

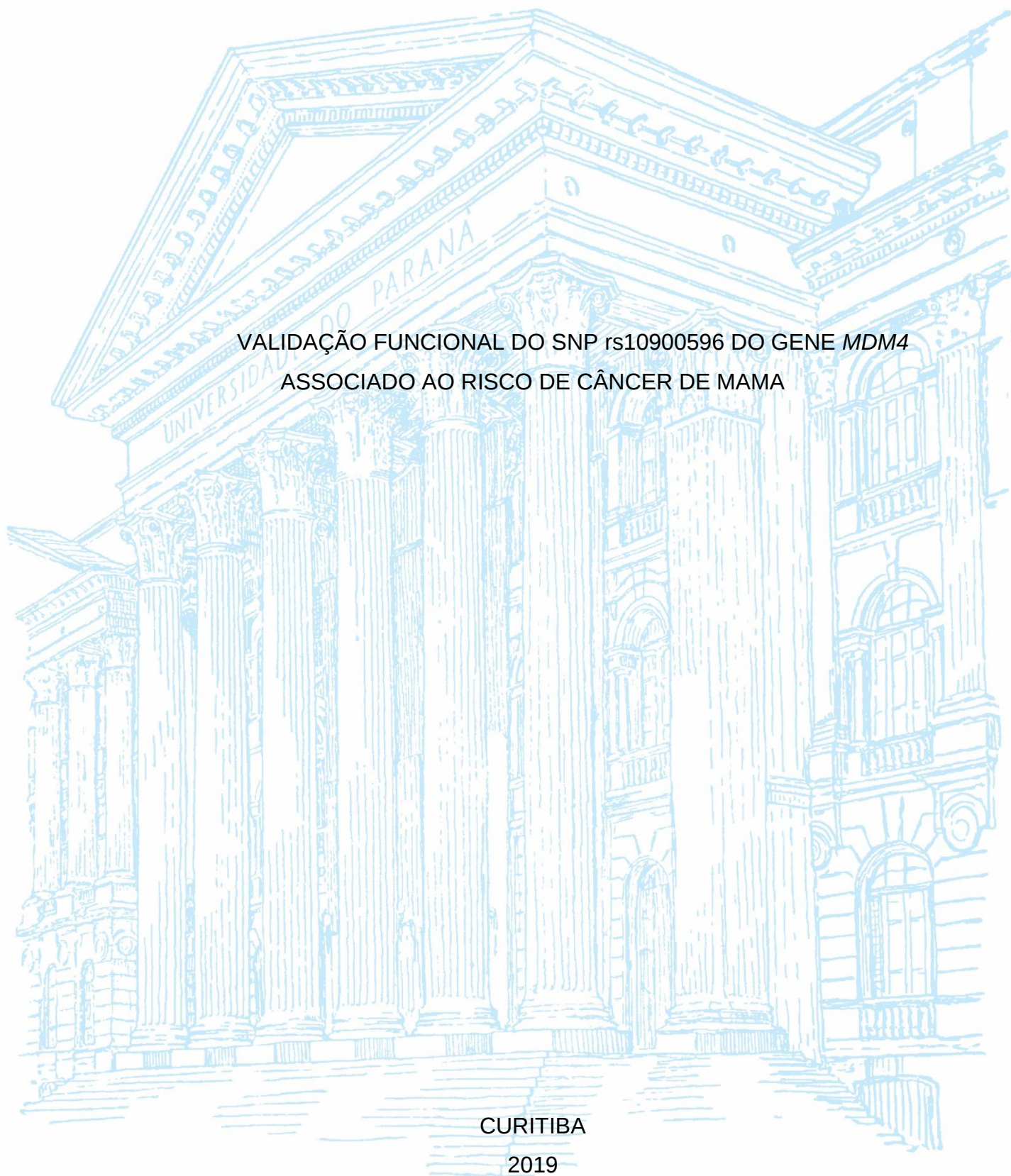
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA NOGUEIRA MAXIMIANO

VALIDAÇÃO FUNCIONAL DO SNP rs10900596 DO GENE *MDM4*
ASSOCIADO AO RISCO DE CÂNCER DE MAMA

CURITIBA

2019



JULIANA NOGUEIRA MAXIMIANO

VALIDAÇÃO FUNCIONAL DO SNP rs10900596 DO GENE *MDM4*
ASSOCIADO AO RISCO DE CÂNCER DE MAMA

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado em Biologia II como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Profa. Dra. Karin Braun Prado
Co-orientador: Daniela Fiori Gradia

CURITIBA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Eduardo e Leila por todo esforço realizado para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã canina, Nininha, que esteve comigo por quase 12 anos, minha companheira que me alegrava e me acalmava em todas as situações. Sinto sua falta.

À toda minha família, meus amigos e ao meu namorado Tomás, por todo apoio e paciência.

À minha orientadora profa. Dra. Karin Braun Prado e co-orientadora profa. Dra. Daniela Fiori Gradia pela confiança e ensinamentos.

Ao Laboratório de Interação Planta-Bactéria por terem disponibilizado seu espaço para execução de parte do projeto.

Ao Laboratório de Genética Molecular Humana e todos os seus integrantes.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) e todos os seus integrantes, em especial a profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira e as alunas Ana Flávia e Nina.

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são reguladores pós-transcricionais que tem como alvo um ou mais RNAm, normalmente inibindo a síntese proteica. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados na posição 3'UTR, região em que miRNAs tipicamente se ligam, podem alterar a afinidade de miRNAs com seu RNAm-alvo e interferir na sua expressão. Em estudo *in silico* realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi utilizada uma abordagem estatística Bayesiana Ingênua para integrar os dados dos algoritmos PolyMirts, MirSNP e mirSNP score, os quais predizem os efeitos de SNPs no sítio de interação com miRNAs. Seguiu-se com a integração dos dados obtidos nos estudos de associação genômica (GWAS-*Genome Wide Association Studies*) e dos dados de expressão de loci de características quantitativas (eQTLs-*Quantitative Trait Loci*) específicos para o câncer de mama e que permitiram a predição de miRNAs que poderiam estar relacionados ao câncer de mama de modo SNP-dependente. Com a análise dos dados obtidos, o presente estudo visa validar se o SNP predito como de risco ao câncer de mama (rs10900596 T>C) afeta o sítio de interação do miR-1257 em 3'UTR do RNAm do gene *MDM4* nas linhagens tumorais de câncer de mama MDA-MB-231 e ZR-75-1. Após a genotipagem dessas linhagens através do sequenciamento de Sanger, a região contendo as variantes do SNP de interesse foi amplificada utilizando os iniciadores desenhados pelo autor. Para clonagem da região 3'UTR do gene *MDM4* no vetor pmirGLO Dual-Luciferase miRNA *Target Expression Vector* (Promega) empregou-se as enzimas de restrição NheI e Sall (Thermo Scientific) e para realizar a ligação do inserto no vetor foi usada a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific). Aplicando a abordagem de *stem-loop* RT *primer* foram desenhados iniciadores para transcrição reversa do miR-1257 e detecção dos RNAs endógenos. A partir do RNA extraído das linhagens tumorais de mama MCF-7, ZR-75-1 e MDA-MB-231 foram sintetizados cDNA obtidos por transcrição reversa para serem utilizados na quantificação do micro-RNA alvo deste estudo empregando os *primers* específicos para qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real). Os resultados obtidos trazem otimizações de passos importantes que precedem a validação do SNP, como a obtenção de grande quantidade de DNA purificado para utilização na clonagem e a própria metodologia empregada em cada etapa para a obtenção dos clones. Este trabalho possibilitou o direcionamento adequado da utilização das linhagens de câncer de mama com as genotipagens corretas frente ao SNP rs10900596.

Palavras-chave: Câncer de mama. MDM4. Clonagem. rs10900597. miRNA-1257.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators that target one or more mRNAs, typically inhibiting protein synthesis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at the 3'UTR position, where miRNAs typically bind, can alter the affinity of miRNAs with their target mRNA and interfere with their expression. In an in silico study conducted by our research group, a Naive Bayes statistical approach was used to integrate the PolyMirTs, MirSNP and mirSNP score algorithms, which predict the effects of SNPs at the miRNA interaction site. This was followed by the integration of data from the Genome Wide Association Studies (GWAS) and expression quantitative trait loci (eQTLs) breast cancer specific that predict miRNAs that could be related to SNP-dependent breast cancer. With an analysis of the data obtained, the present study is seeking to validate if the SNP (rs10900596 T> C) affects the miR-1257 interaction site in 3'UTR of the *MDM4* gene in breast cancer cell lines (MDA-MB -231 and ZR-75-1). After genotyping these strains by Sanger sequencing, the region containing the SNP variants of interest was amplified using the primers designed by the author. For cloning into the pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector vector (Promega), restriction enzymes NheI and SalI (Thermo Scientific) were used for digestion and T4 DNA Ligase enzyme (Thermo Scientific) to perform ligation. Applying the stem-loop RT primer approach, primers were designed for reverse transcription of miR-1257 and endogenous RNAs from RNA extracted from MCF-7, ZR-75-1 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. To quantify the target microRNA from this study using cDNA synthesized in reverse transcription, qRT-PCR-specific primers (quantitative real-time PCR) were also designed. The results obtained so far bring optimizations of important steps that precede SNP validation, such as obtaining a large amount of purified DNA for use in cloning and the methodology used in each step to obtain these constructs. This work allowed the proper direction of the use of breast cancer lines with the correct genotyping of SNP rs10900596.

