem loop usado na síntese de cDNA (FIGURA 11). Os *primers* para RNU44 e RNU48 foram desenhados da mesma forma e utilizados como controles endógenos.

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DOS *PRIMERS FORWARD* E *REVERSE* UTILIZADOS NA qRT-PCR DOS miRNAs 887-3p e 191-5p E DOS RNU44 E RNU48



Representação dos *primers forward* específico e *reverse* universal utilizados na RT-qPCR. O *primer forward* corresponde a sequência do miRNA maduro excluindo-se alguns nucleotídeos da extremidade 3' complementar ao cDNA sintetizado e representado em laranja. O *primer reverse* universal tem a mesma sequência de um trecho do primer RT-stem-loop usado na transcrição reversa e complementar ao cDNA representado em preto. FONTE: O autor (2020).

Os *primers forward* e *reverse* para a expressão do gene *MDM4* delimitam uma região de 110pb. Sendo que o *primer forward* está localizado no éxon 2 e o

primer reverse no éxon 3. Os genes *Gus-β* e *U6* foram utilizados como controles endógenos desta reação (QUADRO 16).

QUADRO 15 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS FORWARD* E *REVERSE* UTILIZADOS NA RT-qPCR DOS miRNAs 887-3p E 191-5p E DOS RNU44 E RNU48

<i>Primer miR-887-3p</i>	5' GTGAACGGGCGCCATC 3'
<i>Primer forward miR-191-5p</i>	5' CAACGGAATCCCAAAGCAG 3'
<i>Primer forward RNU44</i>	5' AATGCTGACTGAACATGAAGGTCTT 3'
<i>Primer forward RNU48</i>	5' ACTCTGAGTGTGTCGCTGATGC 3'
<i>Primer reverse universal</i>	5' CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT 3'

QUADRO 16 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS FORWARD* E *REVERSE* UTILIZADOS NA qRT-PCR DO GENE *MDM4*, *GUS-B* E *U6*

<i>Primer forward MDM4</i>	5' CAACATCTGACAGTGCTTGCAGG 3'
<i>Primer reverse MDM4</i>	5' CAGGTGCGCAAGGTGAAATGTTC 3'
<i>Primer forward GUS- β</i>	5'GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT3'
<i>Primer reverse GUS- β</i>	5' CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA3'
<i>Primer forward U6</i>	5' CTCGCTTCGGCAGCACA 3'
<i>Primer reverse U6</i>	5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3'

A quantificação relativa da expressão do gene *MDM4* assim como dos miRNAs 887-3p e 191-5p nas linhagens após transfecção foi normalizada em relação aos controles endógenos, *Gus-B* e *U6* para *MDM4* e RNU44 e RNU48 para os miRNAs, e obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. A quantificação do gene alvo e dos miRNAs após transfecção com os mimetizadores endógenos foi comparada com a quantificação da linhagem transfectada com o miRNA controle negativo. Os experimentos para análise de expressão dos miRNAs e de *MDM4* foram realizados em triplicata técnica e em três experimentos independentes.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de luminescência para cada condição foram comparados com o respectivo controle negativo ou entre alelos e entre diferentes concentrações por meio do teste de Mann-Whitney.

Os valores de *fold change* obtidos na RT-qPCR do gene *MDM4* e dos miRNAs após transfecção com miRNA *mimic* ou miRNA controle negativo foram comparados através do teste t.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio da plataforma *GraphPad Prism 7*. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

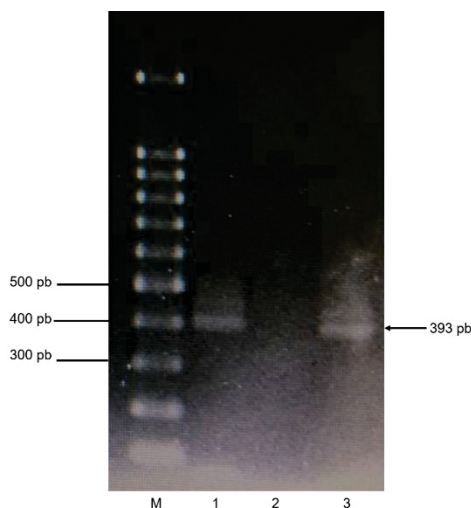
6.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR

6.1.1 Amplificação dos insertos MDM4_739A e MDM4_739C

Para a construção dos vetores contendo o sítio alvo para ligação dos miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p um fragmento da região 3'UTR do gene *MDM4* foi amplificado. O inserto contendo o alelo A foi obtido a partir da amplificação do DNA da linhagem MDA-MB-468 que apresenta o genótipo AA para o SNP rs4245739. Enquanto o inserto com a variante C foi amplificado a partir do DNA da linhagem MDA-MB-231 homozigota CC para o SNP rs4245739.

Os insertos amplificados por reação de PCR podem ser observados na FIGURA 12. Pela presença de uma banda única, podemos observar que os *primers* utilizados possibilitaram uma amplificação específica. A posição da banda, entre 300 e 400 pb corresponde ao tamanho esperado de 393 pb. A amplificação possibilitou que esse material pudesse ser purificado e utilizado para digestão enzimática.

FIGURA 12 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS VARIANTES DE *MDM4*



Amplificação de um fragmento da região 3'UTR de *MDM4* contendo o SNP rs4245739. Gel de agarose 1%. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec). 1- Fragmento do 3'UTR do gene *MDM4_739A* (393 pb); 2- Branco; 3- Fragmento do 3'UTR do gene *MDM4_739C* (393 pb). FONTE: O autor (2020).

6.2 CLONAGEM

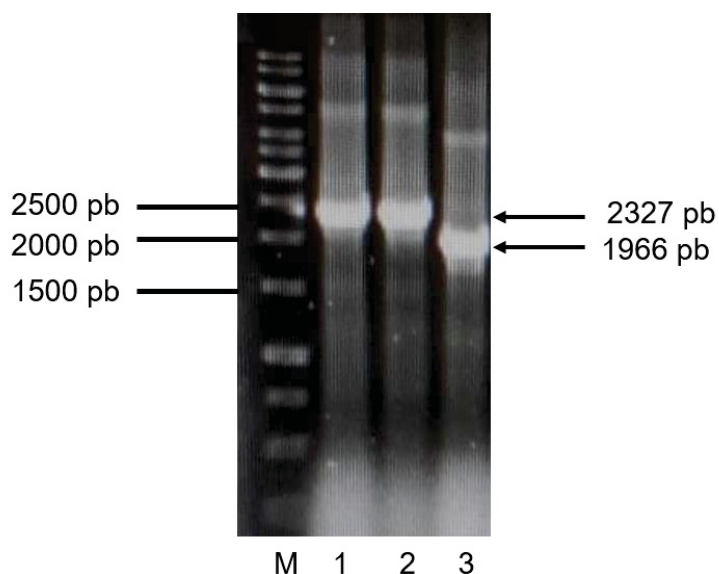
Os vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C utilizados nos ensaios de luciferase foram obtidos por meio da clonagem molecular em *E. coli* e extração de DNA plasmidial por meio de minipreparação de plasmídeo.

6.2.1 Obtenção dos clones pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C

A construção dos vetores alelo específicos que foram utilizados na transfecção foi realizada por meio de reação de ligação entre os insertos amplificados a partir da região 3'UTR das linhagens celulares e o vetor pmirGLO. Uma vez que as células transformadas cresceram em meio seletivo, a presença dos clones foi confirmada por PCR de colônia e PCR do produto de miniprep.

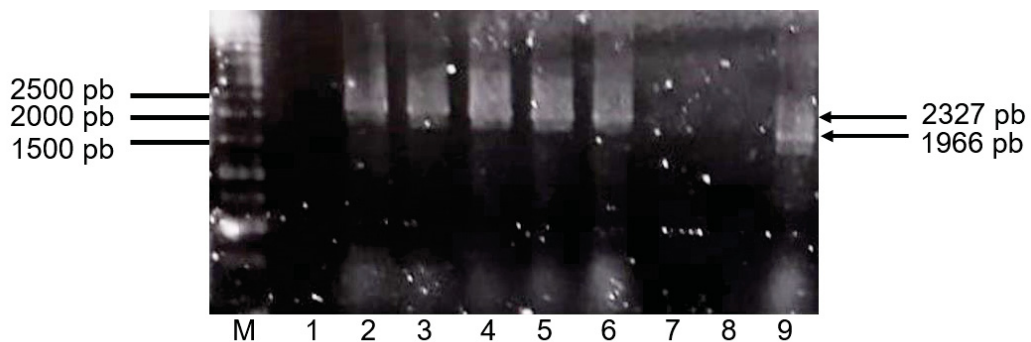
Os clones do constructo final contendo cada inserto: pmirGLO-MDM4_739A (FIGURA 13) e pmirGLO-MDM4_739C (FIGURA 14) puderam ser observados por meio da eletroforese em gel de agarose a partir do produto de PCR das colônias, utilizando *primers* para o vetor pmirGLO. A partir desses *primers* o tamanho esperado para o vetor vazio (sem inserto) é de 1966 pb e de 2327 pb para os vetores clonados. Todos os clones obtidos para cada uma das variantes cresceram na mesma placa (para cada variante), a partir do mesmo processo de transformação bacteriana.

FIGURA 13– ELETROFORESE DA PCR DE COLÔNIAS DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739A SELECIONADOS EM MEIO DE CULTURA LA COM AMPICILINA



Amplificação de um segmento do vetor pmirGLO recombinante contendo o inserto MDM4_739A utilizando *primers* para o vetor. Gel de agarose 1% M – Marcador de peso molecular de 1kb (KASVI); 1 e 2- Clones pmirGLO-MDM4_739A (2327 pb); 3 - Controle Vetor pmirGLO vazio (1966 pb). FONTE: O autor (2020).

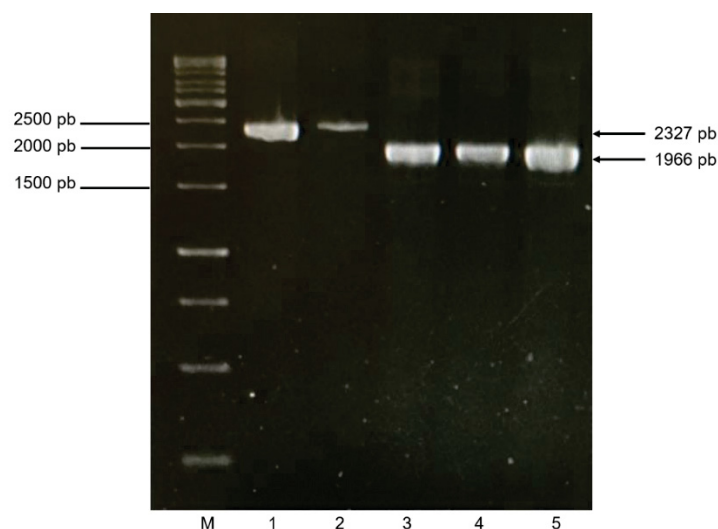
FIGURA 14 – ELETROFORESE DA PCR DE COLÔNIAS DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739C SELECIONADOS EM MEIO DE CULTURA LA COM AMPICILINA



Amplificação de um segmento do vetor pmirGLO recombinante contendo o inserto MDM4_739C utilizando *primers* para o vetor. Gel de agarose 1%. M- Marcador de peso molecular 1kb (KASVI); 1- Branco; 2 a 6- Clones pmirGLO-MDM4_739C (2327 pb); 7 e 8- Branco; 9 - Controle vetor pmirGLO vazio (1966 pb). FONTE: O autor (2020).

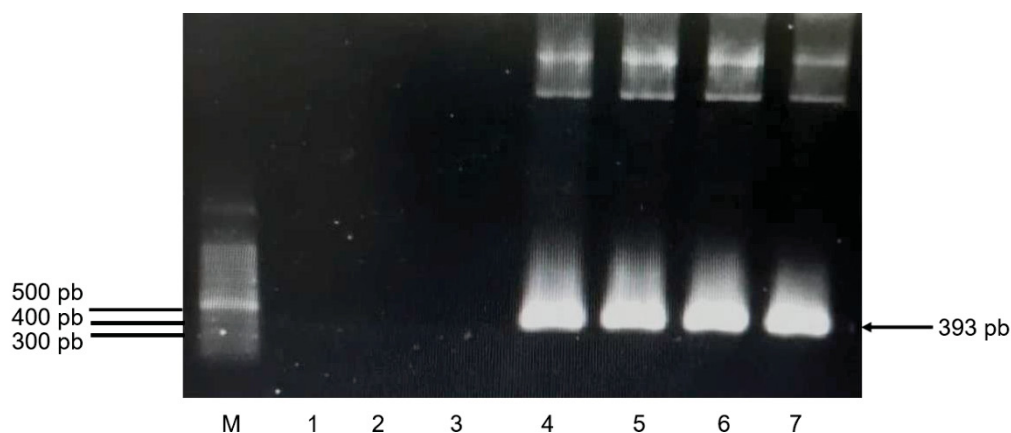
Após a obtenção do DNA plasmidial dos clones identificados por PCR de colônias, foi realizada a confirmação da clonagem através de reação de PCR utilizando tanto *primers* para o vetor pmirGLO (FIGURA 15), assim como *primers* para o inserto (FIGURA 16).

FIGURA 15 – ELETROFORESE DA PCR DO PRODUTO DE MINIPREP DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739A



Amplificação de um segmento do vetor pmirGLO recombinante contendo o inserto MDM4_739A utilizando *primers* para o vetor. Gel de agarose 1%. M- Marcador de peso molecular 1kb (KASVI); 1 e 2- Clones pmirGLO-MDM4_739A (2327 pb); 3 a 5- Controle vetor vazio (1966 pb). FONTE: O autor (2020).

FIGURA 16– ELETROFORESE DA PCR DO PRODUTO DE MINIPREP DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739C



Amplificação de um segmento do vetor pmirGLO recombinante contendo o inserto MDM4_739C utilizando primers para o inserto. Gel de agarose 1%. M – Marcador de peso molecular 1kb (KASVI); 1 a 3 – Branco; 4 a 7- Clones pmirGLO-MDM4_739C. FONTE: O autor (2020).

6.2.2 Sequenciamento

Para avaliar a ligação dos miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p de maneira alelo-específica é necessário que cada um dos constructos apresente diferença apenas na posição do SNP rs4245739. Dessa forma, é possível garantir que a ligação dos miRNAs ocorre na presença do alelo A ou C quando cada um dos vetores pmirGLO-MDM4_739A ou pmirGLO-MDM4_739C é transfectado, respectivamente. Com o objetivo de avaliar a especificidade desses constructos foi realizado o sequenciamento.

O sequenciamento dos clones pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C foi realizado a partir do DNA plasmidial obtido por miniprep utilizando os *primers forward* e *reverse* para a sequência 3'UTR do gene *MDM4* contendo os alelos do SNP rs4245739, em equipamento *3500xl Genetic Analyzer* (Life Technologies). Os eletroferogramas abaixo correspondem ao sequenciamento dos clones selecionados para a obtenção de plasmídeos utilizados na transfecção, visto que por meio da análise no *Mutation* apresentam variação apenas na posição de interesse (do SNP rs4245739) (FIGURA 17).

FIGURA 17– ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DOS CLONES pmirGLO-MDM4_739A E pmirGLO-MDM4_739C



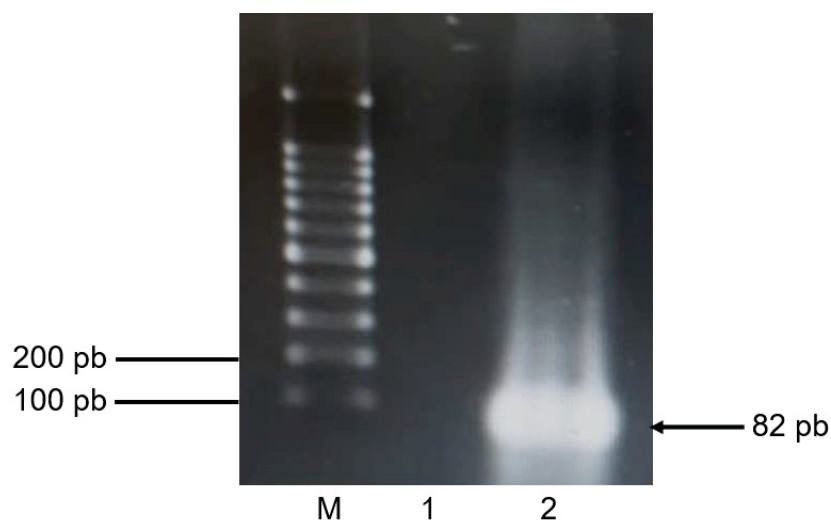
Eletroferogramas do sequenciamento dos clones pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C selecionados para os ensaios de transfecção. Os eletroferogramas estão identificados pela numeração da linhagem correspondente ao genótipo utilizado para a obtenção do inserto 3'UTR, sendo 231 para o inserto MDM4_739C e 468 para o inserto MDM4_739A. O sequenciamento foi realizado com os *primers forward* e *reverse* do inserto. A caixa vermelha em destaque indica a posição do SNP rs445739 com a variante C (nos dois eletroferogramas superiores) e com a variante A (nos dois eletroferogramas inferiores). FONTE: O autor (2020).

Através do eletroferograma e análise das sequências utilizando o programa *Mutation Surveyor* foi possível observar o alelo A do SNP rs4245739 no clone pmirGLO-MDM4_739A e o alelo C do SNP rs4245739 no clone pmirGLO-MDM4_739C. Dessa forma, foi possível confirmar a clonagem específica de cada vetor e utilizá-los na transfecção e ensaios de luciferase.

6.3 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

A reação de transcrição *in vitro* para obtenção do pre-miR-887 foi proposta nesse trabalho como estratégia ao uso de miRNA *mimic*, por serem estes mais caros. Os oligonucleotídeos apresentam a sequência do precursor do miRNA e do promotor da T7 polimerase. Antes de realizar a transcrição *in vitro* os oligonucleotídeos devem ser anelados formando um DNA molde com tamanho aproximado de 82 pb observado em eletroforese de gel de agarose (FIGURA 18).

FIGURA 18 – ELETROFORESE DO ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA SÍNTESE DE DNA MOLDE PARA TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* DO pre-miR 887



Anelamento dos oligonucleotídeos utilizado posteriormente como molde de DNA para a reação de transcrição *in vitro*. Gel de agarose 2%. M- Marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec); 1- Branco; 2- Anelamento dos oligos (~82 pb) FONTE: O autor (2019)

Os oligonucleotídeos anelados foram utilizados como molde de DNA na transcrição *in vitro*. Após a reação de transcrição *in vitro*, o pre-miR sintetizado foi purificado com uma mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1). As concentrações de pre-miR obtidas foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop® 2000/2000c (Thermo Fisher) e variaram entre 3300 a 5000 ng/μL. O processo de anelamento dos oligonucleotídeos e transcrição *in vitro* foi realizado várias vezes para obter o pre-miRNA a ser utilizado em cada experimento de transfecção.

6.4 ENSAIO DE LUCIFERASE

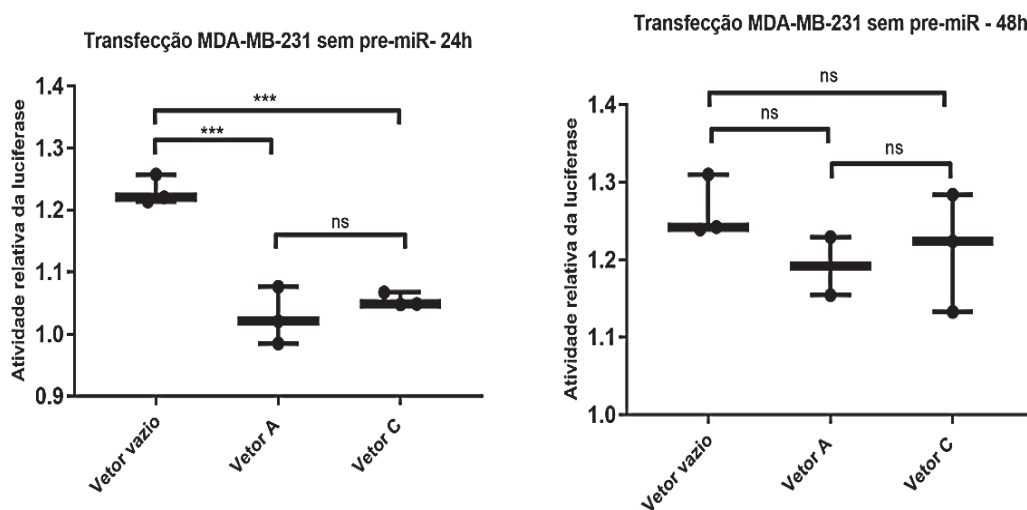
Após os vetores terem sido sequenciados e a presença dos alelos A e C do SNP rs4245739 ser confirmada em cada um dos vetores, foram realizados os experimentos de transfecção e avaliação da atividade da luciferase através dos dados de leitura de luminescência.

Inicialmente, realizou-se a transfecção da linhagem MDA-MB-231 com os vetores vazio (sem o inserto), pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C sem realizar a co-transfecção do pre-miR 887 e dos miRNAs mimetizadores (os miRNAs *mimics*) miR-887-3p e miR-191-5p. O objetivo dessa transfecção foi analisar se seria possível observar alguma modificação da atividade de luciferase por meio da regulação do miRNA-887-3p ou miRNA-191-5p

endógenos, sem transfecção do pre-miR transcrito *in vitro* ou de miRNA *mimic*. Porém, não foi verificada modificação da atividade de luciferase nesse ensaio quando comparada a atividade da luciferase entre os vetores com os insertos A e C (FIGURA 19). Porém, observou-se uma diminuição da atividade da luciferase ($p=$) na comparação entre o vetor vazio e os vetores com a variante A ou C. Desse modo, nos ensaios seguintes de transfecção do pre-miR 887 o vetor contendo cada um dos insertos foi utilizado como controle para comparação.

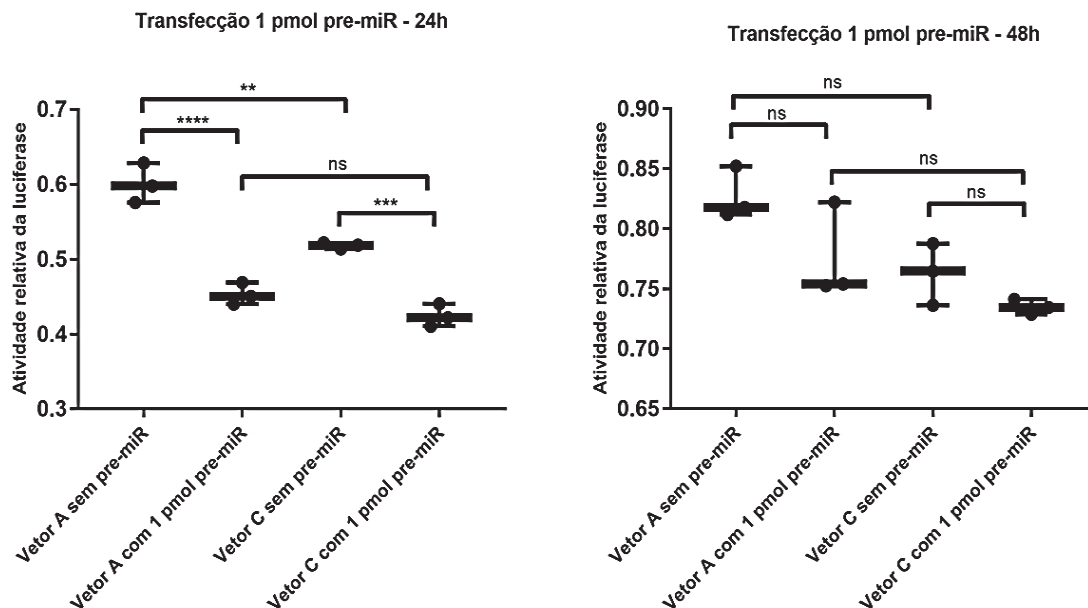
De acordo com o objetivo proposto inicialmente de realizar a transfecção com o pre-miR transcrito *in vitro* foram realizadas as transfecções dos vetores vazio, pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C com diferentes concentrações do pre-miR-887, que variaram de 1 a 40 pmol (FIGURAS 20-25).

FIGURA 19 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS A TRANSFECÇÃO APENAS DOS VETORES



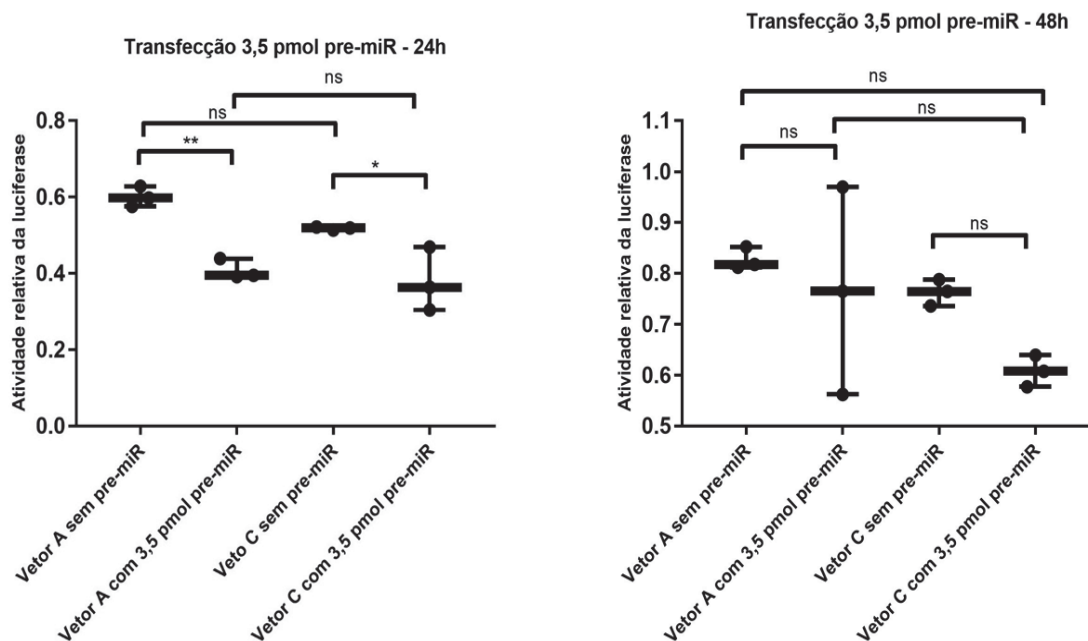
Atividade relativa da expressão da luciferase na transfecção dos vetores vazio, pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C em 24 e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; *** $p < 0,001$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 20 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFECÇÃO DE 1 pmol DO pre-miR 887-3p



Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 1 pmol do pre-miR-887 em 24 e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. FONTE: O autor (2020).

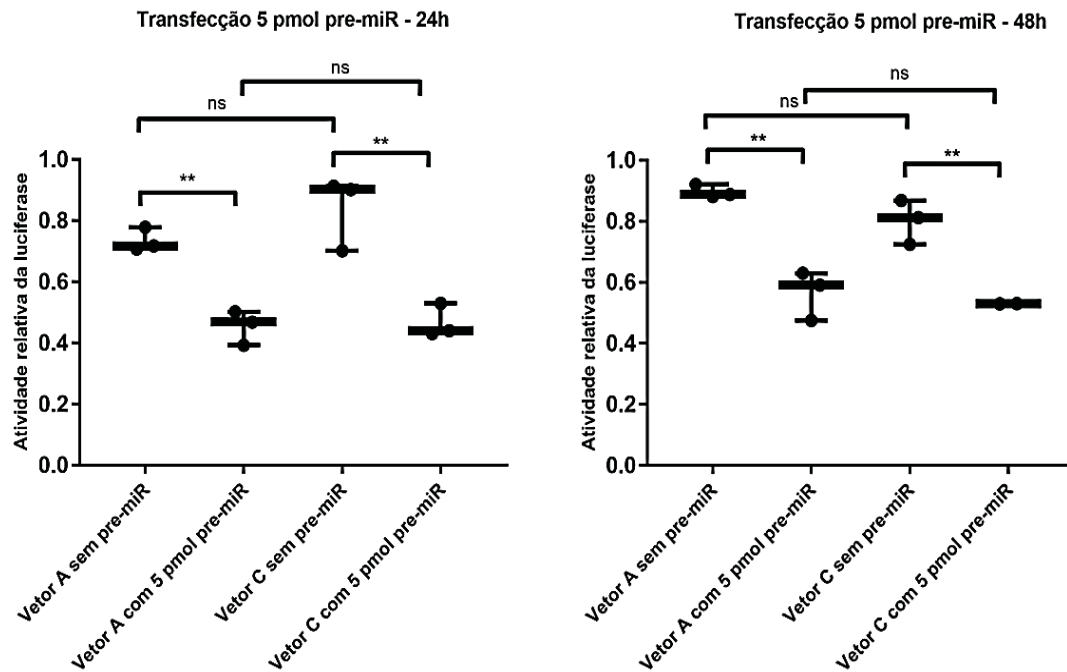
FIGURA 21 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 3,5 pmol DO pre-miR 887-3p



Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 3,5 pmol do pre-miR-887 em 24 e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização

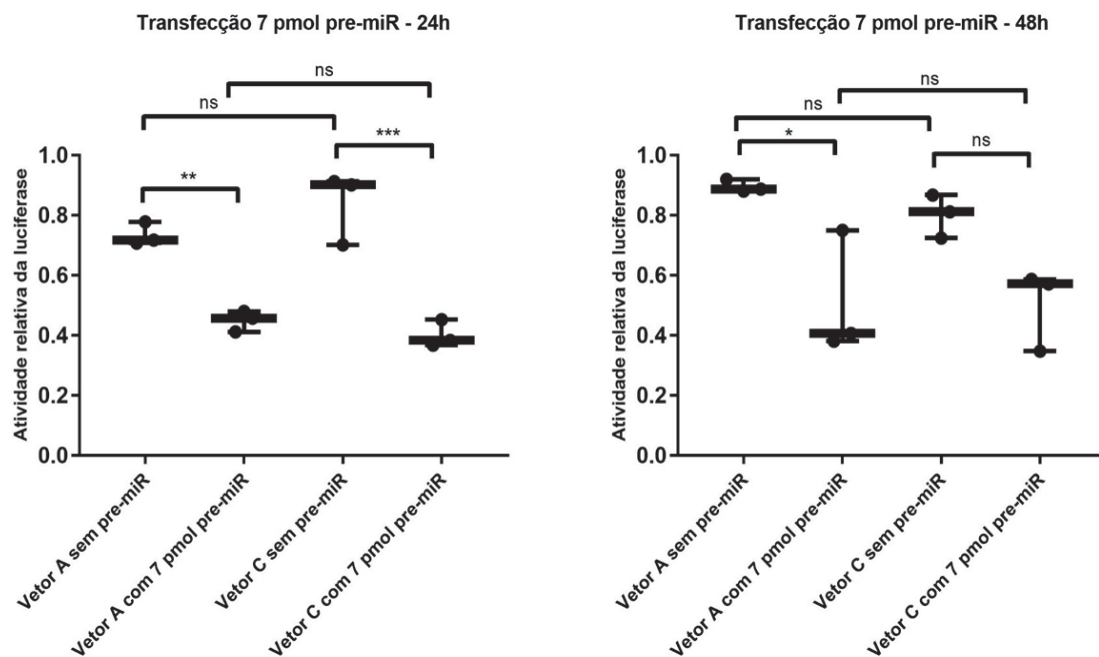
dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; * $p < 0.05$ ** $p < 0,01$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 22 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 5 pmol DO pre-miR 887-3p