Keywords: Breast Cancer. *MDM4*. Cloning. rs10900597. MicroRNA-1257.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS MDM2 E MDM4.....	13
FIGURA 2 – VIAS DE REGULAÇÃO DA P53 POR MDM4 E MDM2.....	14
FIGURA 3 – BIOGÊNESE DOS MICRORNAS.....	15
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DO pmirGLO DUAL-LUCIFERASE MIRNA <i>TARGET EXPRESSION VECTOR</i> (PROMEGA).....	22
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O mir-1257 E A 3'UTR DE <i>MDM4</i> COM O SNP rs10900596.....	24
FIGURA 6 – MECANISMO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DE miRNAS POR <i>STEM-LOOP RT PRIMERS</i>	27
FIGURA 7 – MECANISMO DE qRT-PCR DE miRNAS UTILIZANDO A ABORDAGEM <i>STEM-LOOP</i>	28
FIGURA 8 – ELETROFORESE DA PCR PARA TESTAR OS INICIADORES SINTETIZADOS.....	31
FIGURA 9 – RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS COM AMOSTRAS DA LINHAGEM MCF-7.....	32
FIGURA 10 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA LINHAGEM MDA-MB-231.....	33
FIGURA 11 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DAS LINHAGEM ZR-75-1 E SKBR3.....	33
FIGURA 12 – RESULTADO DA CLONAGEM EM GEL DE AGAROSE 1%.....	34
FIGURA 13 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DOS CLONES.....	35
FIGURA 14 – TESTE DE CONFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM TUMORAL DE ZR-75-1.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PAR A: <i>PRIMERS</i> DIRETO E REVERSO PARA AMPLIFICAÇÃO DE 3'UTR DE <i>MDM4</i>	19
TABELA 2 – PAR B: <i>PRIMERS</i> DIRETO E REVERSO PARA AMPLIFICAÇÃO DE 3'UTR DE <i>MDM4</i>	19
TABELA 3 – CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTENDO O SNP DE INTERESSE.....	19
TABELA 4 – CICLOS DA PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DE PCR.....	20
TABELA 5 – CICLOS DO SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS PURIFICADAS.....	20
TABELA 6 – <i>STEM-LOOP</i> RT <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	27
TABELA 7 – CICLOS DA PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DE miRNAs.....	28
TABELA 8 – <i>PRIMERS</i> PARA qRT-PCR.....	29
TABELA 9 – CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR qRT-PCR.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Câncer de mama	11
3.2	MDM2 e MDM4	12
3.3	MicroRNAs	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Linhagens e Cultivo celular	18
4.2	<i>Primers</i> para 3'UTR de <i>MDM4</i>	18
4.3	Genotipagem das linhagens	19
4.4	Clonagem	21
4.4.1	Vetor	21
4.4.2	Insertos	24
4.4.3	Ligação	25
4.5	Extração de RNA	26
4.6	Transcrição Reversa de miRNAs	26
4.7	Determinação da concentração de cDNA e eficiência dos <i>primers</i> de qRT-PCR	28
4.8	Teste de confluência da linhagem ZR-75-1	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Amplificação dos Insertos	31
5.2	Sequenciamento das Linhagens	31
5.3	Obtenção dos Clones	34
5.4	Sequenciamento dos Clones	35
5.5	Teste de Confluência	36
5.6	Eficiência dos <i>primers</i> de qRT-PCR	36
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais comum em mulheres no mundo e o segundo com o maior número de casos e também de mortalidade se considerado ambos os sexos (BRAY *et al.*, 2018). Segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados mais de 59 mil novos casos da doença para o ano de 2019 no Brasil.

Diante da complexidade e gravidade que envolvem os tumores de mama, estudos acerca dessa doença são extremamente relevantes. MicroRNAs (miRNAs), são pequenos RNAs não codificantes que apresentam potencial de serem utilizados como biomarcadores para o diagnóstico ou alvos terapêuticos para o câncer (BERINDAN-NEAGOE *et al.*, 2014). Devido a sua complementariedade com a região 3'UTR dos mRNA dos genes alvos, podem interferir em alguns mecanismos muito importantes para o desenvolvimento tumoral, como na sinalização do crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese, metástase, entre outros. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) quando localizados em 3'UTR, podem alterar a afinidade de miRNAs com seu gene alvo, fortalecendo, inibindo ou criando novos sítios de ligação para os miRNAs (BARTEL, 2004; RYAN, ROBLES e HARRIS, 2010; PENG e CROCE, 2016).

Em estudo *in silico* realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi utilizada uma abordagem estatística Bayesiana Ingênua para integrar os dados dos algoritmos PolyMirts, MirSNP e mirSNP score, os quais predizem os efeitos de SNPs no sítio de interação com miRNAs. Seguiu-se com a integração dos dados obtidos nos estudos de associação genômica (GWAS-*Genome Wide Association Studies*) e dos dados de expressão de loci de características quantitativas (eQTLs-*Quantitative Trait Loci*) específicos para o câncer de mama e que permitiram a predição de miRNAs que poderiam estar relacionados à neoplasia de modo SNP-dependente.

Com a análise dos dados obtidos, o presente trabalho realizou e otimizou as diversas etapas que antecedem a validação se este SNP predito como de risco ao câncer de mama (rs10900596 T>C) afeta o sítio de interação do miR-1257 no RNAm do gene *MDM4* nas linhagens tumorais de câncer de mama MDA-MB-231 e ZR-75-1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar se a predição de bioinformática acerca de alvos de microRNAs em variantes SNPs de genes relacionados ao câncer de mama é confirmada em ensaios funcionais.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenhar *primers* para amplificação e restrição do inserto contendo cada variante alélica do SNP rs10900596 do gene *MDM4* por PCR, *primers* específicos para obtenção de cDNA do miRNA-1257 por transcrição reversa e *primers* para quantificá-lo nas diferentes linhagens tumorais de mama por PCR quantitativa em tempo real;
- Cultivar linhagens tumorais de mama para extração de DNA, RNA e para a utilização no ensaio de transfecção;
- Confirmar genotipagens prévias das linhagens tumorais de mama frente ao SNP rs10900596 do gene *MDM4*;
- Clonar os dois insertos contendo a região 3'UTR com cada uma das variantes (T e C) do SNP rs10900596 do gene *MDM4* no vetor de expressão pmirGLO Dual-Luciferase miRNA *Target Expression Vector* (Promega) para utilização no ensaio de transfecção.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais comum que acomete o sexo feminino e a maior causa de morte por câncer em mulheres no mundo (BRAY et al., 2018). No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados mais de 59 mil novos casos da doença em 2019 no país.

Trata-se de uma doença complexa e heterogênea com vários subtipos com os quais variam seu comportamento clínico, como prognóstico e resposta ao tratamento. Os tumores de mama podem ser divididos em diversos grupos de acordo com seu tipo e grau histológico (ELLIS et al., 1992; ELSTON, ELLIS, 1991) ou ainda pela sua assinatura molecular (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001). O tipo histológico corresponde ao padrão de crescimento dos tumores, como o carcinoma ductal *in situ* (não invasivo), carcinoma lobular invasivo e o carcinoma invasivo sem outras especificações, sendo este último o mais comum (60-80%). O grau histológico reflete o nível de diferenciação das células cancerosas, avaliando a formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e atividade proliferativa (ELSTON & ELLIS, 1991).

A classificação molecular, baseada no perfil de expressão gênica, divide os tumores de mama em cinco subtipos intrínsecos: Luminal (dividido em Luminal A e Luminal B), *HER2-enriched*, *Basal-like*, *normal-like* e *Claudin-low* (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; HERSCHKOWITZ et al., 2007). Cada um possui resposta a tratamento, sobrevida e incidências diferentes (PRAT & PEROU, 2011). Na prática clínica, para traçar o melhor plano de tratamento, uma alternativa ao perfil de expressão gênica, é realizar um perfil imunohistoquímico dos tumores. Os principais biomarcadores que tem suas expressões analisadas são o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (PR) e o antígeno de proliferação celular (Ki-67) (NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2009; VODUC et al., 2010).

Luminal A, subtipo mais frequente de câncer de mama (cerca de 60%) é caracterizado por ser PR+ e/ou RE+, HER2- e uma baixa expressão de Ki67 (<14%) (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; VODUC et al., 2010). O subtipo Luminal B é caracterizado por ser RE+ e/ou PR+ e HER2+ ou HER2-. Em Luminal B HER2-

ocorre a superexpressão de Ki67 (>14%), já nos casos HER2+, é este receptor que se encontra superexpresso (HER2 Luminal) (CHEANG *et al.*, 2009; VODUC *et al.*, 2010). O subtipo HER2-*enriched* é caracterizado pela superexpressão de HER2 e ausência dos dois receptores hormonais (PR- e RE-) (VODUC *et al.*, 2010). Os tumores de mama do subtipo *basal-like* são negativos tanto para os receptores hormonais (PR- e RE-) quanto para o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2-) e expressão de vários genes expressos em células mioepiteliais de mama como citoceratina de padrão basal (CK5/6) e receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (NIELSEN *et al.*, 2004; BHARGAVA *et al.*, 2008). No cotidiano clínico, onde é comum realizar o perfil imunohistoquímico dos pacientes, o termo triplo negativo é muito utilizado para referir-se ao subtipo *basal-like* devido a expressão negativa dos três receptores. 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). Outro subtipo molecular que se enquadra entre os triplos negativos é o *normal-like*, mas diferente do basal-like, são negativos para CK5/6 e *EGFR* e expressam genes característicos de tecido adiposo (PEROU *et al.*, 2000). O subtipo *claudin-low* é caracterizado pela baixa expressão dos genes claudinas, 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 também, baixa expressão de genes epitélio luminais e alta expressão de marcadores de linfócitos e células endoteliais. São na sua maioria triplo negativos (RE- /PR-/HER2-), porém alguns tumores são positivos para os receptores hormonais (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; PEROU, 2010; PRAT *et al.*, 2010; PRAT, PEROU, 2011; EROLES *et al.*, 2012).

3.2 MDM2 e MDM4

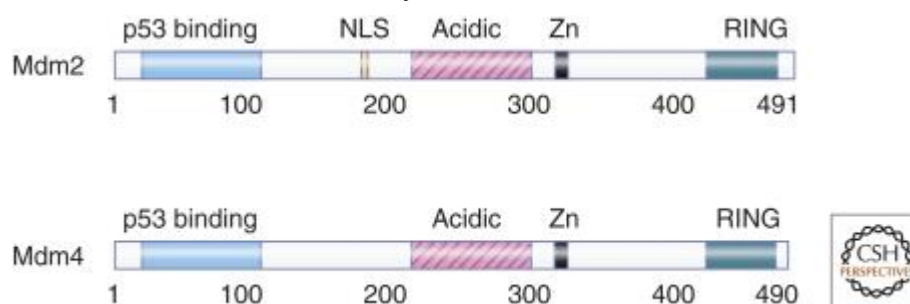
A família das proteínas MDM (do inglês “*mouse double minute*”) é composta pela MDM2 (também chamada de HDM2) e pelo seu homólogo estrutural MDM4 (ou MDMX). Uma das atividades mais importantes atribuídas às proteínas MDM2 e MDM4 é a regulação negativa da proteína p53 (HAUPT *et al.*, 1997).

Codificada pelo gene *TP53*, a proteína p53 é um fator de transcrição essencial para a manutenção da integridade genômica e para a indução das vias de parada do ciclo ou morte celular (LANE, 1992). Se por um lado a perda ou diminuição da função

normal de p53 aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores, sua atividade aumentada é letal. Por isso, a atividade da p53 deve ser rigorosamente regulada (WADE, WANG, WAHL, 2010).