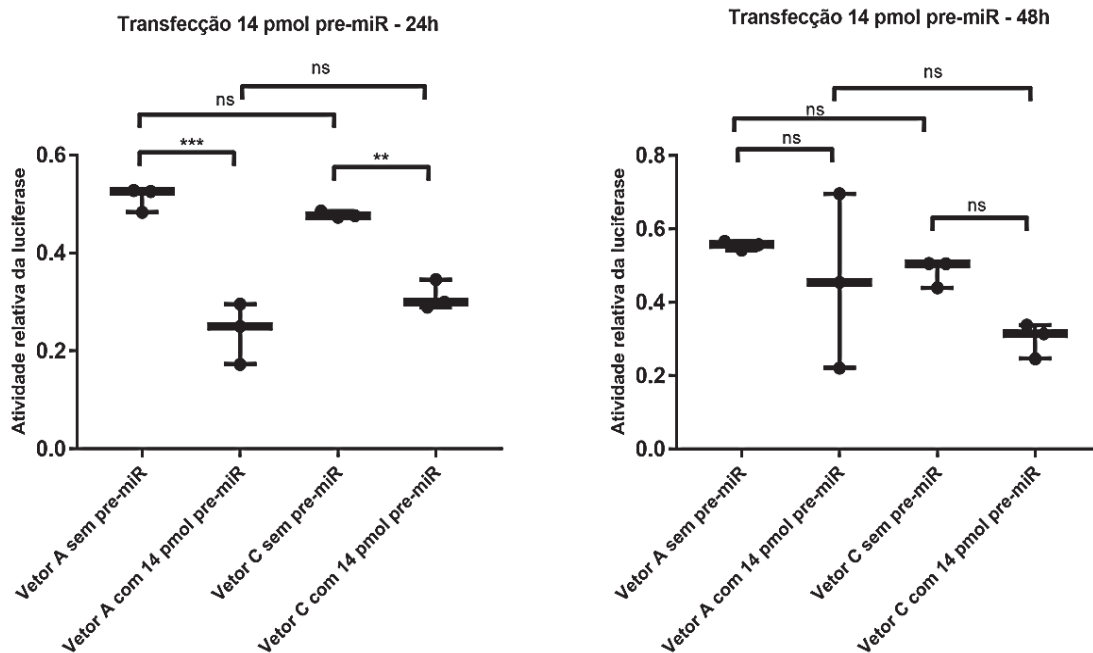
Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 5 pmol do pre-miR-887 em 24 e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; ** $p < 0,01$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 23 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 7 pmol DO pre-miR 887-3p



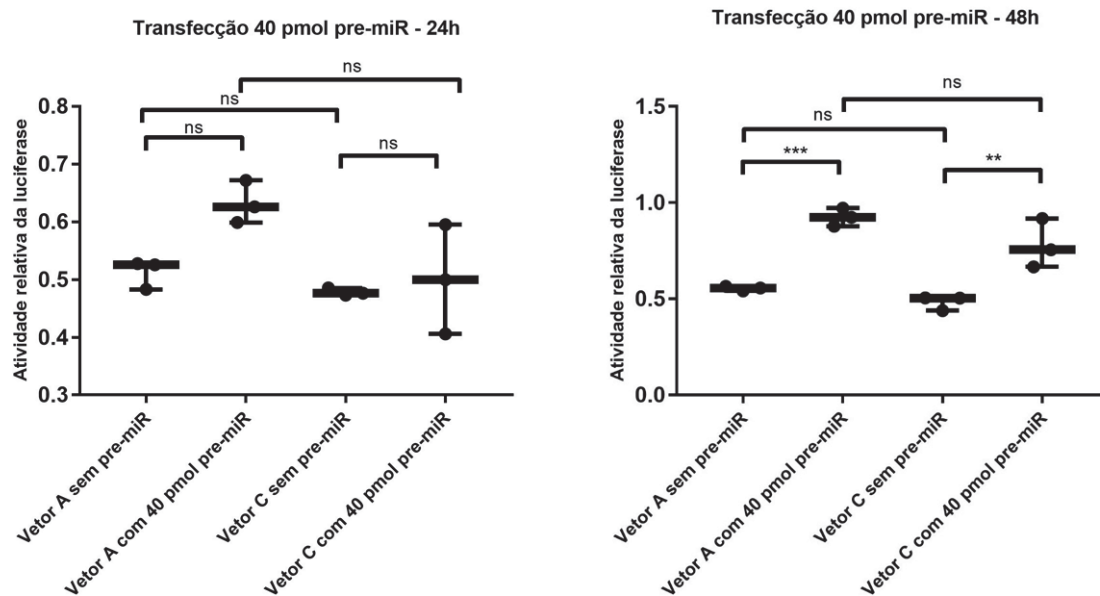
Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 7 pmol do pre-miR-887 em 24e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 24 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 14 pmol DO pre-miR 887-3p



Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 14 pmol do pre-miR-887 em 24 e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; **p<0,01; ***p<0,001. Fonte: O autor (2020).

FIGURA 25 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 E 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 40 pmol DO pre-miR 887-3p



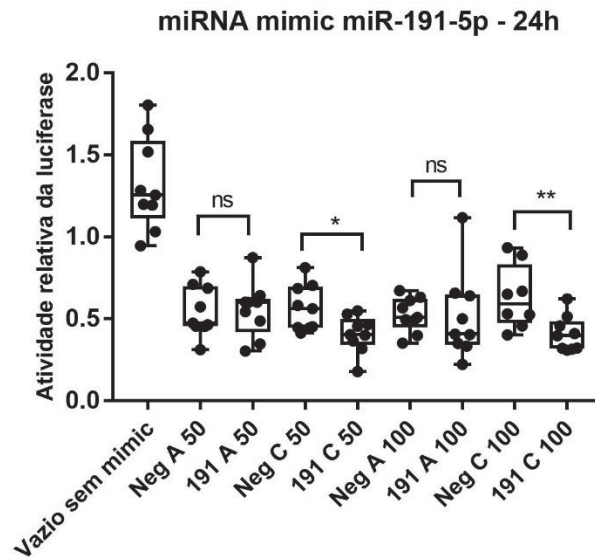
Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 40 pmol do pre-miR-887 em 24 e 48h. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla*. Vetor A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; Vetor C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; ns: não significativo; **p<0,01; ***p<0,001. FONTE: O autor (2020).

Em todas as concentrações de pre-miR testadas, com exceção de 40 pmol, foi observada uma ligação inespecífica após 24h, pois a atividade da luciferase foi significativamente menor tanto na comparação do vetor sem inserto e do vetore com o inserto A quanto com o inserto C. Não houve diferença significativa na atividade da luciferase quando comparados os vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C co-transfectados com o pre-miR-887 nas várias concentradas avaliadas (FIGURAS 20-25). As células transfectadas com 40 pmol do pre-miR-887-3p observadas em microscópio antes da leitura da luminescência apresentaram uma morfologia alterada, com membranas lisadas ou presença de vacúolos no interior da célula, indicando morte celular. Apesar

disso, foi realizado o ensaio de luciferase e os resultados estão apresentados (FIGURA 25). A partir disso, considerou-se que a concentração de 40 pmol transfectada foi tóxica para as células em cultivo, o que pode ser devido a presença de impurezas resultantes do processo de purificação do pre-miR.

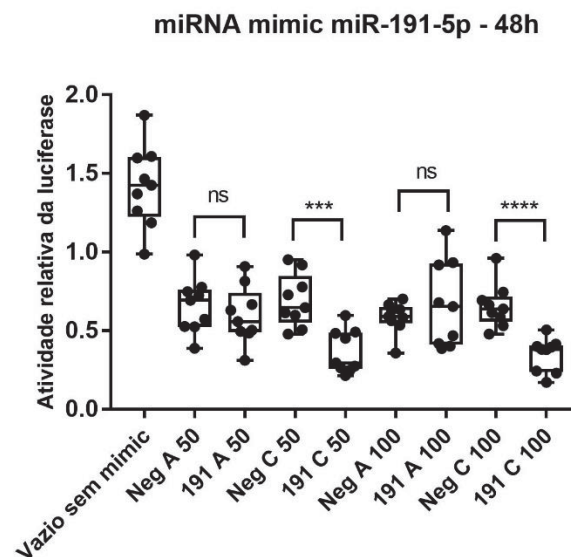
Tendo em vista que as alterações observadas na atividade da luciferase com o pre-miR obtido *in vitro* não foram capazes de avaliar a ligação dos miRNAs ao sítio alvo de maneira eficiente, iniciou-se os experimentos de transfecção com 50nM e 100nM dos miRNAs mimetizadores endógenos - *mirVana*[®] miRNA *mimic* (Thermo Fisher) - miR-887-3p e miR-191-5p, além do miRNA controle endógeno - *mirVana*[™] miRNA *Mimic*, Negative Control #1 (Thermo Fisher). O ensaio repórter luciferase confirmou que na presença do inserto MDM4_739C no vetor pmirGLO a atividade da luciferase diminuiu significativamente em aproximadamente 28,58% na presença de 50nM do miR-191-5p nas primeiras 24 horas ($p=0,0315$) quando comparado com a transfecção do vetor pmirGLO-MDM4_739C com o miRNA controle negativo (FIGURA 26). Essa redução foi ainda maior após 48 horas (53,85%, $p = 0,0005$) (FIGURA 27). O vetor contendo o alelo A não mostrou nenhuma modulação significativa na atividade da luciferase na presença de 50mM do miRNA 191-5p ($p= 0,7962$) (FIGURA 26). Ao ser transfectado 100nM do *mimic* miR-191-5p foi possível verificar nas primeiras 24 horas uma redução de 33,9% ($p = 0,0055$) da atividade da luciferase na presença do inserto com o alelo C (FIGURA 26) e nas 48 horas a redução foi de 40,62% ($p < 0,0001$) (FIGURA 27). Também não foram observadas nenhuma modulação significativa da atividade da luciferase quando houve a co-transfecção do alelo A com 100nM do *mimic* miR-191-5p nos ensaios de 24h ($p= 0,5457$) (FIGURA 18) e de 48h ($p= 0,6665$) (FIGURA 27).

FIGURA 26 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24h APÓS TRANSFECÇÃO DO miRNA *MIMIC* miR-191-5p



Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 50 e 100 nM do miRNA *mimic* 191-5p após 24h. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima). Neg: miRNA controle negativo; 191: miRNA *mimic* 191-5p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 27 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 48h APÓS TRANSFEÇÃO DO miRNA *MIMIC* miR-191-5p

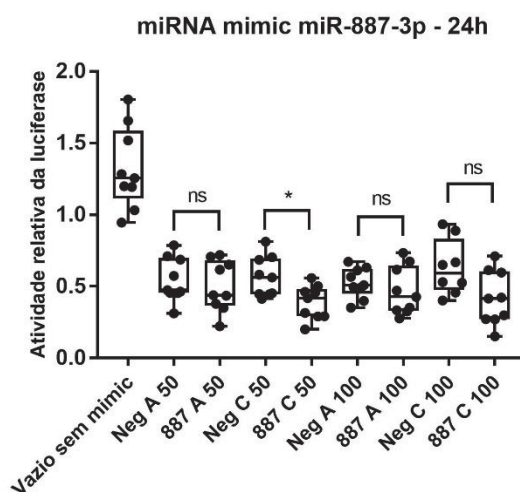


Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 50 e 100 nM do miRNA *mimic* 191-5p após 48h. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima). Neg: miRNA controle negativo; 191: miRNA

mimic 191-5p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. FONTE: O autor (2020).

A região 3'UTR do gene *MDM4* contendo o miRSNP rs4245739 também apresenta sítio de ligação para o miRNA miR-887-3p. As células da linhagem MDA-MB-231 co-transfectadas com o mimetizador miR-887-3p na concentração de 50nM e o inserto contendo o alelo C apresentaram uma redução de 25% da atividade da luciferase após 24h de transfecção quando comparada com o controle negativo de transfecção contendo miRNA negativo ($p=0,0400$) (FIGURA 28). Após 48h a luminescência diminuiu 49,2% ($p=0,0005$) (FIGURA 29). Este resultado indica a ligação do miRNA *mimic* 887-3p ao sítio de ligação 3'UTR do gene *MDM4* contendo o alelo C do SNP rs4245739 inserido no vetor pmirGLO. Na presença do vetor com o inserto contendo o alelo A não houve mudança significativa da atividade da luciferase tanto nas 24 horas ($p=0,4363$) (FIGURA 28), quanto nas 48 horas após o ensaio de transfecção ($p > 0,9999$) (FIGURA 29), indicando uma ligação alelo-específica. A transfecção de 100nM do *mimic* 887-3p não resultou em diferença significativa da atividade da luciferase ($p=0,0592$) após 24h quando comparada com o controle negativo (FIGURA 28). Entretanto, diferença significativa foi observada após 48h de co-transfecção, com uma diminuição da luminescência de 54,7% ($p < 0,0001$) na comparação com o controle negativo (FIGURA 29).

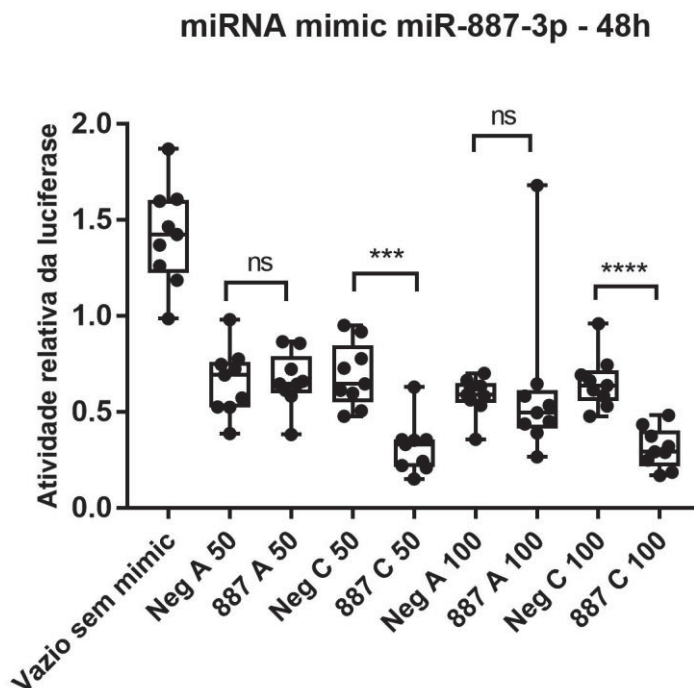
FIGURA 28 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24h APÓS TRANSFECÇÃO DO miRNA *MIMIC* miR-887-3p



Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 50 e 100 nM do miRNA *mimic* 887-3p após 24h. Cada

ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima). Neg: miRNA controle negativo; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; * $p < 0.05$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 29 - ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 48h APÓS TRANSFEÇÃO DO miRNA *MIMIC* miR-887-3p



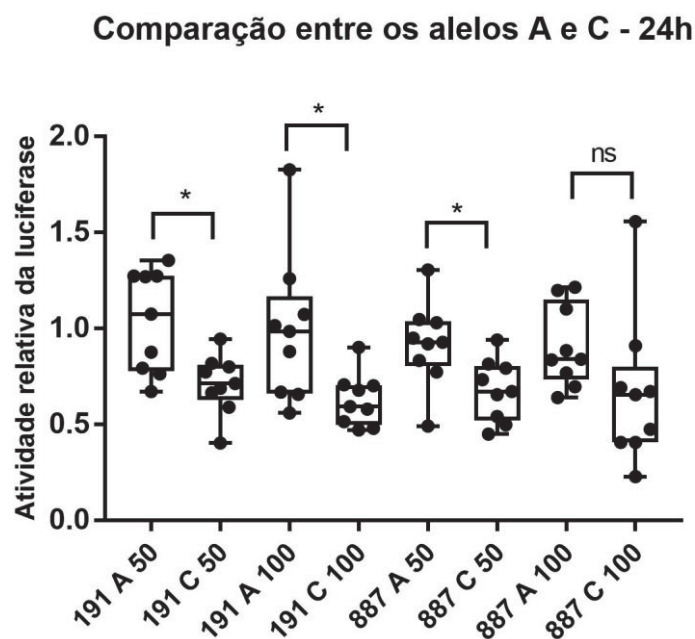
Atividade relativa da expressão da luciferase na co-transfecção dos vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C e 50 e 100 nM do miRNA *mimic* 887-3p após 48h. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima). Neg: miRNA controle negativo; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. FONTE: O autor (2020).

Na comparação da luminescência obtida após 24 e 48h de transfecção de 50nM e 100nM do miRNA *mimic* 191-5p entre as duas condições de transfecção – com o vetor pmirGLO-MDM4_739C e pmirGLO-MDM4_739A- foram observadas diferenças significativas (FIGURAS 30 e 31). A redução da atividade da enzima luciferase na transfecção com o vetor contendo o alelo C do SNP rs4245739 em comparação ao vetor contendo o alelo A indica a ligação alelo-específica do miRNA *mimic* 191-5p confirmando a predição *in silico*.

A transfecção do vetor pmirGLO-MDM4_739C e do pmirGLO-MDM4_739A com 50 nM do miRNA *mimic* 887-3p resultou em redução

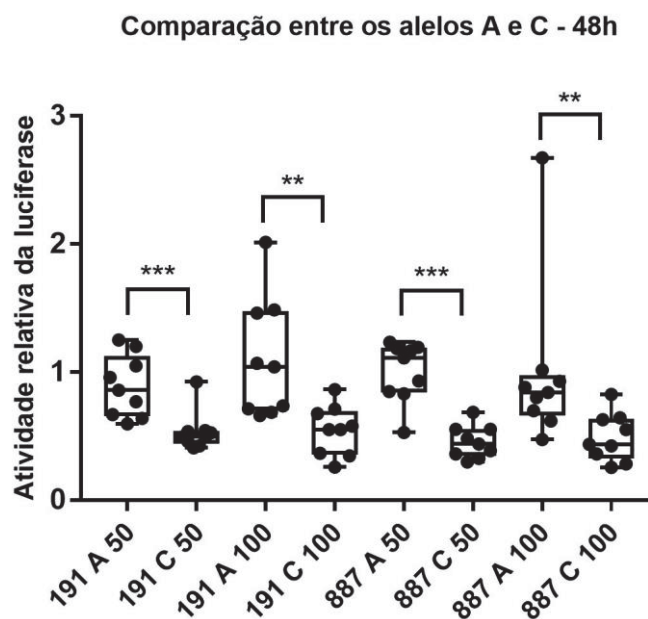
significativa da atividade de luciferase após 24h ($p=0,0188$) (FIGURA 30) e 48h ($p=0,0003$) (FIGURA 31) nas células transfectadas com o vetor contendo o sítio de ligação 3'UTR com o alelo C. Porém, a transfecção de 100nM deste *mimic* não resultou em diferença significativa após 24h ($p=0,0503$) (FIGURA 30), mas diminuiu a luminescência na transfecção com o vetor pmirGLO-MDM4_739C em comparação ao vetor pmirGLO-MDM4_739A após 48h ($p=0,0040$) (FIGURA 31). Estes resultados apontam a ligação específica do miRNA *mimic* 887-3p ao sítio 3'UTR de *MDM4* contendo o alelo C nas duas diferentes concentrações de *mimic* após 48h de transfecção, sendo que a luminescência na transfecção com o vetor contendo a variante C foi menor em pelo menos 40% que aquela observada com o miRNA no vetor com o inserto A.

FIGURA 30– ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE ENTRE OS VETORES A E C 24h APÓS TRANSFECÇÃO DOS miRNAs *MIMICS* miR-887-3p e miR-191-5p



Comparação da atividade relativa da expressão da luciferase após 24h de co-transfecção de 50 e 100 nM dos miRNAs *mimics* 887-3p e 191-5p entre os vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima) e em relação ao respectivo controle negativo. 191: miRNA *mimic* 191-5p; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; * $p<0.05$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 31 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE ENTRE OS VETORES A E C 48h APÓS TRANSFEÇÃO DOS miRNAs *MIMICS* miR-887-3p e miR-191-5p

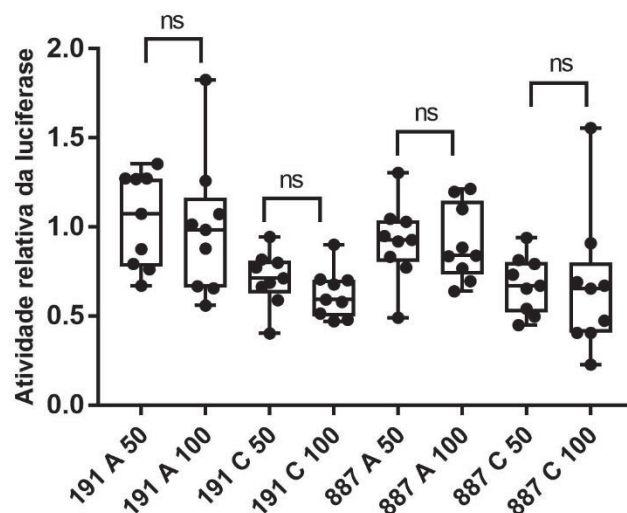


Comparação da atividade relativa da expressão da luciferase após 48h de co-transfecção de 50 e 100 nM dos miRNAs *mimics* 887-3p e 191-5p entre os vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima) e em relação ao respectivo controle negativo. 191: miRNA *mimic* 191-5p; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. FONTE: O autor (2020).

Com o objetivo de investigar um efeito dependente de dose na interação entre os miRNAs *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p com o inserto contendo o alelo C da região 3'UTR do gene *MDM4* foram comparadas a atividade de luciferase nas transfecções entre o vetor contendo o mesmo alelo do SNP rs4245739 mas com diferentes concentrações do miRNA *mimic* após 24 e 48h de transfecção. Não foram observadas reduções significativas da atividade da enzima luciferase nestas comparações (FIGURAS 32 e 33). Desse modo, foi possível concluir que a ligação dos miRNAs estudados ao seu alvo é independente das concentrações de 50nM e 100nM testadas, mas dependente do alelo presente no sítio alvo de ligação.

FIGURA 32 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24h APÓS TRANSFEÇÃO DE 50 E 100 nM DOS miRNAs *MIMICS* miR-887-3p e miR-191-5p

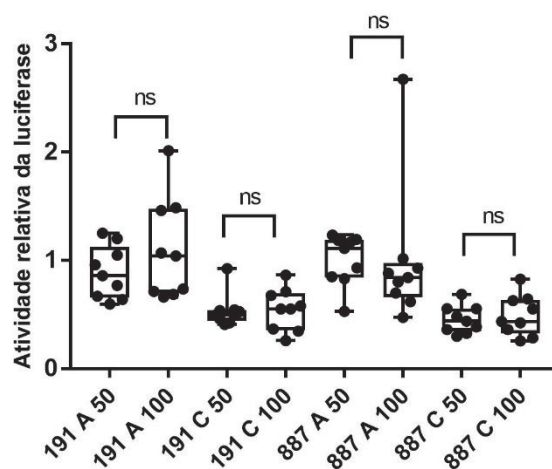
Comparação entre as concentrações 50 nM e 100 nM - 24h



Comparação da atividade relativa da expressão da luciferase após 24h de co-transfecção de 50 e 100 nM dos miRNAs *mimics* 887-3p e 191-5p. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima) e em relação ao respectivo controle negativo. 191: miRNA *mimic* 191-5p; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 33 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 50 E 100 nM DOS miRNAs *MIMICS* miR-887-3p e miR-191-5p

Comparação entre as concentrações 50 nM e 100 nM - 48h



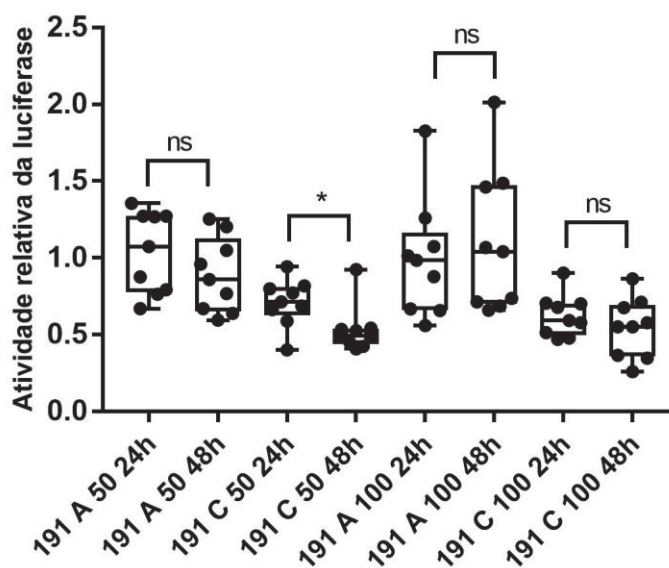
Comparação da atividade relativa da expressão da luciferase após 48h de co-transfecção de 50 e 100 nM dos miRNAs *mimics* 887-3p e 191-5p. Cada ponto no gráfico representa a mediana da

triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima) e em relação ao respectivo controle negativo. 191: miRNA *mimic* 191-5p; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo. FONTE: O autor (2020).

Para verificar o efeito do tempo na transfecção foram comparados a redução da luminescência após 24h e 48h para cada *mimic* nas diferentes concentrações utilizadas e a interação entre os vetores com os alelos A e C. A redução da luminescência após 48h foi significativamente maior que aquela observada 24h após a co-transfecção de 50 nM dos miRNAs *mimics* miR-887-3p ($p=0,0106$) (FIGURA 34) e miR-191-5p ($p=0,0315$) (FIGURA 35) com o vetor contendo o inserto do alelo C. Não foram observadas diferenças do tempo após transfecção quando foram utilizados 100nM para ambos os miRNAs.

FIGURA 34– ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 e 48h APÓS TRANSFECÇÃO DE 50 E 100 nM DO miRNA *MIMICS* miR-191-5p

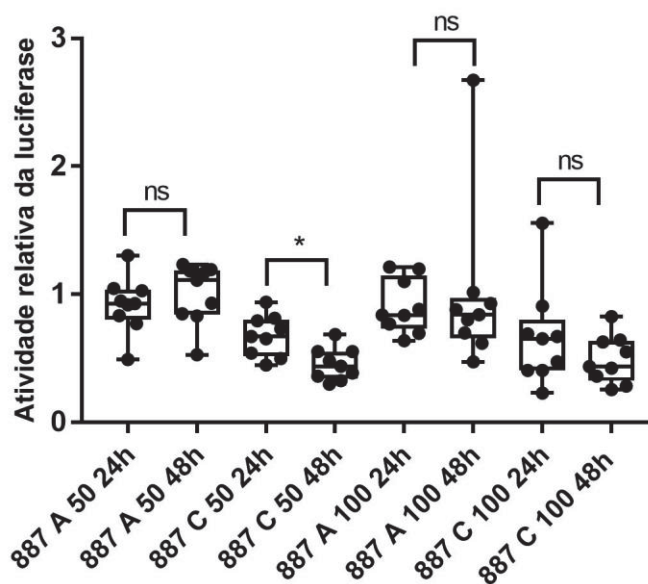
Comparação após 24 e 48h de tranfecção - miRNA mimic miR-191-5p



Comparação da atividade relativa da expressão da luciferase após 24 e 48h de co-transfecção de 50 e 100 nM do miRNA *mimic* 191-5p. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima) e em relação ao respectivo controle negativo. 191: miRNA *mimic* 191-5p; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; $*p<0.05$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 35 – ATIVIDADE RELATIVA DA LUCIFERASE 24 e 48h APÓS TRANSFEÇÃO DE 50 E 100 nM DO miRNA *MIMICS* miR-887-3p

Comparação após 24 e 48h de tranfecção - miRNA mimic miR-887-3p



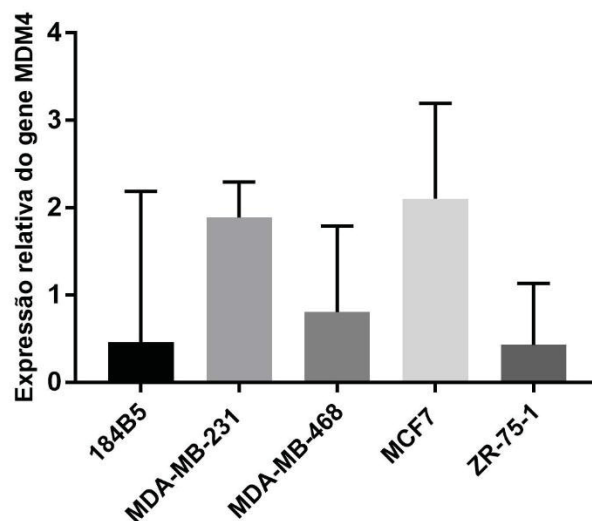
Comparação da atividade relativa da expressão da luciferase após 24 e 48h de co-transfecção de 50 e 100 nM do miRNA *mimic* 887-3p. Cada ponto no gráfico representa a mediana da triplicata técnica para a atividade da luciferase após normalização dos valores de luminescência de *firefly/Renilla* seguida pela normalização em relação ao vetor vazio (luminescência máxima) e em relação ao respectivo controle negativo. 191: miRNA *mimic* 191-5p; 887: miRNA *mimic* 887-3p; A: vetor pmirGLO-MDM4_739A; C: vetor pmirGLO-MDM4_739C; 50: 50 nM; 100: 100 nM; ns: não significativo; * $p < 0.05$. FONTE: O autor (2020).

6.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO

A expressão do gene *MDM4* sem a transfecção de miRNA *mimic* foi avaliada em 5 linhagens diferentes, com o intuito de se observar se este gene se apresenta expresso em todas elas. Observou-se a presença de mRNA de *MDM4* tanto na linhagem normal de mama quanto nas quatro linhagens tumorais testadas (FIGURA 36).

FIGURA 36 – EXPRESSÃO DO GENE *MDM4* EM LINHAGENS NÃO TUMORAL E TUMORAIS DE MAMA SEM TRANSFEÇÃO

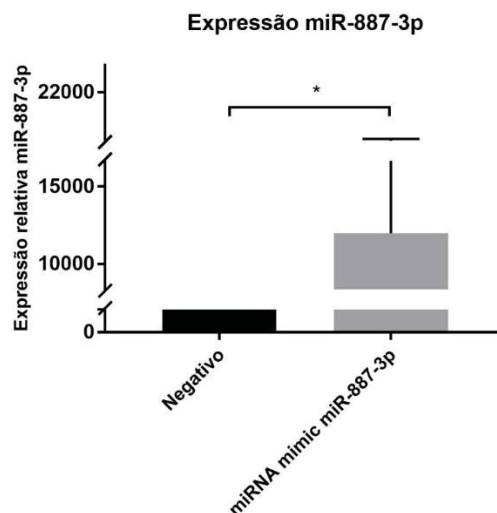
Expressão *MDM4* em linhagens celulares sem transfecção



Expressão relativa do gene *MDM4* na linhagem não tumoral 184B5 e nas linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 E ZR-75-1) sem transfecção. FONTE: O autor (2020).