O gene *MDM2* tem sua transcrição promovida pela própria p53 sendo diferente de outros produtos de genes alvos da p53. A proteína MDM2 não atua como mediadora de efeitos biológicos deste supressor tumoral, ao contrário, ela interage com a p53 regulando negativamente sua função (MICHAEL & OREN, 2003). Uma das formas com que MDM2 inibe p53 é agindo como uma ligase de ubiquitina (WADE, WANG, WAHL, 2010). Ubiquitina trata-se de uma pequena proteína que marca outras proteínas para degradação pelo complexo proteossomal 26S (LINARES *et al.*, 2003). MDM4 por sua vez, apesar de homóloga à proteína MDM2, não apresenta a mesma função de E3 ubiquitina ligase, portanto, não é capaz de adicionar moléculas ubiquina em p53 (SHADFAN, LOPEZ-PAJARES, YUAN, 2012).

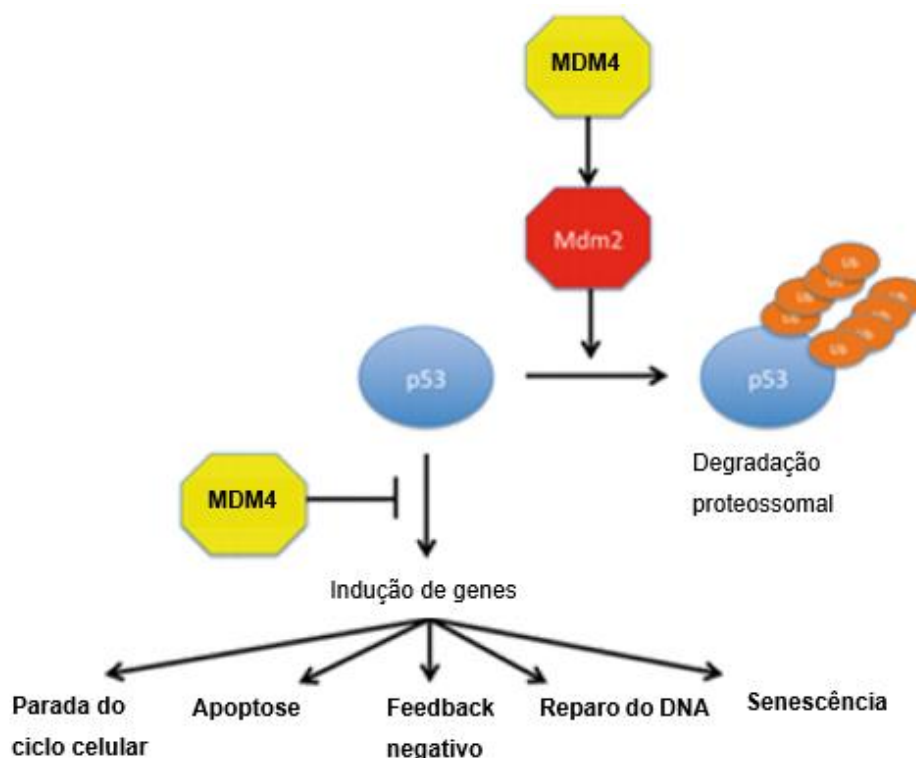
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS MDM2 E MDM4



Representação dos domínios das proteínas homólogas MDM2 e MDM4 em humanos. A porção amino-terminal de ambas se ligam à p53. Somente MDM2 possui um sinal de localização nuclear (NLS). A região ácida central do MDM2, mas não de MDM4, liga proteínas ribossômicas. Os domínios *RING-finger* são necessários para a heterodimerização entre MDM2 e MDM4. Fonte: PERRY, 2010

Ambas as proteínas possuem uma região amino-terminal capaz de se ligar a p53. Este domínio interage com o domínio de transativação da p53, inibindo sua capacidade de induzir a transcrição de seus genes alvos (SHVARTS *et al.*, 1996). Na extremidade carboxi-terminal, existe o domínio *RING-finger* (do inglês ‘*Really Interesting New Gene*’) que participa da heterodimerização entre MDM2 e MDM4. O heterodímero MDM2/MDM4 estabiliza MDM2 e aumenta sua capacidade de ubiquitar p53 (LINARES *et al.*, 2003; KAWAI *et al.*, 2007) (FIGURA 2). O domínio RING é o que confere à MDM2 sua atividade E3 ubiquitina ligase (LINARES *et al.*, 2003).

FIGURA 2 - VIAS DE REGULAÇÃO DA P53 POR MDM4 E MDM2



Representação de duas vias de regulação de p53: em uma via, MDM4 interage com MDM2 por meio dos domínios RING-finger, aumentando a capacidade de MDM2 de ubiquitinar p53. Na outra, MDM4 interage com o domínio de transativação de p53, impedindo sua capacidade de induzir a transcrição de genes que atuam em vias como apoptose, reparo a danos no DNA e parada do ciclo celular. Adaptado de BERBERICH, S.J. (2014).

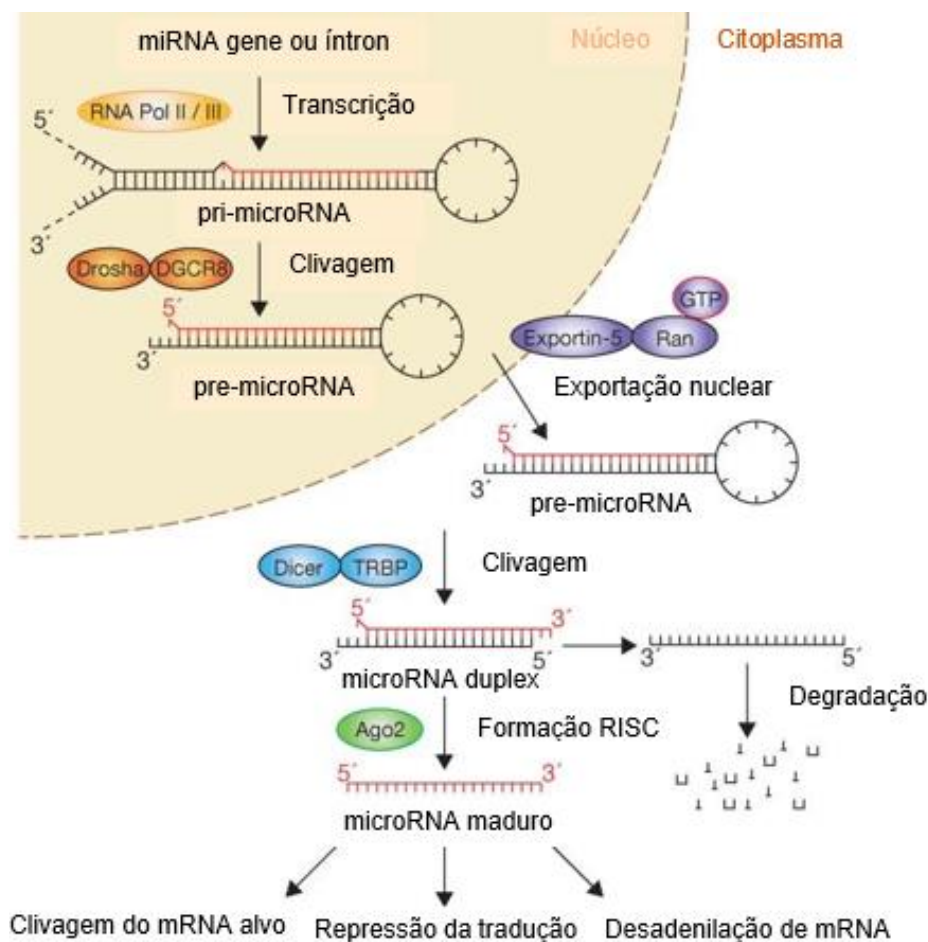
A superexpressão de MDM4 já foi constatada em diversos tipos de tumores primários, incluindo tumores de mama, carcinomas de células escamosas de cabeça, pescoço e retinoblastomas (DANOVI *et al.*, 2004; LAURIE *et al.*, 2006). HAUPT *et al.* (2017) encontrou MDM4 superexpresso em 64% dos casos estudados, acompanhado 62% das vezes de um baixo nível de p53. Um exemplo disso ocorre na linhagem celular de câncer de mama Luminal MCF-7, em que níveis quase indetectáveis de p53 selvagem (não mutado) são encontrados na presença de alta amplificação de *MDM4* (DANOVI *et al.* 2004).

3.3 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes que participam da regulação pós transcricional através de sua complementaridade com a região 3' não traduzida (3'UTR - do inglês *untranslated region*) dos RNAm de seus respectivos

genes alvos. A maioria dos miRNAs documentados são formados a partir de um processamento que ocorre em duas etapas (FIGURA 3). Na primeira etapa ocorre a formação de pre-miRNA a partir de um pri-miRNA pelo complexo *Drosha/DGCR8* no núcleo. A segunda etapa ocorre no citoplasma com a formação de miRNAs maduros a partir de pre-miRNAs pelo complexo *Dicer/TRBP* (SUN *et al.*, 2009).

FIGURA 3 – BIOGÊNESE DOS MICRORNAS



Passo a passo da biogênese de microRNAs. No núcleo, o gene do microRNA é transcrito pela RNA polimerase II, formando um pri-microRNA que é clivado pelo complexo *Drosha/DGCR8* resultando em um pre-microRNA. O pre-microRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina-5 e no citoplasma é clivado pelo complexo *Dicer/TRBP* formando um microRNA de fita dupla. Uma das fitas se liga ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) contendo a proteína Argonauta (endonuclease catalítica) e a outra fita é degradada. O microRNA maduro pode se ligar ao seu mRNA alvo. Adaptado de WINTER *et al.* (2009).

Diversos estudos indicam que um único miRNA pode regular negativamente mais de 100 mRNAs. Além disso, estima-se que mais de 60% dos genes humanos

codificadores de proteínas possuam locais de ligação a miRNA nas suas regiões 3'UTRs (FRIEDMAN *et al.*, 2009; LEVA, GAROFALO, CROCE, 2013).

O envolvimento dessa classe de RNAs está sendo firmemente relacionada a neoplasias e com isso pode ser utilizado como biomarcadores na identificação dessa patologia. As variações genéticas nos genes de processamento de miRNA e nos sítios de ligação de miRNAs podem afetar a biogênese do miRNA e o seu efeito regulador em seus genes alvo, promovendo ou bloqueando a gênese tumoral (LIANG *et al.*, 2010).