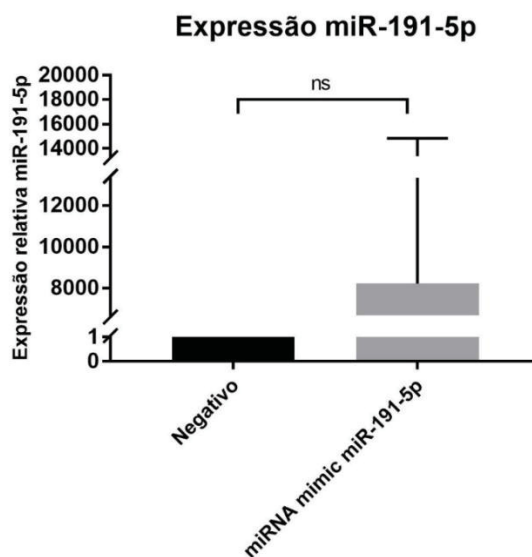
A quantificação dos miRNAs 887-3p e 191-5p após 24h de transfecção com 100 nM dos miRNAs *mimics* foi realizada com o objetivo de verificar o aumento de sua concentração e a eficiência da transfecção. Os valores de *fold change* e média de *fold change* das células transfectadas com o miRNA *mimic* miR-887-3p aumentaram significativamente quando comparados as células transfectadas com o miRNA controle negativo ($p=0,0131$) (FIGURA 37). Porém, apesar do aumento de *fold change* nas células transfectadas com o miRNA *mimic* miR-191-5p a diferença não foi significativa na comparação com o controle negativo ($p=0,0735$) (FIGURA 38).

FIGURA 37 – EXPRESSÃO DO miRNA miR-887-3p APÓS TRANSFECÇÃO DO *MIMIC*



Expressão relativa do miRNA miR-887-3p após 24h de transfecção de 100 nM do miRNA *mimic* 887-3p. Negativo: miRNA controle negativo; * $p < 0.05$. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 38– EXPRESSÃO DO miRNA miR-191-5p APÓS TRANSFECÇÃO DO *MIMIC*

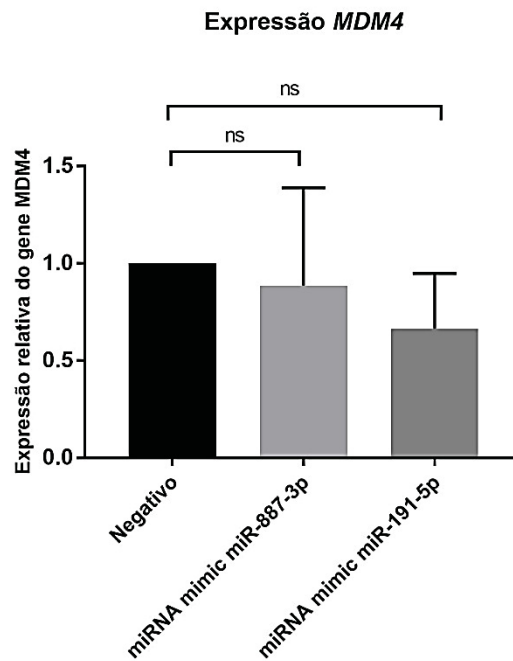


Expressão relativa do miRNA miR-191-5p após 24h de transfecção de 100 nM do miRNA *mimic* 191-5p. Negativo: miRNA controle negativo; ns: não significativo. FONTE: O autor (2020).

A transfecção com o miRNA *mimic* 887-3p reduziu a expressão do gene *MDM4* em 11,5% enquanto o miRNA mimetizador endógeno 191-5p reduziu em 33,7% a expressão de *MDM4* em comparação ao controle negativo. Porém, a

redução da expressão não foi estatisticamente significativa na comparação com o controle para ambos os *mimics* (FIGURA 39).

FIGURA 39 – EXPRESSÃO DO GENE *MDM4* APÓS TRANSFEÇÃO COM OS *MIMICS* *miR-887-3p* E *miR-191-5p*



Expressão relativa do gene *MDM4* após 24h de transfecção de 100 nM dos *miRNAs mimics* *miR-887-3p* e *miR-191-5p*. Negativo: *miRNA* controle negativo; ns: não significativo. FONTE: O autor (2020).

7 DISCUSSÃO

Variantes genéticas como os SNPs podem ocorrer em regiões codificantes ou não-codificantes do genoma. Entre as regiões não codificantes estão as regiões 5' ou 3' não traduzidas (UTR, untranslated region) (GOULART et al, 2015; DENG et al., 2017; KARIMZADEH et al., 2020). O efeito da variação nestas regiões é de grande importância devido ao seu papel regulatório no controle da tradução. A região 3'UTR está relacionada a poliadenilação, controle da degradação do mRNA, localização celular e eficiência da tradução. A presença de SNPs nessa região pode apresentar consequência funcional, uma vez que apresentam sítio de ligação para miRNA, influenciando na estabilidade e expressão do mRNA. Tais variantes podem modificar vias de sinalização e alterar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento tumoral (DENG et al., 2017).

Um dos mecanismos responsáveis por esse impacto funcional de SNPs na região 3'UTR ocorre devido a criação de novos sítios de ligação ao permitir regiões de complementariedade entre esses sítios e miRNAs, ou de modo contrário, ao modificar esses sítios e impedir ou enfraquecer a ligação de miRNAs (ZIERBASRTH et al., 2019). Como consequência, em geral, a expressão do gene e a proteína codificada por esse mRNA tem seus níveis alterados (CHEN *et al.*, 2008). O efeito de miRSNPs em relação a expressão do mRNA tem sido investigado em vários tipos de câncer.

A relevância de miRSNPs em câncer de mama já foi demonstrada em vários trabalhos, entre eles no estudo caso-controle realizado por Cao *et al.* (2016). O alelo C do SNP rs15869 em 3'UTR de *BRCA2* está associado com maior risco ao câncer de mama. Este SNP está situado no sítio de ligação para o miR-627, que foi capaz de promover a diminuição da expressão de *BRCA2* nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, indicando sua regulação dependente de SNP. Dessa forma, variantes genéticas podem interferir na regulação da expressão gênica e modificar o risco ao desenvolvimento de doenças, entre elas o câncer.

Sabendo-se da relevância da regulação gênica exercida por miRNAs dependente de polimorfismos em seus sítios alvos, este trabalho teve como

objetivo validar a análise de predição *in silico* que apontou a ligação do miRNA-887-3p e 191-5p a sequência 3'UTR de *MDM4* na presença da variante C do SNP rs4245739. Esta variação cria um sítio de ligação para esses miRNAs, que de modo contrário, na presença do alelo A não se ligariam. Diversos estudos caso-controle demonstraram a associação desse SNP com o risco de vários tipos de câncer, (STEGEMAN *et al.*, 2015; WYNENDAELE *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2013; GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2015; GANSMO *et al.*, 2016) entre eles o de mama (LIU *et al.*, 2013; GANSMO *et al.*, 2015; PEDRAM *et al.*, 2016; HASHEMI *et al.*, 2018).

Com o objetivo de identificar e validar experimentalmente os alvos preditos *in silico*, os ensaios de gene repórter têm sido amplamente utilizados, entre eles o ensaio de luciferase (AMIRKHAH *et al.*, 2017; ANKASHA *et al.*, 2018). A vantagem desse método é que permite confirmar a interação direta entre o miRNA e o sítio de ligação no alvo predito. Nessa abordagem a região 3'UTR contendo o sítio alvo de ligação predito para o miRNA é clonado à jusante da ORF do gene repórter – *firefly* luciferase (HUANG *et al.*, 2010; RITCHIE, RASKO, FLAMANT, 2012; ALVAREZ, 2014). A luminescência emitida na reação permite avaliar a interação entre o miRNA específico e seu alvo, visto que o miRNA atua como regulador pós-transcricional e bloqueia a tradução do mRNA (HUANG *et al.*, 2010; TOMASELLO, CLUTS, CROCE, 2019).

Os ensaios de luciferase foram realizados inicialmente com o pre-miR-887 obtido por transcrição *in vitro*. Essa metodologia foi proposta como alternativa ao uso de miRNA *mimic* comercial devido ao alto custo dessas moléculas. O pre-miR-887 foi gerado a partir do anelamento de oligonucleotídeos que contêm a sequência do miRNA precursor e a sequência promotora da T7 polimerase para permitir a transcrição. Essa estratégia baseia-se na capacidade da célula de transformar o pre-miR transfectado no miRNA maduro que se liga ao sítio alvo no mRNA. A transcrição *in vitro* é um método simples para obtenção de RNA a partir do anelamento de oligonucleotídeos contendo a sequência do promotor da T7 polimerase seguida pela região de interesse. A composição de bases dos sítios +1 e +2 são fatores críticos para uma transcrição eficiente, sendo necessária a presença de uma G (guanina) na posição +1 (BECKERT, 2010; LU, 2012). O oligonucleotídeo usado como molde para a reação obedece a essa condição. Contudo, a concentração dos componentes, o tempo de reação,

temperatura e a purificação do pre-miR podem interferir na quantidade e na qualidade do RNA obtido (BECKERT, 2010; KANWAL, 2018). As quantidades de pre-miR transfectadas foram menores (pmol) em comparação a quantidade de *mimic* (nM) utilizada. Isso deve-se a capacidade limitante de cada reação de transcrição *in vitro* em converter o molde de DNA em RNA. Além disso, quando foi realizada a transfecção de uma concentração maior do pre-miR – 40 pmol- observou-se que as células em cultivo entraram em morte celular, indicando toxicidade às células possivelmente devido as impurezas resultantes da purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1, pH 4,7) pós transcrição *in vitro*. Nesse trabalho, a sequência de RNA obtida no processo de transcrição *in vitro* não foi verificada a fim de observar se há alguma modificação que pudesse interferir na ligação específica a sequência 3'UTR predita como alvo. O pre-miR-887 sintetizado não foi capaz de se ligar ao sítio alvo presente no vetor, ou ainda em algumas condições foi capaz de se ligar em ambos os alelos – A ou C - avaliados nesse estudo indicando uma ligação não específica (FIGURAS 20-25). Nesse contexto, o sequenciamento do oligonucleotídeo utilizado como pre-miR poderia auxiliar na análise da sequência obtida.

A partir dos resultados dos ensaios de luciferase obtidos nesse trabalho observou-se que a metodologia de transcrição *in vitro* para obtenção do pre-miR não foi eficiente. A leitura de luminescência obtida nos ensaios com a transfecção do pre-miR-887 variaram bastante, e não apresentaram um padrão de resposta. Várias dificuldades e limitações da técnica possivelmente influenciaram nesse resultado, como: a variação na quantidade e da fidelidade da sequência entre as moléculas de pre-miR-887 usado em cada um dos ensaios de transfecção e obtido em cada uma das reações de transcrição *in vitro*; a possível degradação do pre-miR durante o processo de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1, pH 4,7); impurezas decorrentes do processo de transcrição *in vitro* e purificação que podem ter sido transfectadas junto com o pre-miR; a capacidade da célula em transformar a molécula precursora (pre-miR) em miRNA maduro capaz de se ligar ao sítio alvo presente no vetor com o gene repórter da luciferase. Portanto, até o momento não foi possível padronizar essa técnica como metodologia alternativa aos mimetizadores de RNA a ser utilizada nos ensaios de transfecção.

Uma vez que os ensaios de luciferase com transfecção do pre-miR-887

transcritos *in vitro* não foram capazes de avaliar a ligação do miRNA ao sítio 3'UTR do gene alvo de maneira eficiente optou-se pela utilização dos miRNAs *mimics*. O ensaio de luciferase demonstrou a ligação dos miRNAs *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p ao constructo pmirGLO-MDM4_739C contendo o alelo C no sítio de ligação 3'UTR clonado *downstream* ao gene repórter, confirmando a predição *in silico*. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que também demonstraram a ligação de ambos os miRNAs, 887 e 191-5p, ao sítio 3'UTR de *MDM4* na presença do alelo C em linhagens de câncer de próstata (STEGEMAN *et al.*, 2015) e de células pequenas de pulmão (GAO *et al.*, 2015) e do miR-191 em linhagem de câncer de ovário (WYNENDAELE *et al.*, 2010). Nesse trabalho a região 3'UTR contendo o alelo predito para ligação que foi inserida no vetor contendo o gene repórter e utilizado no ensaio de luciferase é maior (393 pb) do que o fragmento utilizado em outros trabalhos. No estudo conduzido por Stegeman *et al.* (2015) para observar a ligação dos mesmos miRNAs avaliados nesse trabalho ao alelo C do SNP rs4245739 de *MDM4*, o vetor repórter foi construído utilizando uma sequência menor da região 3'UTR. A inserção de uma sequência maior pode ser melhor comparada a regulação que ocorre na região 3' UTR do gene e permite avaliar a influência da região em torno do sítio de ligação para o miRNA.

A comparação das mesmas concentrações de *mimics* transfectadas com os diferentes vetores pmirGLO-MDM4_739A e pmirGLO-MDM4_739C demonstrou uma ligação alelo-específica, com redução da atividade da luciferase na presença da variante C. Assim, é possível afirmar que nas condições testadas os miRNAs 887-3p e 191-5p ligam-se ao sítio alvo 3'UTR de *MDM4* de uma maneira dependente do SNP rs4245739*C. Além disso, a ligação dos miRNAs *mimics* não é dependente da concentração transfectada neste estudo, uma vez que as duas concentrações testadas – 50 e 100 nM - apresentaram o mesmo padrão de ligação dependente apenas do inserto.

Apesar deste ensaio ser muito utilizado em estudos de validação da interação miRNA:mRNA ainda não havia sido realizado no departamento de genética da UFPR, sendo a primeira vez executado nesse trabalho. Portanto, o estabelecimento de cada uma das etapas e a padronização da técnica nesse trabalho foram de grande importância, permitindo que outros trabalhos utilizem essa metodologia.

O método de transfecção transiente de miRNA *mimics* permite avaliar os efeitos do miRNA sobre o mRNA alvo e elucidar seu modo de ação, de modo eficiente em células em cultivo. Porém, há estudos que questionam a equivalência dos efeitos entre os miRNAs mimetizadores e dos miRNAs endógenos em condições fisiológicas. Além da transposição dos efeitos *in vitro* e em *in vivo*, outros fatores relacionados ao uso de mimetizadores endógenos são discutidos, como a concentração utilizada, o acúmulo e surgimento de outras moléculas de RNA e as alterações no nível de expressão do gene alvo (JIN *et al.*, 2015). Jin *et al.* (2015) avaliaram de maneira ampla esses diferentes aspectos através da transfecção de diferentes miRNAs *mimics* em linhagens celulares. Os autores apontaram que a transfecção de grandes quantidades de mimetizadores endógenos pode levar a morte celular e tornar as células inviáveis, além de levar a alterações não-específicas (*off-target*) na expressão gênica, enquanto baixas concentrações não são capazes de reprimir a expressão do gene alvo. Neste trabalho, foram testadas duas concentrações diferentes – 50 e 100 nM- que são usualmente utilizadas em outros estudos e o ensaio de luciferase para verificar a ligação dos miRNAs preditos a região 3'UTR do alvo não apresentou resposta dose-dependente. A análise de expressão do gene *MDM4* foi realizada 24h após a transfecção com ambos os miRNAs *mimics*. O ensaio realizado nessa condição deve ser capaz de promover a regulação do gene alvo, uma vez que conforme citado por Jin *et al.* (2015) o tempo médio de meia-vida de miRNAs *mimics* transfectados na concentração de 100 nM é de 28h.

A avaliação do mecanismo de regulação dos miRNAs sobre *MDM4* foi realizada por meio de transfecção de miRNA *mimics* na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 pois esta linhagem possui o genótipo CC para o SNP rs4245739 o que possibilita a ligação ao gene alvo expresso pela célula. A transfecção com os miRNA *mimics* 887-3p e 191-5p resultou em redução do *fold change* da expressão do gene alvo, porém esta diferença não foi significativa em relação a transfecção com o miRNA controle negativo. A regulação do gene *MDM4* mediada por estes miRNAs pode estar ocorrendo principalmente por meio da repressão da tradução ao invés da degradação do mRNA sem provocar alteração significativa de seus níveis. Da mesma forma, Stegeman *et al.* (2015) também não observaram mudança nos níveis de mRNA de *MDM4* após a superexpressão dos miRNAs 887-3p e 191-5p na linhagem de câncer de

próstata PC3, sugerindo a inibição da tradução mediada por estes miRNAs. A ausência de alteração nos níveis de mRNA após transfecção já foi observada em outros trabalhos (KIM *et al.*, 2017; OSTADRAHIMI *et al.*, 2018; DLUZEN *et al.*, 2014; OLSEN, AMBROS, 1999; SEGGERSON, TANG, MOSS, 2002).

Classicamente, a análise da expressão de miRNAs por RT-qPCR é feita com a estratégia de sondas *TaqMan*, mas que apresentam custo elevado. Neste trabalho, implementou-se uma opção mais econômica onde, para cada miRNA, três oligonucleotídeos são desenhados, com as reações de qPCR sendo realizadas com o reagente SYBR®. Para a síntese de cDNA por meio de transcrição reversa, foram desenhados primers RT *stem-loop* que permitem selecionar o miRNA de interesse entre o RNA total contribuindo com a especificidade do método. Na qPCR o primer *forward* é específico ao miRNA de interesse e o primer *reverse* universal é complementar ao primer RT *stem-loop*. Essa metodologia já foi utilizada em outros estudos para quantificar a expressão de pequenos RNAs de maneira eficiente (ANDROVIC *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2005; VARKONYI-GASIC *et al.*, 2007; MOHAMADI-YAGANEH *et al.*, 2013; TONG *et al.*, 2015; LAN *et al.*, 2019; FORERO *et al.*, 2019). Essa foi a primeira vez em que essas metodologias alternativas ao protocolo convencional foram utilizadas no nosso grupo de pesquisa. A especificidade da amplificação observada pelo único pico na curva de *melt* (FIGURAS 1 E 2 - APÊNDICE), e os resultados obtidos nesse trabalho permitiram padronizar essa metodologia em nosso laboratório como alternativa a ser utilizada em outros estudos para a avaliação da expressão de miRNAs.

A correlação entre os níveis de mRNA e proteína são discutidos em vários trabalhos, assim como o mecanismo predominante de regulação da expressão gênica mediado por miRNAs. Não há consenso sobre essa questão, alguns estudos apontam que a degradação do mRNA alvo ocorre em detrimento da inibição da tradução, enquanto outros destacam esse último como efeito predominante da ação dos miRNAs (HUNTZINGER, IZAURRALDE, 2011; JONAS, IZAURRALDE, 2015; PAYNE, 2015). A importância do processo de regulação por repressão da tradução foi destacada por Larsson *et al.* (2013) que reanalisaram um conjunto de dados de GWAS (Guo *et al.*, 2010) e apontaram que a contribuição da repressão da tradução de um subconjunto de alvos foi subestimada. A repressão da tradução ocorre antes do processo de

deadenilação e decaimento do mRNA que resulta na degradação do mRNA (DJURANOVIC, NAHVI, GREEN, 2012; HENDRICKSON *et al.*, 2009). A inibição da tradução pode ocorrer num estágio de iniciação ou no estágio pós-iniciação (KIRIAKIDOU *et al.*, 2007; GU, KAY, 2010). Muitos trabalhos apontam que este processo ocorre no início da tradução com diferentes resultados sobre o envolvimento da subunidade 43S do ribossomo, da proteína GW182; e a dependência da atividade do fator eIF4A e da estrutura secundária da região 5'UTR (GU, KAY, 2010; HUNTZINGER, IZARRALDE, 2011; RICCI *et al.* 2013; NISHIMURA, FABIAN, 2016). A eficiência da tradução também é um ponto chave na repressão da tradução mediada por miRNAs, e influenciada por características da região 5'UTR e 3'UTR que afetam a ligação de fatores regulatórios *cis* e *trans* (COTTRELL, SZCZESNY, DJURANOVIC, 2017). A ocorrência de polimorfismos na região 3'UTR próxima ao sítio de ligação de miRNA pode alterar a estrutura secundária do RNA e interferir na acessibilidade e interação entre miRNA e o complexo RISC (VODICKA *et al.*, 2016). A presença do SNP rs4245739 3'UTR de *MDM4* avaliado nesse trabalho não altera a estrutura secundária dessa região e a mesma energia mínima livre (MFE) para ambos os alelos foi observada, conforme análise pela ferramenta RNAfold (FIGURAS 3 e 4 APÊNDICE). A análise foi realizada com uma sequência de 56 pb da região 3'UTR do gene *MDM4*.

A presença do SNP rs4245739 na região 3'UTR de *MDM4* cria um sítio de ligação para os miRNAs 887-3p e 191-5p. Na análise realizada nesse trabalho esses foram os dois miRNAs que apresentaram o maior *score* associado a predição (QUADRO 1). Porém, outros miRNAs que apresentam uma região de complementariedade com *MDM4* poderiam competir pelo sítio de ligação 3'UTR de uma maneira dependente de sua expressão (BOSSON, ZAMUDIO, SHARP, 2014). Além disso, os miRNAs 887-3p e 191-5p avaliados, apresentam outros genes preditos como alvos, entre eles *PLD2*; e *TMOD2* e *TAF5*, respectivamente (TargetScan e miRDB). A regulação desses genes e a validade da interação já foi demonstrada (HU, 2014; FITE, GOMEZ-CAMBRONERO, 2016; MOHAMMADIPOOR-GHASEMABAD *et al.*, 2019). O gene *PLD2* foi apresentado como alvo da regulação pelo miRNA-887-3p nas linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 relacionados a transição epitélio-mesenquimal (FITE, GOMEZ-CAMBRONERO, 2016).

A relação entre a capacidade de repressão do miRNA ao seu alvo pode ser alterada pela mudança dessa razão miRNA:mRNA alvo, quando ocorre a superexpressão de ncRNAs que atuam como esponja – ceRNA (*competing endogenous RNA*), pois possuem alta afinidade de ligação por um determinado miRNA (Bosson, 2014). Dessa forma, a relação entre a afinidade de ligação, a estabilidade do pareamento com a região *seed*, o compartilhamento de um mesmo sítio de ligação por diferentes moléculas e a concentração do alvo são fatores importantes no mecanismo de ação do miRNA (DLUZEN *et al.*, 2014; BOSSON, ZAMUDIO, SHARP, 2014 ; SALMENA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2011).

Os miRNAs envolvidos no câncer podem ser classificados em dois grupos, de acordo com o seu alvo. miRNAs que tem como alvo oncogenes, atuam como supressores de tumor, enquanto aqueles que tem como alvo genes supressores de tumor tem um papel oncogênico. A ação desempenhada por cada miRNA depende do contexto celular, ou seja, depende de quais mRNAs alvos estejam presentes naquele tipo celular. Assim, um mesmo miRNA pode atuar como miRNA oncogênico ou supressor de tumor (LUO, CUI, CROCE, 2018; KARIMZADEH *et al.*, 2020). Por exemplo, os miR-221/222 exibem papel oncogênico em câncer de próstata, mama e carcinoma hepatocelular, porém atuam como supressores de tumor em carcinoma de células escamosas da língua (LUO, CUI, CROCE, 2018).

No câncer de mama muitos miRNAs têm sido identificados por atuar como oncogenes, entre eles, miR-20a, envolvido na proliferação celular e invasão; miR-21, que atua como antiapoptótico e miR-155 envolvido na transição epitelial-mesenquimal induzida por TGF-beta, migração e invasão. Entre aqueles que atuam como supressores de tumor, está o miR-206 que inibe crescimento celular, migração e invasão e induz apoptose (SERPICO, MOLINO, COSIMO, 2014; O'BRYAN *et al.*, 2017). Muitos miRNAs apresentam padrões de expressão relacionados ao subtipo molecular, status do receptor de estrogênio (ER), grau do tumor, presença de metástase, entre outros processos relacionados ao tumor (ALLEGRA *et al.* 2012). No presente trabalho foi possível observar a ligação dos miRNAs 887-3p e 191-5p de maneira dependente da presença da variante C do SNP rs4245739 na região 3'UTR de *MDM4*. Considerando que *MDM4* é um oncogene, os miRNAs 887-3p e 191-5p atuam como miRNAs supressores de

tumor (TS-miRNAs) em câncer de mama.

O gene TP53 é um supressor tumoral envolvido no reparo de danos ao DNA, promove parada do ciclo celular, interrompe a proliferação e induz apoptose. A proteína MDM4 é um regulador negativo e atua no controle dos níveis de p53 através do processo de poliubiquitinação, em conjunto com a proteína homóloga MDM2. Além disso, inibe a função de p53 como fator de transcrição ao interagir com a porção N-terminal. Portanto, a proteína MDM4 atua como oncoproteína, ao diminuir os níveis de p53. Dessa forma, a variante rs4245739 por estar presente na região 3'UTR do mRNA de MDM4 assume um impacto sobre a regulação dessa oncoproteína, que é capaz de interferir no controle supressor de tumor downstream da proteína p53.

O SNP rs4245739*C de MDM4 exibe um efeito supressor de tumor, pois tem a capacidade de interferir nos níveis da proteína p53 de maneira indireta. A ligação dos miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p ao mRNA de MDM4 podem levar à diminuição da expressão de MDM4, e conseqüente aumento da disponibilidade da proteína p53. Portanto, esse mecanismo de regulação de miRNAs sobre a oncoproteína MDM4 e p53 influenciado pela variante C do SNP rs4245739 pode explicar a associação desta variante com a proteção já evidenciada ao câncer de mama.

Muitos estudos têm empregado a abordagem de identificação de miRSNPs, seu efeito *eQTL* e a associação com o câncer identificando importantes alvos para validação funcional, visto que os miRNAs são reconhecidamente envolvidos na regulação de diversos genes que atuam nas vias associadas a tumorigênese e destacados como *hallmarks* do câncer. Porém, as análises de validação com miRNA apresentam diversos desafios. Diferentes tipos celulares apresentam padrão diferente de expressão de miRNAs. E o efeito do miRSNP sobre a regulação do gene alvo é dependente da expressão do miRNA. Além disso, ensaios de validação com miRNAs que utilizam mimetizadores endógenos ou inibidores com o objetivo de observar a função desses ncRNAs, apresentam dificuldades que incluem a metodologia para a quantificação dos miRNAs e a determinação do mecanismo regulatório sobre o alvo por meio da avaliação dos níveis de mRNA.

Esse trabalho por meio do ensaio luciferase foi capaz de validar a interação entre os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p e a região 3'UTR do gene

MDM4 de uma maneira dependente do alelo C do SNP rs4245739 que foi predita pela integração de dados e análise de bioinformática. Porém, o exato mecanismo de pelo qual esses miRNAs regulam o gene alvo *MDM4* não foi totalmente elucidado. A análise dos níveis da proteína MDM4 após transfecção com os miRNAs *mimics* através de *western blotting* permitirá sugerir o modo de ação dos miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p nessa via regulatória.

A validação dos alvos preditos pela análise de seleção de miRSNPs associados à risco aumentado de câncer de mama, permite que a mesma abordagem seja empregada para identificar possíveis candidatos em outros tipos tumorais ou mesmo em outras doenças complexas.

8 CONCLUSÃO

- Através deste trabalho foi possível observar a efetividade da metodologia utilizada para preconizar a escolha de genes candidatos para estudo no câncer de mama cuja região 3'UTR apresenta SNPs que são alvos de interação com miRNAs.
- Os ensaios luciferase demonstraram a ligação específica dos miRNAs mimics miR-887-3p e miR-191-5p a variante C do SNP rs4245739 na região 3'UTR do gene *MDM4* inserida no vetor repórter permitindo validar a predição obtida a partir da integração de dados de GWAS e miRSNPs no contexto de câncer de mama.
- Portanto, o SNP rs4245739 apresenta um impacto funcional, visto que modula a afinidade de ligação dos miRNAs 887-3p e 191-5p ao mRNA do oncogene *MDM4* de maneira dependente da variante A ou C.
- A metodologia para a realização do ensaio de gene repórter luciferase foi padronizada e poderá ser empregada em outros trabalhos no departamento que buscam validar a interação entre miRNA e mRNA.
- Os miRNAs miR-887-3p e miR-191-5p parecem regular a expressão de *MDM4* possivelmente através da inibição da tradução, pois os níveis de mRNA não apresentaram redução significativa após a transfecção dos miRNAs mimics. A avaliação dos níveis da proteína por *western blotting* permitirão elucidar esse mecanismo regulatório.
- A metodologia alternativa para avaliar a expressão de miRNAs através de transcrição reversa com primers RT-*stem loop* e qPCR com SYBR *green* foi eficiente e validada para ser utilizada em outros trabalhos do grupo de pesquisa visto que apresenta menor custo.

9 PERSPECTIVAS

- Verificar os níveis da proteína MDM4 após transfecção dos miRNAs *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p para elucidar o mecanismo regulatório desses miRNAs;
- Avaliar a expressão dos genes *TP53*, *p21* e *MDM2* após os ensaios de transfecção com os miRNAs *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p através de RT-qPCR;
- Determinar as isoformas do gene *MDM4* presentes nas linhagens tumorais de mama e se as mesmas sofrem variação com a transfecção dos *mimics* miR-887-3p e miR-191-5p;
- Avaliar os outros miRSNPs do gene *MDM4* e a interação com os miRNAs preditos *in silico*.

REFERÊNCIAS

- ABIDIN, S.Z. *et al.* In Silico Prediction and Validation of Gfap as an miR-3099 Target in Mouse Brain. *Neuroscience Bulletin*, v.33, p.373-382, 2017.
- AIELLO, N.M. *et al.* EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. *Developmental Cell*, v.45, p.681-695, 2018.
- AKHTAR, M.M. *et al.* Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Research*, v.44, p.24-44, 2016.
- ALLEGRA, A. *et al.* Circulating microRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (Review). *International Journal of Oncology*, v.41, p. 1897-1912, 2012.
- ALVAREZ, M.L. Faster Experimental Validation of microRNA Targets Using Cold Fusion Cloning and a Dual Firefly- Renilla Luciferase Reporter Assay. RNA Mapping: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, v.1182, p.227-243, 2014.
- AMIRKHAH, R. *et al.* Computational and Experimental Identification of Tissue-Specific MicroRNA Targets. MicroRNA Detection and Target Identification: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, v. 1580, p.127-147, 2017.
- ANDROVIC, P. *et al.* Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Research*, v.45, 2017.
- ANKASHA, S.J. *et al.* Post-transcriptional regulation of microRNAs in cancer: From prediction to validation. *Oncology Reviews*, v. 12, p.39-44, 2018.
- ANWAR, S.L; WULANINGSIH, W.; WATKINS, J. Profile of the breast cancer susceptibility marker rs4245739 identifies a role for miRNAs. *Cancer Biology and Medicine*, v. 14, p. 387-395, 2017.
- BARDOT, B.; TOLEDO, F. Targeting MDM4 splicing in cancers. *Genes*, v.8, 2017.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, v.116, p.281-297, 2004.
- BARTEL, F. *et al.* Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *International Journal of Cancer*, v.117, p.469-475, 2005.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, v.136, p. 215-233, 2009.
- BECKERT, B; MASQUIDA, B. Synthesis of RNA by in vitro transcription. RNA, *Methods in Molecular Biology*, v.703, p.29-41, 2011.