A variação do sítio de ligação na região 3'UTR do mRNA alvo é uma característica comum das células tumorais, pois os genomas de tumores humanos possuem milhares de mutações somáticas (STRATTON, 2011; ZIEBARTH, BHATTACHARYA, CUI, 2012). SNPs (do inglês "*single nucleotide polymorphism*") são exemplos que vem sendo muito estudados e associados ao câncer pois tratam-se de sequências de DNA polimórfica derivadas de uma mutação gênica de nucleotídeo único (YUAN *et al.*, 2014). SNPs localizados na região 3'UTR de mRNA - sítio de ligação aos miRNAs – podem alterar a afinidade de ligação entre miRNAs e seu mRNA alvo (CHEN *et al.*, 2008). Diversos estudos têm apontado o importante papel da relação entre SNPs e miRNAs como possível fator de risco para o câncer, incluindo o câncer de mama (CROCE, 2009; ZIEBARTH, BHATTACHARYA, CUI, 2012; SALZMAN, WEIDHAAS, 2013; MULRANE *et al.*, 2013 CIPOLLINI, LANDI, GEMIGNANI, 2014). Dados de Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS) já forneceram um panorama que cerca de 80 loci estão relacionados ao risco de câncer de mama, além de aproximadamente 90% dos SNPs associados às doenças complexas estarem localizados em regiões não codificantes do genoma humano, incluindo regiões que especificam RNA funcionais, como miRNAs (WELTER *et al.*, 2014). Em um estudo conduzido por Gamazon *et al.* (2012), 25% dos SNPs localizados na região 3'UTR em populações europeias preditos a alterar a afinidade de miRNAs e seus genes alvos, apresentaram efeito eQTL (GAMAZON *et al.*, 2012).

Estudos com SNPs demonstraram que a troca de apenas uma base já é o suficiente para impedir a ligação do microRNA com seu mRNA alvo ou criar um novo sítio de ligação. Em um estudo com o SNP rs4245739 C>A, também localizado em 3'UTR do gene *MDM4*, ficou comprovado a afinidade do miR-887 apenas com o alelo C (STEGEMAN *et al.*, 2015). Nesse trabalho, Stegeman e colaboradores realizaram ensaios da luciferase repórter utilizando mimetizadores de microRNA (microRNA

mimics). Esses mimetizadores são miRNA de dupla fita quimicamente modificados, projetados para copiar a funcionalidade do miRNA endógeno maduro após a transfecção (Thermo Fisher Scientific).

Em um estudo com 417 pacientes caucasianas com câncer de ovário, o SNP rs10900596 em *MDM4*, potencial alvo de ligação do miR-409-3p, foi relacionado a uma melhor resposta ao tratamento desse tipo de câncer (LIANG et al., 2010). Segundo o *Genome Aggregation Database* (gnomAD), as frequências das variantes do SNP rs10900596 na população mundial é de 39,64% do alelo T e 60,36% do alelo C.

A baixa expressão do miR-1257 foi relacionada à pacientes com lipossarcoma desdiferenciado, um subtipo de sarcoma de tecidos moles em que os adipócitos não são capazes de se diferenciarem. Um dos alvos do miR-1257 é o gene *CALR* que codifica para a calreticulina, uma proteína que inibe a diferenciação de adipócitos ao se ligar a íons Ca^{++} inativando-os (HISAOKA, MATSUYAMA & NAKAMOTO, 2012). Já HUANG et al. (2018) estudando adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) encontraram que a variante rs372883 em 3'UTR do gene *BACH1* é alvo de ligação para o miR-1257 e a alteração T> C pode diminuir a ligação desse microRNA, resultando em uma expressão mais alta de BACH1. BACH1 é capaz de reprimir a transcrição de HMOX1 codificador da heme oxigenase-1 (HO-1), agindo como um supressor tumoral. Dessa forma, foi detectado níveis mais altos de miR-1257 nos tecidos de PDAC em comparação com os tecidos normais adjacentes, o que implica em um papel oncogênico do miR-1257 no adenocarcinoma ductal pancreático (HUANG et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens e Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas foram selecionadas a partir da genotipagem prévia realizada pelo nosso grupo de estudos. Para tanto, as linhagens consideradas homozigotas C/C para o SNP rs10900596 do gene *MDM4* foram MCF-7, SKBR3 e ZR-75-1; já a linhagem MDA-MB-231 foi considerada homozigota T/T.

A partir dessa seleção prévia, as linhagens foram sequenciadas utilizando os iniciadores desenhados (TABELAS 1 e 2) e as selecionadas para este estudo foram as linhagens MDA-MB-231 e ZR-75-1. Cada uma dessas linhagens pertence aos subtipos com diferentes prognósticos e respostas a tratamento: Luminal B: ZR-75-1 e Triplo Negativo: MDA-MB-231.

As linhagens tumorais selecionadas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com 10% soro fetal bovino (pH 7.2-7.4), 2,5% HEPES 1M e 1% penicilina-estreptomicina (5000U/mL - 5000µg/mL) e mantidas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após a expansão das células e confluência de 70-90%, as células do cultivo foram lavadas com Tampão fosfato-salino 1X (PBS) pré-aquecido em banho-maria à 37 °C, para retirada das células mortas. As células aderidas foram tratadas com TrypLE Express (Gibco™) (tripsina 0,25%). Na sequência, foram extraídos DNA das células das linhagens utilizando o kit All prep DNA/RNA mini kit (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Para a extração de RNA total foi utilizado o protocolo com TRIzol, descrito no item 4.5. O TRIzol foi utilizado pois a coluna do kit All prep DNA/RNA mini kit (QIAGEN) não é sensível o suficiente para reter os microRNAs.

4.2 Primers para 3'UTR de *MDM4*

Foram desenhados dois pares de *primers* (iniciadores) utilizando as ferramentas online OlygoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e Nucleotide-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O par de *primers* A (TABELA 1) foi desenhado para amplificar uma sequência de 332 pb da região 3'UTR do gene *MDM4*, contendo o SNP rs10900596, enquanto o par de *primers* B (TABELA 2) foi desenhado

para amplificar uma sequência de 136 pb também contendo o SNP rs10900596 na região 3'UTR. Em ambos os casos, foi incluído no iniciador direto (*forward*) o sítio de restrição para a enzima NheI e no iniciador reverso (*reverse*) o sítio de restrição da enzima Sall. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrate DNA Technologies*).

TABELA 1 – PAR A: *PRIMERS* DIRETO E REVERSO PARA AMPLIFICAÇÃO DE 3'UTR DE *MDM4*.

Primer direto 5' GCCGCTAGCCTAAAGCAAGGCATAG 3'

Primer reverso 5' CATAGTCGACAGCACGTTGCAGCAG 3'

Sublinhado os sítios de restrição para NheI (direto) e Sall (reverso). Fonte: O Autor (2019)

TABELA 2 – PAR B: *PRIMERS* DIRETO E REVERSO PARA AMPLIFICAÇÃO DE 3'UTR DE *MDM4*

Primer direto 5' GCCGCTAGCCTAAAGCAAGGCATAG 3'

Primer reverso 5' GCAGTCGACAGAAAACCAGAGCACATG 3'

Sublinhado os sítios de restrição para NheI (direto) e Sall (reverso). Fonte: O Autor (2019)

4.3 Genotipagem das linhagens

Para testar se os iniciadores desenhados amplificavam o fragmento de interesse contendo o SNP rs10900596 na região 3'UTR do gene *MDM4* foi realizada reação em cadeia da polimerase, PCR seguida pela eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação do produto específico. O volume final dessa reação foi de 10 µl, sendo 1 µl de DNA de cada linhagem, tampão 1X de PCR (Invitrogen), 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 U Taq Platinum I (Invitrogen) e 0,5 pmoles de iniciadores específicos. Para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 utilizou-se tanto o par de *primers* A (TABELA 1) quanto o par de *primers* B (TABELA 2), para a linhagem ZR-75-1 apenas o par de iniciadores A.

As condições de ciclagem para ambos os pares de *primers* foram as mesmas e estão descritas na TABELA 3:

TABELA 3 - CICLOS DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTENDO O SNP DE INTERESSE

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	30
Anelamento	60°C	45 segundos	

Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão Final	72°C	5 minutos	1
Hold	15°C	15 minutos	1

Fonte: O autor (2019)

Os resultados da amplificação foram verificados em gel de agarose 1% com corrida eletroforética a 80V por 50 minutos. Como corante foi utilizado o UniSafe 20.000x.

A partir do produto amplificado foi realizada uma purificação enzimática usando Exonuclease I (20 U/μL) e Fosfatase Alcalina termosensitível (FastAp) (20 U/μL), ambas da Thermo Scientific, com o intuito de degradar os reagentes da PCR para posterior reação de sequenciamento para genotipar o SNP do gene *MDM4*. As condições para a reação de purificação estão descritas na TABELA 4:

TABELA 4 - CICLOS DA PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DE PCR

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Ação enzimática	37°C	60 minutos	1
Inativação enzimática	80°C	15 minutos	1
Hold	4°C	∞	

Fonte: O autor (2019)

Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento pelo método de Sanger. Foi usada para cada amostra purificada, tampão de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 5X (Applied Biosystems™), BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems™) e 0,02 mM dos iniciadores. As condições de sequenciamento estão descritas na TABELA 5:

TABELA 5 – CICLOS DO SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS PURIFICADAS

Etapa do Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	96°C	1 minuto	1
Desnaturação	96°C	15 segundos	25
Anelamento	50°C	15 segundos	
Extensão	60°C	4 minutos	
Hold	4°C	∞	1

Fonte: O autor (2019)

Em seguida, as amostras foram purificadas por precipitação usando acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados sucessivamente por inversão e deixados no gelo por 15 minutos para que então fossem centrifugados por 30 minutos à 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de etanol 70%. Foram então centrifugados por 15 minutos em velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado e todo etanol foi evaporado antes da ressuspensão das amostras em 10 µL de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) para sequenciamento no aparelho 3500xl Genetic Analyser (Life Technologies). Os resultados foram analisados com o *software* BioEdit.

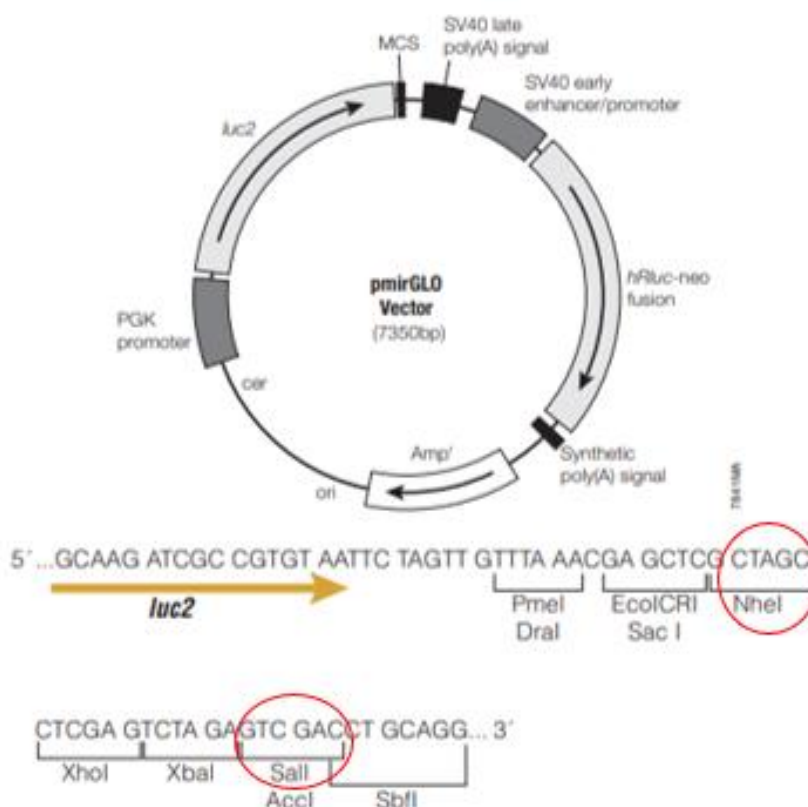
4.4 Clonagem

A clonagem consistiu na construção de dois insertos contendo a região 3'UTR com cada uma das variantes (T e C) do SNP rs10900596 do gene *MDM4* no vetor de expressão pmirGLO Dual-Luciferase miRNA *Target Expression Vector* (Promega).