BELYSI, V.A. *et al.* The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, 2010.

BERTHEAU, P. *et al.* p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. **The Breast**, v.22, p.S27-S29, 2013.

BOSSON, A.D.; ZAMUDIO, J.R.; SHARP, P.A. Endogenous miRNA and Target Concentrations Determine Susceptibility to Potential ceRNA Competition. **Molecular Cell**, v.56, p.347-359, 2014.

BRAZDA, V.; COUFAL, J. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, 2017.

BROOKS, C.L.; GU, W. p53 regulation by ubiquitin. **FEBS Letters**, v.585, p.2803-2809, 2011.

CAO, J. *et al.* rs15869 at miRNA binding site in BRCA2 is associated with breast cancer susceptibility. **Med Oncol**, v.33, 2016.

CHAO, C.C-K. Mechanisms of p53 degradation. **Clinica Chimica Acta**, v.438, p.139-147, 2015.

CHEANG, M.C.U. *et al.* Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression. **The Oncologist**, v.20, p.474-482, 2015.

CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, 2005.

CHEN, K. *et al.* Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. **Carcinogenesis**, v.29, p.1306-1311, 2008.

CHEN, J. *et al.* *et al.* Evaluation of CpG-SNPs in miRNA promoters and risk of breast cancer. **Gene**, v. 651, p.1-8, 2018.

CHOO, K.B. *et al.* MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. **Journal of Biomedical Science**, v.21, p.1-14, 2014.

CIPOLLINI, M.; LANDI, S. GEMIGNANI, F. MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v.7, p.173-191, 2014.

COTTRELL, K.; SZCZESNY, P.; DJURANOVIC. Translation efficiency is a determinant of the magnitude of miRNA-mediated repression. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

CROCE, C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.704-714, 2009.

DALMAY, T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. **Essays Biochem**, v.54, p.29-38, 2013.

- DAVIS, B.N.; HATA, A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. **Cell Communication and Signaling**, v.7, 2009.
- DEMIR, O.; IEONG,P.U; AMARO, R.E. Full-length p53 tetramer bound to DNA and its quaternary Dynamics. **Oncogene**, v.36, p.1451-1460, 2017.
- DENG, T. *et al.* Obesity, inflammation, and cancer. **Annual Review of Pathology**, v.11, p. 421-449, 2016.
- DJURANOVIC, S.; NAHVI, A.; GREEN, R. miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay. **Science**, v.336, p.237-240, 2012.
- DLUZEN, D.F. *et al.* Regulation of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Expression and Activity by MicroRNA 491-3p. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.348, p.465-477, 2014.
- DUFFY, M.J.; SYNNOTT, N.C.; CROWN, J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 170, p.213-219, 2018.
- ELLIS, I.O. *et al.* Pathological prognostic factors in breast cancer. II.Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.20, p.479-489, 1992.
- ELLISEN, L. W.; HABER, D. A. Basic principles of cancer genetics. Principles of Clinical Cancer Genetics: A Handbook from the Massachusetts General Hospital. [S.l: s.n.], 2010. p. 1–22.
- ELSTON, CW; ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with longterm follow-up. **Histopathology**, v.19, p.403-410, 1991.
- EROLE, P. *et al.* Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v.38, p.698-707, 2012.
- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p.861-874, 2011.
- FANG, L. *et al.* Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v.40, p. 1624-1630, 2017.
- FITE, K.; GOMEZ-CAMBRONERO, J. Down-regulation of MicroRNAs (MiRs) 203, 887, 3619 and 182 Prevents Vimentin-triggered, Phospholipase D (PLD)-mediated Cancer Cell Invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p.719-730, 2016.
- FORERO, D.A. *et al.* qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs, **BioTechniques**, v.67, p.192-199, 2019.

- FORMA, E. *et al.* Association between the c.*229C.T polymorphism of the topoisomerase II β binding protein 1 (TopBP1) gene and breast cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p.3493–3502, 2013.
- GANSMO, L.B. *et al.* MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. **Cancer Medicine**, v.4, p. 1901–1907, 2015.
- GANSMO, L.B. *et al.* The MDM4 SNP34091 (rs4245739) C-allele is associated with increased risk of ovarian—but not endometrial cancer. **Tumor Biology**, v.37, p. 10697–10702, 2016.
- 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**, p.1-10, 2015.
- GARCIA, D.M. *et al.* Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *Isy-6* and other microRNAs. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.18, p.1139-1147, 2011.
- GARCIA-CLOSAS, M. *et al.* Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. **Nature Genetics**, v.45, p. 392–398, 2013.
- GILKES, D.M. *et al.* Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, p.1999-2010, 2008.
- GOLDHIRSCH, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v.24, p.2206-2223, 2013.
- GREENBLATT, M.S. *et al.* Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. **Cancer Research**, v.54, p.4855-4878, 1994.
- GU, S.; KAY, M.A. CHomomwen tdaryo miRNAs mediate translational repression? **Silence**, 2010.
- HA, M.; KIM, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, p.509-524, 2014.
- HAMZEIY, H; ALLMER, J.; YOUSEF, M. Computational Methods for MicroRNA Target Prediction. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, **Methods in Molecular Biology**, v.1107, p.207-221, 2013.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HASHEMI, M. *et al.* Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the *MDM4* Gene With the Susceptibility to Breast Cancer in a Southeast Iranian Population Sample. **Clinical Breast Cancer**, v.18, 2018.

HAUPT, S; HAUPT, Y. P53 at the start of the 21st century: lessons from elephants. **F100 Research**, v.6, 2017.

HAUPT, S. *et al.* The long and the short of it: the MDM4 tail so far. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.11, p.231-244, 2019.

HENDRICKSON, D.G. *et al.* Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA. **Plos Biology**, v.7, 2009.

HIENTZ, K. *et al.* The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. **Oncotarget**, v.8, p.8921-8946.

HUANG, Y. *et al.* A study of miRNAs targets prediction and experimental validation. **Protein & Cell**, v.11, p.979–986, 2010.

HUANG, Y.; CHUANG, A.Y.; RATOVITSKI, E.A. Phospho- δ Np63 α /miR-885-3p axis in tumor cell life and cell death upon cisplatin exposure. **Cell Cycle**, v.10, p.3938-3947, 2011.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p.99-110, 2011.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde, 2020.

INOUE, K.; FRY, E.A., FRAZIER, D.P. Transcription factors that interact with p53 and Mdm2. **International Journal of Cancer**, v.138, p.1577-1585, 2016.

IWAKAWA, H.; TOMARI, Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. **Trends in Cell Biology**, 2015.

JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v.16, p.421-433, 2015.

JIANG, Y. *et al.* Genetic variation in a hsa-let-7 binding site in RAD52 is associated with breast cancer susceptibility. **Carcinogenesis**, v.34, p.689–693, 2013.

JIN, H, Y *et al.* Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. **Frontiers in Genetics**, v.6, 2015.

- JIN, X. *et al.* The role of MDM4 SNP 34091 A>C polymorphism in cancer: a meta-analysis on 19,328 patients and 51,058 controls. **The International Journal of Biological Markers**, v.32, 2017.
- KAMADA, R. *et al.* Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. **Biopolymers**, v.106, p.598-612, 2016.
- KANWAL, F. *et al.* Large-Scale in Vitro Transcription, RNA Purification and Chemical Probing Analysis. **Cell Physiol Biochem**, v.48, p.1915-1927, 2018.
- 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, J. *et al.* miR-221 regulates CD44 in hepatocellular carcinoma through the PI3K-AKT-mTOR pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.487, p.709-715, 2017.
- KIRIAKIDOU, M. *et al.* : An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. **Cell**, v. 129, p.1141-1151, 2007.
- KON, N. *et al.* Inhibition of Mdmx (Mdm4) in vivo induces anti-obesity effects. **Oncotarget**, v. 9, p.7282-7297, 2018.
- KUHN, D.E. *et al.* Experimental validation of miRNA targets. **Methods**, v. 44, p. 47–54, 2008.
- KWON, S.K; SAINDANE, M.; BAEK, K.H. p53 stability is regulated by diverse deubiquitinating enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v.1868, p.404-411, 2017.
- LAN, L. *et al.* Linear-hairpin variable primer RT-qPCR for MicroRNA. **Chemical Science**, v.10, p.2034-2043, 2019.
- LARREA, E. *et al.* New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, 2016.
- LARSSON, O; NADON, R. Re-analysis of genome wide data on mammalian microRNA-mediated suppression of gene expression. **Translation**, 2013.
- LAURIE, N.A. *et al.* Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. **Nature**, v.444, p.61-66, 2006.
- LE, M.T. *et al.* MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. **Genes & Development**, v.23, p.862–876, 2009.
- LENOS, K. *et al.* Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. **Cancer Research**, v.72, p.4074-4084, 2012.

LIAN, T. *et al.* The associations between MDM4 rs4245739 A>C polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. v.12, p.10411-10421, 2019.

LINARES, L.K. *et al.* HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. **PNAS**, v. 100, p. 12009–12014, 2003.

LIN, J. *et al.* A miR-SNP biomarker linked to an increased lung cancer survival by miRNA-mediated down-regulation of FZD4 expression and Wnt signaling. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

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, p. 661-671, 2012.

LIU, L. *et al.* S-MDM4 mRNA overexpression indicates a poor prognosis and marks a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Science**, v.103, p.2056-2063, 2012.

LIU, J. *et al.* Functional MDM4 rs4245739 genetic variant, alone and in combination with P53 Arg72Pro polymorphism, contributes to breast cancer susceptibility. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.140, p.151–157, 2013.

LIU, Z. *et al.* A functional variant at the miR-184 binding site in TNFAIP2 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, v.32, p-1668-1674, 2011.

LIU, J. *et al.* MicroRNA Control of p53. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.118, p.7-14, 2016.

LU, C.; LI, P. Preparation of short RNA by in vitro transcription. Recombinant and In Vitro RNA Synthesis: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**, v.941, p.56-68, 2012.

LUO, Z.; CUI, R.; TILI, E.; CROCE, C. Friend or Foe: MicroRNAs in the p53 network. **Cancer Letters**, v.419, p.96-102, 2018.

MANSOUR, M.A. Ubiquitination: Friend and foe in cancer. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.101, p.80-93, 2018.

MARKEY, M.P. Regulation of MDM4. **Frontiers in Bioscience**. v.16, p. 1144-1156, 2011.

MARTINEZ-SANCHEZ, A.; MURPHY, C.L. MicroRNA Target Identification Experimental Approaches. **Biology**, v.2, p. 189-205, 2013.

MATAMALA, N. *et al.* Tumor MicroRNA Expression Profiling Identifies Circulating MicroRNAs for Early Breast Cancer Detection. **Clinical Chemistry**, v.61, p.10981106, 2015.

McEVOY, J. *et al.* Analysis of MDM2 and MDM4 single nucleotide polymorphisms, mRNA splicing and protein expression in retinoblastoma. **PLoS One**, v.7, 2012.

McGUIRE, A.; BROWN, J.A.L.; KERIN, M.J. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.34, p. 145–155, 2015.

MEEK, D.W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. **Biochemical Journal**, v.469, p.325-346, 2015.

MENDOZA, M.; MANDANI, G.; MOMAND, J. The MDM2 gene family. **Biomolecular Concepts**, v.5, p. 9–19, 2014.

MERKEL, O. *et al.* When the guardian sleeps: Reactivation of the p53 pathway in cancer. **Mutation research**, v.773, 2017.

miRIAD – integrating microRNA Inter- And intragenic Data. Ludwig Christian Hinske, Hugo A. M. Torres, Camila M. Lopes-Ramos, Jens Heyn, Lucila Ohno-Machado, Simone Kreth, Pedro A. F. Galante. Disponível em: <<http://bmi.ana.med.unimuenchen.de/miriad/miRNA/human/hsa-mir-887/>> Acesso em: 30 ago. 2018

MOHAMMADIPOOR-GHASEMABAD, L. *et al.* Hippocampal microRNA-191a-5p Regulates BDNF Expression and Shows Correlation with Cognitive Impairment Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. **Neuroscience**, v.414, p.49-59, 2019.

MOHAMMADI-YEGANEH, S, *et al.* Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis. **Molecular Biology Reports**, v.40, p.3665-3674, 2013.

MOSZYNSKA, A. *et al.* SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. **Open Biology**, v.7, 2017.

MULRANE, L. *et al.* miRNA Dysregulation in Breast Cancer. **Cancer Research**, v.73, p.6554-6562, 2013.

NANA-SINKAM, S.P; CROCE, C.M. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.93, p.98-104, 2013.

NEWMAN, B. *et al.* Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. **Jama**, v. 279, p.915–921, 1998.

NIAZI, S.; PUROHIT, M.; NIAZI, J. Role of p53 circuitry in tumorigenesis: A brief review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.158, p.7-24, 2018.

NISHIMURA, T.; FABIAN, M. Scanning for a unified model for translational repression by microRNAs. **The EMBO Journal**, v.35, p.1158-1159, 2016.

O'BRYAN, S. *et al.* The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v.72, p.1-11, 2017.

OLSEN, P.H; AMBROS, V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. **Developmental Biology**, v.216, p.671–680, 1999.

OSTADRAHIMI, S. *et al.* miR-1266-5p and miR-185-5p Promote Cell Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell Lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.19, p.2305-2311, 2018.

OULAS, A *et al.* Prediction of miRNA Targets. RNA Bioinformatics, **Methods in Molecular Biology**, v. 1269, p.207-229, 2014.

OVCHARENKO, D. *et al.* miR-10a overexpression is associated with NPM1 mutations and MDM4 downregulation in intermediate-risk acute myeloid leukemia. **Experimental Hematology**, v.39, p.1030–1042, 2011.

OZAWA,P.M.M. *et al.* Identification of miRNAs Enriched in Extracellular Vesicles Derived from Serum Samples of Breast Cancer Patients. **Biomolecules**, v.10, 2020.

PALANICHAMY, J.K; RAO, D.S. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. **Frontiers in genetics**, v.5, 2014.

PANT, V. *et al.* Tumorigenesis promotes Mdm4-S overexpression. **Oncotarget**, v.8, p.25837-25847, 2017.

PASQUINELLI, A.E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. **Nature Reviews Genetics**, v.13, p.271-282, 2012.

PAYNE, S.H. The utility of protein and mRNA correlation. **Trends in Biochemical Sciences**, v.40, 2015.

PEDRAM, N. *et al.* Analysis of the Association between MDM4 rs4245739 Single Nucleotide Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility. **Clinical Laboratory**, v.62, p.1303-1308, 2016.

PEROU, C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, p.747-752, 2000.

PEROU, C.M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. **The Oncologist**, v.15, p. 39-48, 2010.

PETERSON, S.M. *et al.* Common features of microRNA target prediction tools. **Frontiers in Genetics Bioinformatics and Computational Biology**, v.5, 2014.

PIETSCH, E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v.25, p. 1602–1611, 2006.

PRAT, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, p.1-18, 2010.

PRAT, A.; PEROU, C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v.5. p.5-23, 2011.

PRAT, A. *et al.* Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like TripleNegative Breast Cancer. **The Oncologist**, v.18, p. 123-133, 2013.

QI, M. *et al.* UXT, a novel MDMX-binding protein, promotes glycolysis by mitigating p53-mediated restriction of NF- κ B activity. **Oncotarget**, v. 6, p.17584-17593, 2015.

RALAPALLI, R. *et al.* Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89, p.563-575, 2003.