4.4.1 Vetor

O vetor escolhido para esse estudo é o pmirGLO Dual-Luciferase miRNA *Target Expression Vector* (Promega) (FIGURA 4) pois este possui como sistema repórter primário o *firefly* luciferase (*luc2*). A luminescência emitida pela luciferase presente no vetor permite quantificar a interação entre SNP e miRNA pois o sítio de clonagem múltipla (MSC) se encontra na região 3'UTR do gene *luc2*.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DO PMIRGLO DUAL-LUCIFERASE MIRNA *TARGET EXPRESSION VECTOR* (PROMEGA)



O vetor comercial pmirGLO da Promega possui um tamanho total de 7.350 pb. Entre as bases 5645–7297 está o gene da Firefly luciferase (*luc2*) e na sequência entre as bases 7306–7350 encontra-se o Sítio de Clonagem Múltipla (MSC). O plasmídeo possui ainda o gene de resistência à ampicilina (*Amp*) e o gene da Renila luciferase (*hRluc-neo fusion*). MSC está representado com os sítios para enzimas de restrição existentes no plasmídeo. Em vermelho está destacado o sítio de restrição das enzimas escolhidas para esse trabalho. Adaptado de Promega Corporation.

Para obter o DNA plasmidial foi realizada a transformação em *E. coli* da cepa DH10B e posterior preparo da técnica de mini preparação com o kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) para seu isolamento. Os procedimentos a seguir foram realizados no Laboratório de Interação Planta-Bactéria (LIPB) da UFPR. As células DH10B foram primeiramente tornadas competentes para a transformação com o plasmídeo, para isso foi feito um pré-inóculo com 10 µL de células DH10B em estoque de glicerol e adicionado a 5 mL de meio LB (*Lysogeny Broth*) com estreptomicina 20 ng/µL. A estreptomicina foi utilizada pois a cepa apresenta resistência a esse antibiótico. O pré-inóculo foi incubado no agitador por 16 horas a 120 rpm 37°C. A partir do pré-inóculo, foi preparado um inóculo com meio LB sem antibiótico e 0.75 de volume de pré-inóculo. O inóculo foi colocado no agitador a 120 rpm 37°C por 3 horas. O inóculo foi então incubado no gelo por 15 minutos. Na sequência, foi feita

centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e o pellet de células ressuspenso com 15 mL $MgCl_2$ (0,1M) gelado. Após a centrifugação nas condições anteriores ser repetida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 25 mL de $CaCl_2$ (0,1 M). Após ficar por 20 minutos no gelo, seguiu-se com uma nova centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a ressuspensão final do pellet foi com 800 μ L de $CaCl_2$ (0,1M) e glicerol 20%. As células que não foram utilizadas imediatamente foram armazenadas no freezer -80°C do LIPB.

Com as células bacterianas competentes, foi adicionado 1 μ L de pmirGLO (5 ng/ μ L) em 100 μ L das cepas DH10B através de um choque térmico para sua entrada na célula: 20 minutos no gelo, 2 minutos a 42°C no termobloco e 2 minutos no gelo. O choque térmico foi seguido de um tempo de recuperação para a expressão do gene B-lactamase que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Para isso, foi adicionado meio LB e incubação a 120 rpm 37°C por 1 hora. Para testar a eficiência da quimiotransformação, as bactérias transformadas foram plaqueadas em placa de petri contendo meio LA (LB Agar) e 10 ng/ml de ampicilina e mantidas em estufa 37°C por aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte foram preparados pré-inóculos com meio LB e estreptomicina com as colônias isoladas que cresceram na placa de petri. O inóculo foi incubado a 120 rpm 37°C por 16 horas. O inóculo foi centrifugado por 30 segundos 15.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adiciono-se os reagentes fornecidos pelo kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. O resultado do miniprep foi quantificado utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

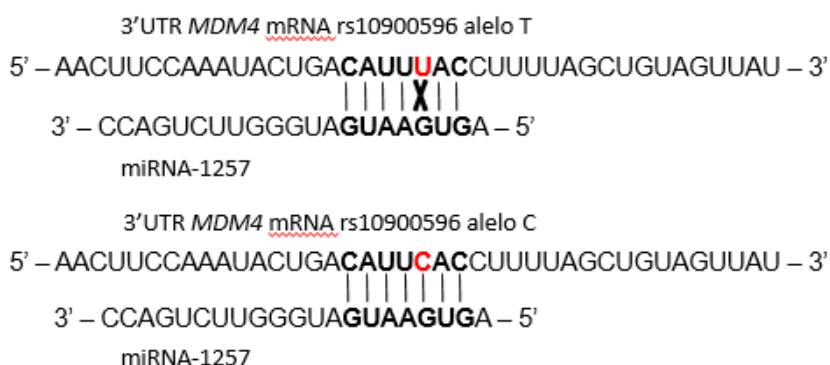
Em seguida, o DNA do vetor plasmideal foi digerido com as enzimas de restrição NheI e Sall (Thermo Scientific), utilizando um protocolo de digestão sequencial, como sugerido pela ferramenta online *DoubleDigest Calculator-Thermo Scientific*, com modificação do tempo de reação, sendo 16-20 horas a 37°C de incubação para cada enzima. Para a primeira reação de digestão foi de 20 horas a 37°C e utilizou-se 10U da enzima NheI e Tampão Tango 1X, totalizando 40 μ L de reação. O volume de DNA utilizado para essa reação variou de acordo com a concentração dos produtos de PCR purificados. A segunda parte da digestão consistiu em adicionar 20U da enzima Sall e Tampão Tango 5X. A reação ficou 18 horas a

37°C. Esse protocolo foi aplicado tanto para o DNA plasmidial quanto para os dois insertos (alelos T e C) previamente amplificados na PCR do gene *MDM4*.

4.4.2 Insertos

Os insertos contendo os alelos T e C do SNP rs10900596 do gene *MDM4* foram amplificados das sequências de DNA obtidas das linhagens ZR75-1 e MDA-MB 231 utilizando os *primers* específicos descritos em 4.2. A representação da interação do microRNA-1257 com as variantes do SNP em questão preconizada por bioinformática está esquematizada na FIGURA 5:

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE O MIR-1257 E A 3'UTR DE *MDM4* COM O SNP RS10900596



Em negrito está destacado a região de interação entre o miR-1257 e 3'UTR do mRNA de *MDM4* e em vermelho está destacado o SNP rs10900596 T>C. A variante C do SNP em questão cria um sítio de ligação para o miR-1257 em 3'UTR do gene *MDM4* enquanto a variante T não possui complementariedade com a mesma região desse gene. Fonte: O Autor (2019).

A reação de PCR com o intuito de utilizar os insertos para a ligação com o vetor foi realizada utilizando 0,5 µL de DNA de cada linhagem, tampão de PCR High Fidelity 1X (Invitrogen), 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 pmoles dos iniciadores e 0,8 U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, totalizando 50 µL de reação. As condições de ciclagem são as mesmas descritas na TABELA 3 do item 4.3.

Os resultados da amplificação foram verificados em gel de agarose 1% corados com Unisafe 20.000x com corrida eletroforética a 80V por 50 minutos.

Para aumentar a quantidade de produto, foi realizada uma nova PCR (nos mesmos moldes que a primeira) mas utilizando o próprio produto da PCR anterior

como amostra. O resultado da amplificação foi verificado em gel de agarose 1% corado com UniSafe 20.000x com corrida a 80V por 50 minutos.

O produto da PCR foi purificado utilizando 3 métodos diferentes. O kit PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) foi utilizado tanto para purificar direto do produto de PCR quanto extraído e purificando a partir de gel de agarose. O terceiro método utilizado foi o *Freeze and Squeeze*. Nesse método, o DNA foi extraído e purificado a partir do gel de agarose por meio de congelamento e sucessivas etapas de centrifugação e trituração do gel. As amostras foram precipitadas utilizando 1/10 do volume de acetato de sódio 3,0 M (pH 5,2) e 3 volumes de etanol absoluto (95-100%) que foram deixadas no freezer -20°C *overnight*. No dia seguinte, após serem centrifugadas por 15 minutos a máxima velocidade, o sobrenadante foi descartado e adicionado 0,5mL de etanol 70% para nova centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 20 µL de Milli-Q H₂O para eluir o DNA.

As amostras purificadas foram digeridas da mesma forma que o plasmídeo como descrito no item 4.4.1.

4.4.3 Ligação

A ligação entre o vetor pmirGLO e os dois insertos (rs10900596T ou rs10900596C) digeridos foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) por 16 horas a 16 °C. Em um total de 10 µL reação foi adicionado 2,5 U de T4 DNA ligase (Thermo Scientific), 1X T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific), inserto e vetor digeridos e purificados em uma proporção de 5:1. O produto da ligação foi então adicionado à cepa DH10B competente seguido de protocolo de transformação como já foi descrito. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de petri com meio LA com ampicilina e colocadas em estufa a 37°C por 16 horas. As colônias isoladas foram selecionadas para ser realizada uma PCR de colônia para confirmar a clonagem.

Para a PCR de colônias foi utilizado tampão 1X de PCR (Invitrogen), 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 U Taq Platinum I (Invitrogen) e 0,5 pmoles de iniciadores específicos, em um total de 10 µL de reação. A ciclagem utilizada é a mesma da descrita na TABELA 3 do item 4.3 com a diferença que o primeiro passo é mais longo (10 minutos), para que ocorra o rompimento da parede celular da bactéria.

A primeira verificação se ocorreu a clonagem foi feita em gel de agarose 1% corado com UniSafe e corrida a 80 V por 50 minutos. A segunda confirmação foi feita por sequenciamento de Sanger.

4.5 Extração de RNA

Para a extração de RNA das linhagens MDA-MB-231, ZR-75-1 e MCF-7 foi utilizado 1ml de TRIzol (gelado) para uma quantidade de 5-10 milhões de células de cada linhagem previamente cultivada e tripsinizada. Seguiu-se com a adição de 200 μ L de clorofórmio em cada amostra e centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa incolor foi separada das demais fases e adicionado 500 μ L de álcool isopropílico para a precipitação do RNA. Esta etapa foi deixada no gelo por 10 minutos e em seguida centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado a cada tubo 1,5ml de etanol 75% e centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos para descartar o sobrenadante. O pellet foi dissolvido em 20 μ L de água livre de RNase.

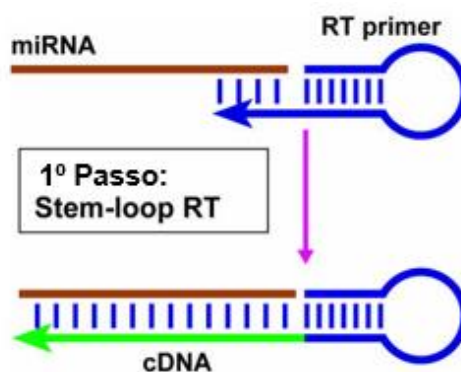
A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop Spectrophotometer 2000, Thermo Scientific) o qual indica os padrões de pureza e contaminação do material de acordo com parâmetros de absorbância. Os RNAs absorvem comprimentos de onda por volta de 260nm, as proteínas absorvem próximo a 280nm e outros componentes orgânicos absorvem em torno de 230nm. A relação Abs260nm/Abs280nm indica contaminação com proteínas e a relação Abs260nm/Abs230nm indica a contaminação com outros componentes orgânicos. O produto final da extração foi armazenado em freezer - 80°C.

4.6 Transcrição Reversa de miRNA

Os *primers* para obter cDNA do miRNA-1257 e dos RNAs endógenos SNORD44 e SNORD48 (*Small nucleolar RNA*) por transcrição reversa foram desenhados utilizando a abordagem de *stem-loop* RT (FIGURA 6) (CHEN *et al*, 2005). Nesse sistema, os *primers* possuem uma região em *loop* constante e uma região complementar específica à região *seed sequence* 5' (de 6 bases) de cada miRNA (AOKI, 2014). A sequência do miRNA maduro foi retirada do banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

As sequências dos *stem-loop RT primers* que foram sintetizados pela empresa IDT (Integrate DNA Technologies), estão descritos na TABELA 6.

FIGURA 6 – MECANISMO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DE MIRNAS POR STEM-LOOP RT PRIMERS



Representação da obtenção de cDNA de miRNAs utilizando *stem-loop RT primers*. Esses *primers* se ligam na ponta 3' dos miRNAs para serem transcritos reversamente. Adaptado de CHEN *et al.* 2005.

TABELA 6 – STEM-LOOP RT PRIMERS UTILIZADOS PARA A TRANSCRIÇÃO REVERSA

<i>primers stem-loop RT</i>	Sequências
mirRNA-1257	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGC ACTGGATACGACGGTCAG 3'
SNORD 44	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGC ACTGGATACGACAGTCAGTTAG 3'
SNORD 48	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGC ACTGGATACGACGGTCAG 3'

Fonte: O autor (2019)

A reação de transcrição reversa dos miRNAs foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific). Para o teste de eficiência dos *primers* (item 4.7) foi utilizado um *pool* de RNA das linhagens MDA-MB-231, ZR-75-1 e MCF-7 em uma concentração total de 1µg (333 ng de cada linhagem). Em um total de 20 µL de reação, foi adicionado 2 µL de 10x RT *Buffer*, 0,5 µL dos *primers stem-loop RT* 10 µM, 1 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 0,25 µL de RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 5,25 µL de água livre de RNase e 10 µL do pool de RNA. A ciclagem utilizada está descrita na TABELA 7:

TABELA 7 – CICLOS DA PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DE miRNAs

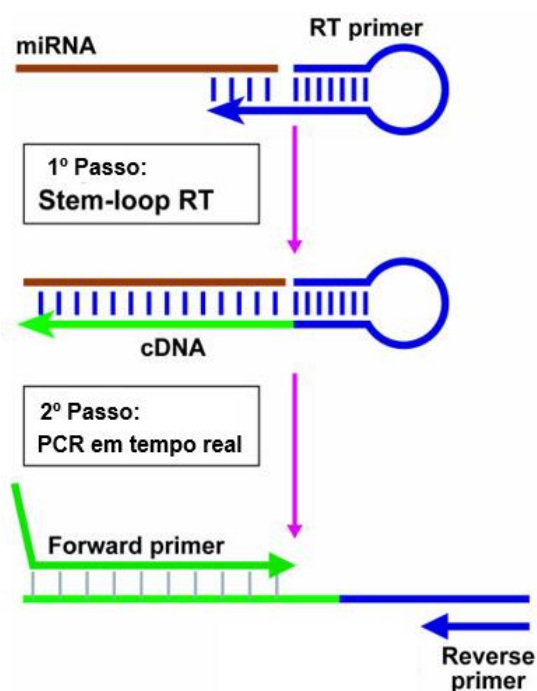
Temperatura	Tempo
25°C	10 minutos
37°C	120 minutos
85°C	5 minutos
4°C	∞

Fonte: O Autor (2019)

4.7 Determinação da concentração de cDNA e eficiência dos *primers* de qRT-PCR

Foram sintetizados pela IDT (Integrate DNA Technologies), um sistema de *primers* para qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real) (TABELA 8) em que o *forward* é específico para o miRNA e o *reverse* é chamado de universal pois é complementar à região originada do *stem-loop* na transcrição reversa (CHEN et al. 2005; AOKI, 2014) (FIGURA 7). O *primer forward* específico para o microRNA-1257 será utilizado para quantificar através de qRT-PCR este microRNA nas diferentes linhagens tumorais de mama. Os RNAs nucleolares (snoRNAs) Snord44 e Snord48, pequenos RNAs endógenos, serão utilizados para normalizar a reação de quantificação (AOKI, 2014).

FIGURA 7 – MECANISMO DE qRT-PCR DE miRNAs UTILIZANDO A ABORDAGEM STEM-LOOP



Demonstração da obtenção de cDNA de miRNAs pela abordagem de stem-loop RT e esquema de qRT-PCR utilizando esse cDNA. Adaptado de CHEN *et al.* 2005.

TABELA 8 – PRIMERS PARA qRT-PCR

Primers para qRT-PCR	Sequências
mirRNA-1257 <i>forward</i>	5'-AGTGAATGATGGGTTCTGACC-3'
Snord44 <i>forward</i>	5'-AATGCTGACTGAACATGAAGGTCTT-3'
Snord48 <i>forward</i>	5'-ACTCTGAGTGTGTCGCTGATGC-3'
Reverse universal para miRNAs	5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'

Fonte: O autor (2019)

Com o objetivo de avaliar a eficiência dos *primers* de qRT-PCR específicos sintetizados e a concentração ideal de cDNA para ser utilizada nos ensaios de expressão, foi realizada uma curva de diluição de cDNA partindo de uma concentração inicial de cDNA 1.000 ng/uL (considerando uma eficiência de 100% da reação de transcrição reversa) seguido de diluições seriadas de 1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 derivadas de um *pool* de RNA das linhagens celulares MDA-MB-231, ZR-75-1 e MCF-7. Já os *primers* de qRT-PCR foram diluídos para 10 µM. As reações foram submetidas à amplificação pela técnica de qRT-PCR em equipamento Viia-7 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem).

Para a quantificação do produto formado durante a reação de amplificação, foi utilizado o reagente PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystem). Este reagente possui intensidade de emissão de fluorescência baixa, mas quando se liga à dupla fita de DNA essa fluorescência basal é significativamente aumentada.

Em uma placa MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystem), foram aplicados em cada poço uma reação de 10 µL (em triplicata para cada diluição), sendo 5,5 µL do PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 0,25 µL do *primer forward* para qRT-PCR específico, 0,25 µL do *primer reverse* universal de miRNAs para qRT-PCR e 4 µL de cDNA diluído. Além disso, foram realizadas reações controles de amplificação na ausência de cDNA chamadas de NTC (*Non-template Control*) e controles negativos da transcrição reversa (RT-), em que não foi adicionado a enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase na reação. As condições de ciclagem estão descritas na TABELA 9:

TABELA 9 - CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR qRT-PCR

Etapas do ciclo	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Ativação	95°C	10 minutos	1
Desnaturação	95°C	15 segundos	40
Extensão	60°C	1 minuto	1

Fonte: O Autor (2019)

Após a amplificação, foi gerada uma curva de regressão linear a partir dos valores de ciclos *threshold* (Ct) e das diferentes concentrações de cDNA. Foi realizado um cálculo de correlação entre as variáveis (R^2) e a eficiência (Ef) dos *primers stem-loop* RT foram calculadas utilizando o coeficiente angular (*slope*) da curva padrão através da fórmula:

$$Ef = [(10^{(-1/slope)}) - 1]$$

4.8 Teste de confluência da linhagem ZR-75-1

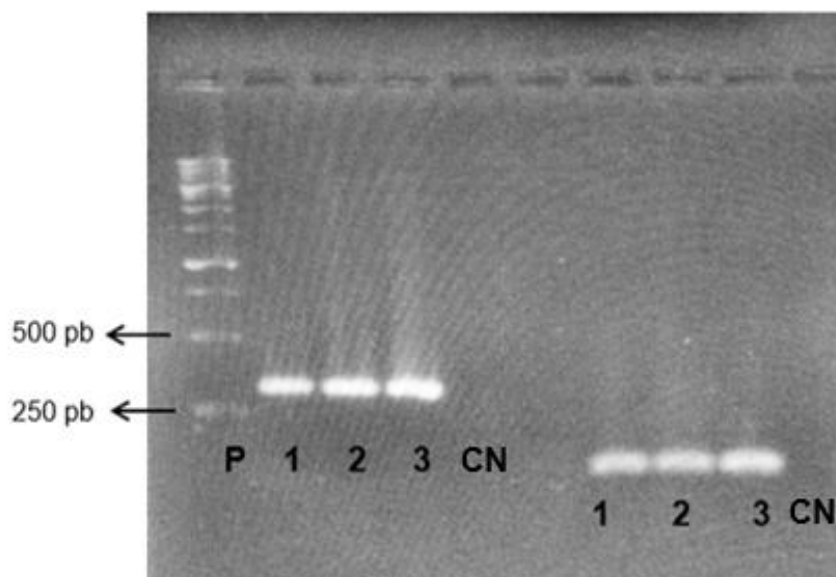
Para determinar o melhor número de células a ser utilizada no ensaio de transfecção foram testadas em placa de 48 poços a confluência de células da linhagem ZR-75-1 após 24 e 48 horas com diferentes densidades. Foram aplicadas na placa em triplicada os seguintes número de células: 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 células/poço. A placa foi mantida em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação dos Insertos

A FIGURA 8, mostra o resultado da PCR para amplificação de 332 pb e 136 pb de 3'UTR, regiões que contém o SNPs rs10900596 do gene *MDM4*. Ambos os pares de iniciadores usados possibilitaram uma amplificação específica, como pode ser visualizado pela presença de uma única banda. As posições das bandas, abaixo de 250 pb e entre 250 pb e 500 pb, indicam que o tamanho do amplicon é o esperado.