RAVER-SHAPIRA,N. *et al.* Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. **Molecular Cell**, v. 26, p.731-743, 2007.

RICCI, E,P. *et al.* miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning. **Nucleic Acids Research**, v.41, p.586-598, 2013.

RITCHIE, W.; RASKO, J.E.J.; FLAMANT, S. MicroRNA Target Prediction and Validation. **Adv Exp Med Biol**, v.774, p.39-53, 2013.

RYAN, B.M; ROBLES, A.I; HARRIS, C.C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p.389-402, 2010.

SALZMAN, D.W., WEIDHAAS, J.B. SNPing cancer in the bud: MicroRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v.137, p.55-63, 2013.

SALMENA, L. *et al.* A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? **Cell**, v.146, p.353-358, 2011.

SAHA, T.; KAR, R.K.; SA, G. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.117, p.250-263, 2015.

SCHWARZENBACH, H. Clinical Relevance of Circulating, Cell-Free and Exosomal microRNAs in Plasma and Serum of Breast Cancer Patients. **Oncol Res Treat**, v.40, p. 423-429, 2017.

SEGGERSON, K.; TANG, L.; MOSS, E.G. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. **Developmental Biology**, v.243, p.215-225, 2002.

SERPICO, D., MOLINO, L., COSIMO, S. microRNAs in breast cancer development and treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, p.595-604, 2014.

SEVEN, M. *et al.* The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. **Future Oncology**, v.10, p.1027-1048, 2014.

SHADFAN, M.; LOPEZ-PAJARES, V.; YUAN, Z.M. MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53. **Translational Cancer Research**, v.1, p. 88-102, 2012.

SHEN, X. *et al.* MiR-370 promotes apoptosis in colon cancer by directly targeting MDM4. **Oncology Letters**, v.15, p.1673–1679, 2018.

SORLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.98, p.10869-10874, 2001.

SORLIE, T, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.100, p.8418-8423, 2003.

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

SUDA, T. *et al.* Rare MDM4 gene amplification in colorectal cancer: The principle of a mutually exclusive relationship between MDM alteration and TP53 inactivation is not applicable. **Oncology Reports**, v.26, P. 49-54, 2011.

SUN, E.-H. *et al.* Screening miRNAs related to different subtypes of breast cancer with miRNAs microarray. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.18, p.2783-2788, 2014.

SUNG, H. *et al.* Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival, **BMC Cancer**, v.12,2012.

SUNG, H. *et al.* Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and risk of breast cancer: A case-control study in Korea. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.130, p.939–951, 2011.

SWARBRICK, A. *et al.* miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN amplified neuroblastoma. **Nature Medicine**, v. 16, p.1134-1140, 2010.

SWETZIG, W.M.; WANG, J.; DAS, G.M. Estrogen receptor α (ER α /ESR1) mediates the p53-independent overexpression of MDM4/MDMX and MDM2 in human breast cancer. **Oncotarget**, v.7, p.16049–16069, 2016.

SYNNOTT, N.C. *et al.* Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? **International Journal of Cancer**, v.140, p.234–246, 2017.

TAHIRI, A.; AURE, M.R.; KRISTENSEN, V.N. MicroRNA Networks in Breast Cancer Cells. *Cancer Systems Biology: Methods and Protocols*. **Methods in Molecular Biology**, v.1711, p.55-81, 2018.

TARANG, S; WESTON, M.D. Macros in microRNA target identification. **RNA Biology**, v.11, p.324-333, 2014.

THERMO SCIENTIFIC. DoubleDigest Calculator-Thermo Scientific. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecularbiology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermoscientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>> Acesso em: 05 ago. 2018.

THUT, C.J; GOODRICH, J.A.; TIJAN, R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. **Genes & Development**, v.11, p.1974– 1986, 1997.

TOLEDO F., WAHL, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.909-923, 2006.

TOMASELLO, L.; CLUTS, L.; CROCE, C.M. Experimental Validation of MicroRNA Targets: Luciferase Reporter Assay. *MicroRNA Target Identification: Methods and Protocols*, **Methods in Molecular Biology**, vol. 1970, p.315-330, 2019.

TONG, L. *et al.* Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy. **Molecular Biotechnology**, v.57, p.939-946, 2015.

VARKONYI-GASIC, E. *et al.* Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, v.3, 2007.

VODICKA, P. *et al.* Polymorphisms in Non-coding RNA Genes and Their Targets Sites as Risk Factors of Sporadic Colorectal Cancer. **Non-coding RNAs in Colorectal Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.937, p.123-149, 2016.

VUONG, D. *et al.* Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v.465, p.1-14, 2014.

WADE, M.; WANG, Y.V.; WAHL, G.M. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. **Trends in Cell Biology**, v.20, p.299-309, 2010.

WANG, X; ZHU, J. Mir-1307 regulates cisplatin resistance by targeting Mdm4 in breast cancer expressing wild type P53. **Thoracic cancer**, v.9, p.676-683, 2018.

WEIGELT, B.; GEYER, F.C.; REIS-FILHO, J.S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v.4, p.192-208, 2010.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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.

XU, C. *et al.* MDM4 rs4245739 A > C polymorphism correlates with reduced overall cancer risk in a meta-analysis of 69477 subjects. **Oncotarget**, v.7, p. 71718-71726, 2016.

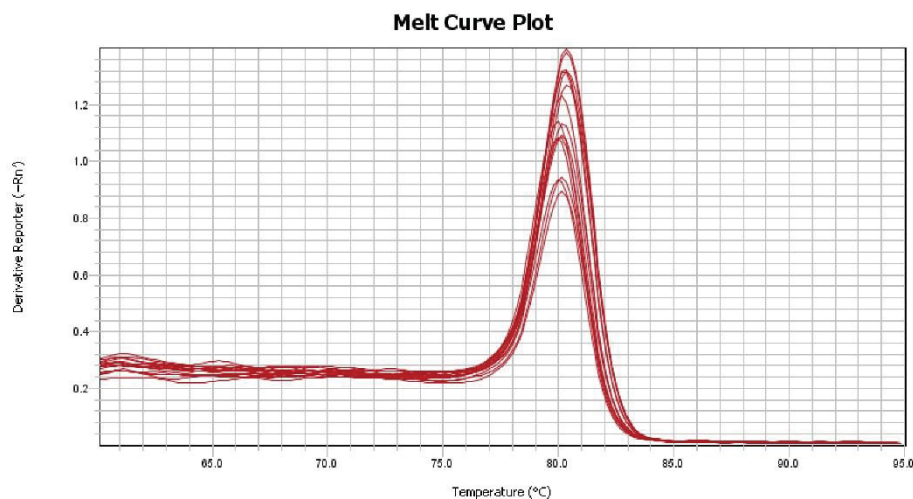
ZHAI, Y. *et al.* A PRISMA-compliant meta-analysis of MDM4 genetic variants and cancer susceptibility. **Oncotarget**, v.7, n.45, p. 73935-73944, 2016.

ZHANG, K. *et al.* Prognostic value of high-expression of miR-17-92 cluster in various tumors: evidence from a metaanalysis. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

ZHOU, L. *et al.* Association of a Genetic Variation in a miR-191 Binding Site in MDM4 with Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **PLoS ONE**, v.8, n.5, p.1-5, 2013.

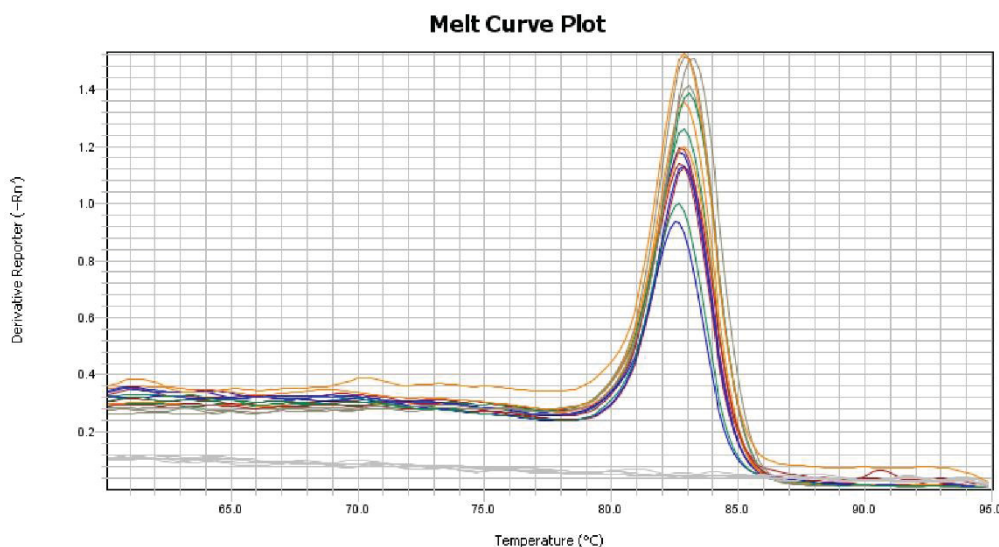
APÊNDICE

FIGURA 1 – CURVA DE *MELT* PARA A EXPRESSÃO DO miRNA-191-5p UTILIZANDO PRIMERS RT-STEM LOOP



Curva de *melt* observada na análise de expressão do miRNA-191-5p na linhagem MDA-MB-231 sem transfecção. O primer RT-stem loop específico foi utilizado na transcrição reversa. Na qPCR utilizou-se um par de primers – forward específico e reverse universal. O pico único de temperatura observado no gráfico indica a amplificação específica do miRNA 191-5p. FONTE: O autor (2020).

FIGURA 2 - CURVA DE *MELT* PARA A EXPRESSÃO DO miRNA-887-3p UTILIZANDO PRIMERS RT-STEM LOOP



Curva de *melt* observada na análise de expressão do miRNA-887-3p na linhagem MDA-MB-231 após transfecção do miRNA *mimics* 887-3p. O primer RT-stem loop específico foi utilizado na transcrição reversa. Na qPCR utilizou-se um par de primers – forward específico e reverse universal. O pico único de temperatura observado no gráfico indica a amplificação específica do miRNA 887-3p. FONTE: O autor (2020).

TABELA 1 – VALORES DE CT PARA A EXPRESSÃO DO miR-887-3p APÓS TRANSFECCÃO COM *MIMIC*

	Média dos Endógenos	miRNA 887-3p	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Change (FC)	Média FC	Desvio padrão	Erro padrão
NEG 1	26,588	35,410	8,823	0,000	1,000			
NEG 2	27,127	34,290	7,164	0,000	1,000	1,000	0,000	
NEG 1	26,588	35,410	8,823	0,000	1,000			
Exp.1 TRANSF. 887	28,217	23,785	-4,432	-13,255	9.772,419			
Exp. 2 TRANSF. 887	27,857	20,918	-6,939	-14,102	17.584,297	11.989,308	4.880,064	2.820,846
Exp.3 TRANSF. 887	26,354	22,104	-4,250	-13,072	8.611,208			

FONTE: O autor (2020).

TABELA 2 – VALORES DE CT PARA A EXPRESSÃO DO miR-191-5p APÓS TRANSFECCÃO COM *MIMIC*

	Média dos Endógenos	miRNA 191-5p	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Change (FC)	Média FC	Desvio padrão	Erro padrão
NEG 1	26,5875	27,846	1,2585	0,000	1,000			
NEG 2	27,1265	29,155	2,029	0,000	1,000	1,000	0,000	
NEG 1	26,5875	27,846	1,2585	0,000	1,000			
Exp.1 TRANSF. 191	26,200	15,664	-10,536	-11,794	3550,976			
Exp. 2 TRANSF. 191	27,111	16,924	-10,187	-12,216	4755,891	7061,263	5072,412	2932,030
Exp.3 TRANSF. 191	28,838	16,444	-12,394	-13,653	12876,921			

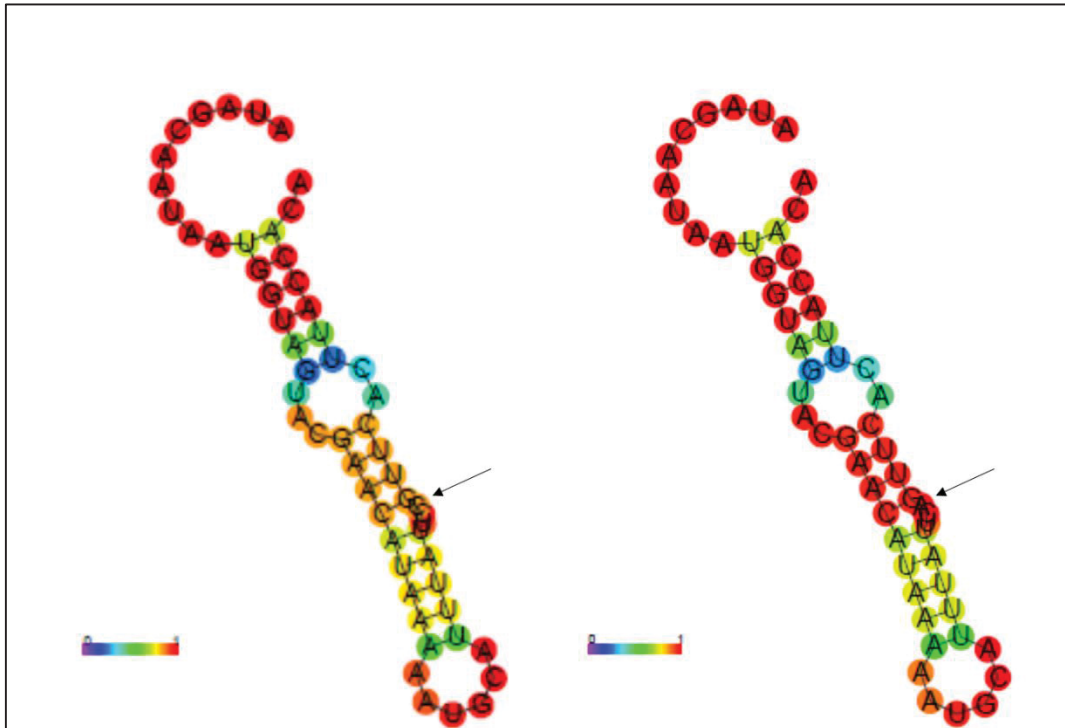
FONTE: O autor (2020).

TABELA 3 – VALORES DE CT PARA A EXPRESSÃO DO GENE ALVO MDM4 APÓS TRANSFECCÃO COM OS miRNAs *MIMICS* miR-887-3p e miR-191-5p

	Média dos Endógenos	<i>MDM4</i>	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	<i>Fold Change</i> (FC)	Média FC	Desvio padrão	Erro padrão
NEG 1	29,680	31,367	1,688	0,000	1,000			
NEG 2	29,799	31,198	1,400	0,000	1,000	1,000	0,000	
NEG 1	29,680	31,367	1,688	0,000	1,000			
Exp.1 TRANSF. 887	30,126	31,344	1,218	-0,470	1,385			
Exp. 2 TRANSF. 887	28,756	31,555	2,800	1,400	0,379	0,885	0,503	0,291
Exp.3 TRANSF. 887	29,747	31,601	1,855	0,167	0,891			
Exp.1 TRANSF. 191	28,712	30,413	1,702	0,014	0,990			
Exp. 2 TRANSF. 191	28,575	31,074	2,500	1,100	0,467	0,663	0,286	0,165
Exp.3 TRANSF. 191	32,969	35,570	2,602	0,914	0,531			

FONTE: O autor (2020).

FIGURA 3 – ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE PARTE DA REGIÃO 3'UTR DE *MDM4*



Comparação da representação da estrutura secundária de um fragmento de 56pb da região 3'UTR do gene *MDM4* com os alelos A e C do SNP rs4245739. FONTE: RNAfold (2020), disponível em <<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>>.