FIGURA 8 – ELETROFORESE DA PCR PARA TESTAR OS INICIADORES SINTETIZADOS



P- Peso molecular 1kb. Amostras: 1-MCF-7, 2-SKBR, 3- ZR-75-1, CN- controle negativo. Fonte: O autor (2019).

O próximo passo foi realizar uma reação de sequenciamento para visualizar o SNP de interesse entre os iniciadores sintetizados.

5.2 Sequenciamento das Linhagens

A princípio a proposta deste estudo era trabalhar com as linhagens MDA-MB-231 (T/T) e MCF-7 (C/C) que já haviam sido genotipadas para o SNP rs10900596. Porém, tanto no primeiro sequenciamento (utilizando o par de iniciadores B – TABELA 2), quanto nos outros dois que foram realizados (dessa vez com o par de iniciadores

A – TABELA 1), as amostras MCF-7, de extrações de anos diferentes (2014 e 2019), mostraram ambas serem heterozigotas (T/C) para o SNP em questão e não homozigotas (C/C) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS COM AMOSTRAS DA LINHAGEM MCF-7



SNP- Posição do SNP rs10900596 em 3'UTR de *MDM4* em linhagens MCF-7. Amostras: 1- MCF-7 (2014) forward do 1º sequenciamento com par de iniciadores B, 2- MCF-7 (2019) forward do 2º sequenciamento com o par de iniciadores A, 3- MCF-7 (2014) forward do 2º sequenciamento com o par de iniciadores A, 4- MCF-7 (2019) forward do 3º sequenciamento com o par de iniciadores A.

As linhagens MDA-MB-231 de duas extrações diferentes (2016 e 2019) foram sequenciadas duas vezes, o primeiro sequenciamento utilizando o par de iniciadores B e no segundo sequenciamento utilizando o par de iniciadores A. Em ambos os sequenciamentos, foi constatado que a linhagem de células MDA-MB-231 era realmente homozigota (T/T) como mostra na FIGURA 10:

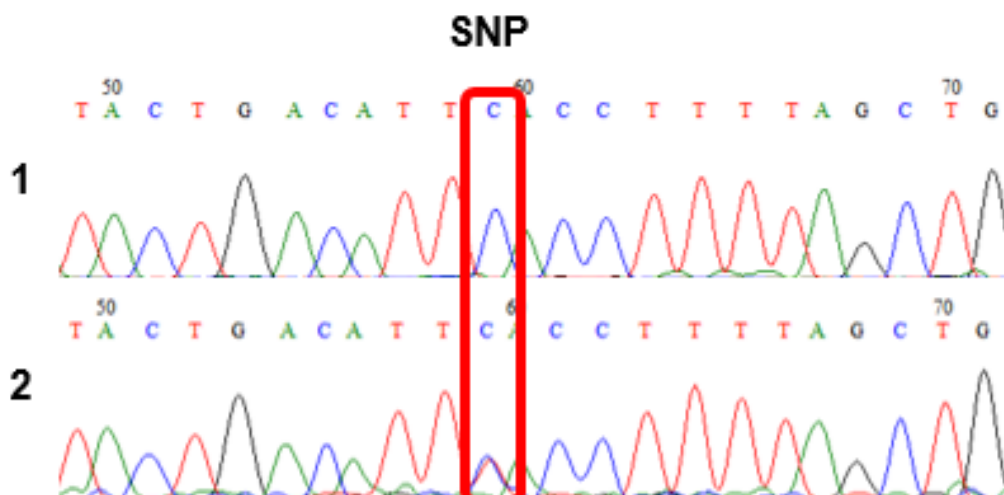
FIGURA 10 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA LINHAGEM MDA-MB-231



SNP- Posição do SNP rs10900596 em 3'UTR de *MDM4* em linhagens MDA-MB-231. Amostras: 1- MDA-MB-231 (2016) forward do 1º sequenciamento com par de iniciadores B, 2- MDA-MB-231 (2019) forward do 2º sequenciamento com o par de iniciadores A, 3- MDA-MB-231 (2016) forward do 2º sequenciamento com o par de iniciadores A.

Como a linhagem MCF-7 era heterozigota (T/C), foi necessário escolher outra linhagem homozigota (C/C) para dar continuidade ao trabalho. Para isso foram sequenciadas para o SNP de interesse as linhagens SKBR3 e ZR-75-1. O resultado do sequenciamento utilizando o par de iniciadores A (TABELA 1) está demonstrado na FIGURA 11:

FIGURA 11 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DAS LINHAGEM ZR-75-1 E SKBR3



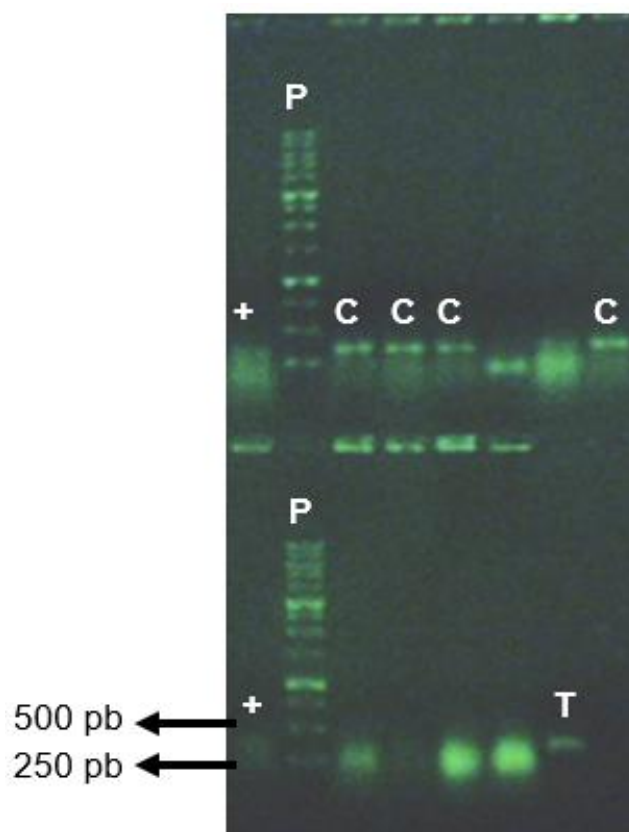
1-Sequenciamento da linhagem ZR-75-1 para o SNP rs10900596 do gene *MDM4*, 2- Sequenciamento da linhagem SKBR3 para o SNP rs10900596 do gene *MDM4*. Em vermelho a posição do SNP.

Como na linhagem SKBR3 onde se localizava o SNP de interesse a reação de sequenciamento não apresentou um resultado tão esclarecedor como aquele obtido pela reação de sequenciamento realizado a partir da linhagem ZR-75-1, o resultado da reação de sequenciamento (demonstrado na FIGURA 11), indicou que a linhagem ZR-75-1 é homozigota C/C para o SNP de interesse.

5.3 Obtenção dos Clones

Após a reação de digestão sequencial utilizando as enzimas *NheI* e *Sall* e a reação de ligação entre os insertos e o plasmídeo digeridos, optou-se por utilizar todo o volume da ligação (10 µl) de cada alelo para realizar a transformação das cepas DH10B. Tão logo as colônias cresceram, foi realizada a PCR de colônias como já descrito. O resultado da PCR de colônias foi visualizado em gel de agarose, como mostra FIGURA 12:

FIGURA 12 – RESULTADO DA CLONAGEM EM GEL DE AGAROSE 1%



+: Controle positivo (plasmídeo+ligase), P: Marcador de peso molecular 1kb, C: clones ZR-75-1 rs10900596C, T: clone MDA-MB-231 rs10900596T.

Foi possível observar pelo menos 4 clones do alelo C (linhagem ZR-75-1) e apenas 1 clone do alelo T (linhagem MDA-MB-231) com fragmentos na altura esperada pela utilização do par de *primers* A (332pb).

5.4 Sequenciamento dos clones

Após a eletroforese da PCR de colônias com os produtos da ligação, foram selecionadas as amostras cuja banda apresentou o tamanho esperado (332 pb) pela utilização do par de *primers* A (TABELA 1) para uma nova confirmação da clonagem por sequenciamento. Foram utilizados os mesmos *primers* para sequenciar tanto a fita direta quanto a fita reversa e o resultado que mostrou que ambos os insertos contendo o SNP rs100900596 (T ou C) haviam sido clonados no vetor pmirGLO está demonstrado na FIGURA 13:

FIGURA 13 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

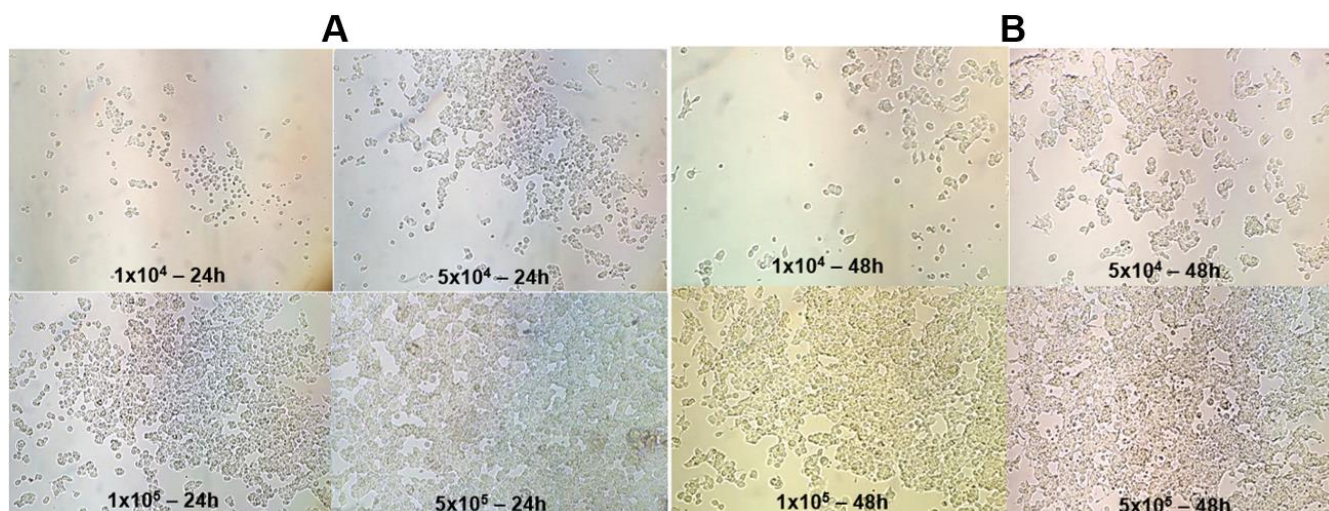


- 1-Sequenciamento do clone contendo a variante C do SNP rs10900596 (Linhagem ZR-75-1),
 2- Sequenciamento do clone contendo a variante T do SNP rs10900596 (Linhagem MDA-MB-231). Em vermelho a posição do SNP.

5.5 Teste de Confluência

Após 24 horas em que os diferentes números de células da linhagem tumoral de mama ZR-75-1 foram aplicados na placa de 48 poços, o número que apresentou confluência próxima a 70% foi a de 1×10^5 células/poço. Após 48 horas este mesmo número de células apresentou a confluência desejada próxima de 100%. O número de células 1×10^4 células/poço apresentou confluência muito baixa tanto em 24 horas quanto em 48 horas. Já os poços com 5×10^5 células/poço logo em 24 horas já apresentavam confluência próxima a 100%, sendo que em 48 horas as células estavam crescendo umas sobre as outras (FIGURA 14).

FIGURA 14 – TESTE DE CONFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM TUMORAL DE ZR-75-1



A- Células de ZR-75-1 em diferentes números de células por poço após 24h de plaqueamento; B- Células de ZR-75-1 em diferentes números de células por poço após 48h de plaqueamento. Fonte: O autor (2019).

5.6 Eficiência dos *primers* de qRT-PCR

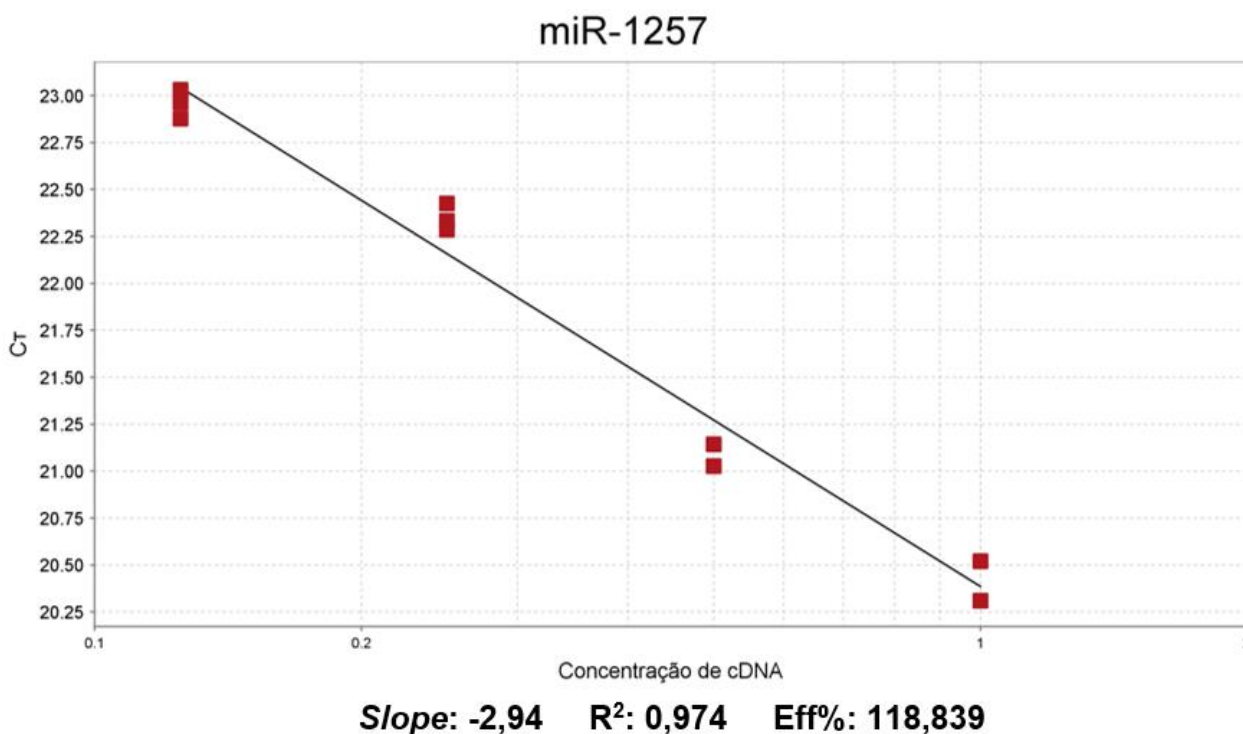
Após a qRT-PCR com o produto da transcrição reversa diluído em diferentes concentrações foi possível determinar a eficiência da combinação entre o *primer reverse* universal para miRNAs e os *primers forward* para o miR-1257 (GRÁFICO 1), Snord44 (GRÁFICO 2) e Snord 48 (GRÁFICO 3).

Para isso foi gerada uma curva de regressão linear a partir dos valores de Ct (ciclos *threshold*) e das diluições de cDNA provenientes do *pool* de linhagens. Foi utilizado o *pool* de linhagens com o objetivo de identificar a expressão dos alvos nas

amostras, independente da linhagem. A análise da eficiência foi feita utilizando a inclinação da reta (*slope*) da curva padrão e foi calculada pela fórmula $Ef = [(10^{(-1/slope)}) - 1]$. Valores de *slope* próximos de -3,32 indicam uma eficiência de amplificação de 100% da PCR ideal. Eficiência acima de 100% indica que o ciclo *threshold* de amostras com o dobro da concentração de cDNA apresentou variação menor do que 1 (AOKI, 2014). Outro valor importante da qualidade é o do coeficiente de correlação (R^2). Este indica o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais dos Ct de amostras. Um valor de 1,00 indica um ajuste perfeito entre a linha de regressão e os valores individuais do número de ciclos.

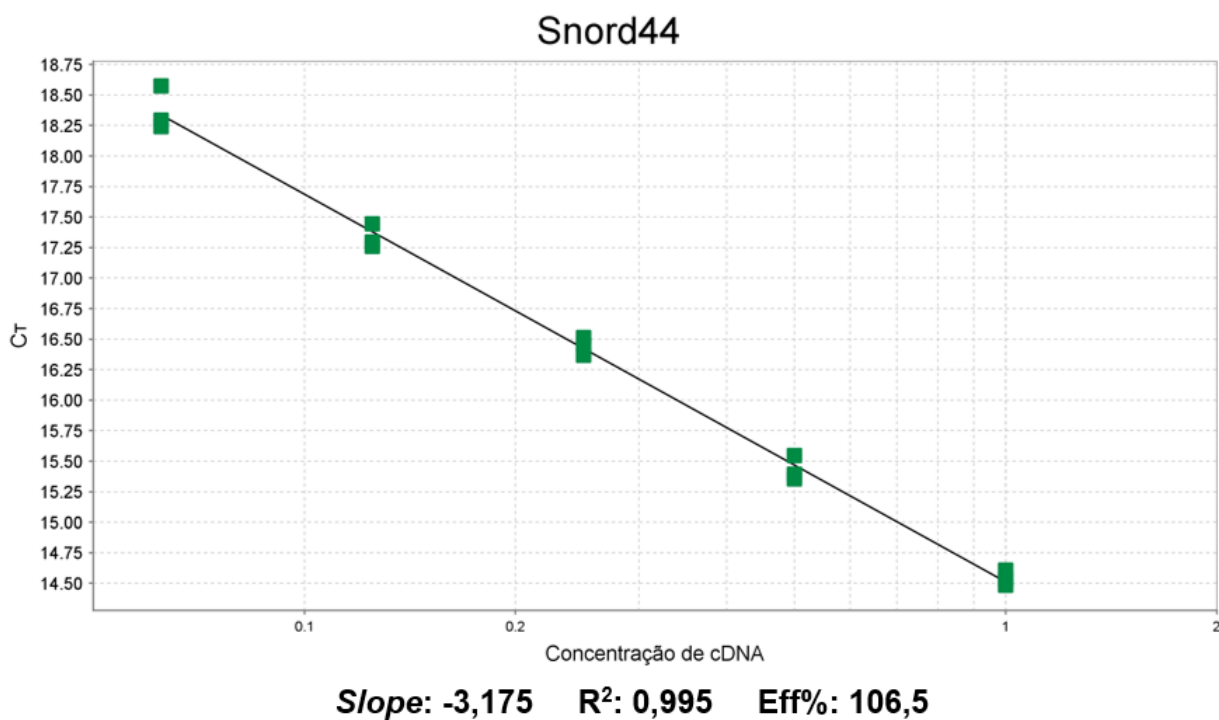
Nos casos do microRNA-1257 e Snord48 foram omitidos os três pontos referentes a triplicada da concentração inicial de 1.000 ng/μL devido a disparidade entre eles. Para o Snord44 não foi necessária nenhuma omissão. Tendo em vista esse resultado, para as próximas etapas serão utilizados diluições maiores do cDNA.

GRÁFICO 1 - CURVA DE REGRESSAO LINEAR DO MIRNA-1257



Curva de regressão linear a partir dos valores de Ct (ciclos *threshold*) e da concentração de cDNA para o miR-1257. FONTE: O autor (2019).

GRÁFICO 2 - CURVA DE REGRESSÃO LINEAR DO SNORD44



Curva de regressão linear a partir dos valores de Ct (ciclos *threshold*) e da concentração de cDNA para o Snord44. FONTE: O autor (2019).

GRÁFICO 3 - CURVA DE REGRESSÃO LINEAR DO SNORD48



Curva de regressão linear a partir dos valores de Ct (ciclos *threshold*) e da concentração de cDNA para o Snord48. FONTE: O autor (2019).

6 DISCUSSÃO

As técnicas de clonagem e sequenciamento foram usadas amplamente nesse trabalho. As diversas etapas que antecedem a clonagem e as subsequentes puderam ser exploradas e foi possível escolher a melhor metodologia para obtenção de grande quantidade de DNA para clonagem. Foi utilizado o kit PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) para purificar o DNA tanto a partir do gel de agarose da corrida eletroforética quanto direto do produto de PCR. Desses dois métodos, o que apresentou melhor rendimento de DNA purificado foi a partir do produto de PCR, porém, ainda sim, apresentou menor rendimento que o método conhecido como *Freeze and Squeeze*. Nesse método, o DNA é extraído e purificado a partir do gel de agarose por meio de congelamento e sucessivas etapas de centrifugação e trituração do gel.

Além disso, foi possível com o sequenciamento, identificar genotipagens que anteriormente apresentavam resultados equivocados. Foi o caso da linhagem MCF-7, que a princípio estava sendo considerada como homozigota C/C para o SNP rs10900596 do gene *MDM4* quando na realidade essa linhagem é heterozigota T/C para esse SNP. A obtenção dessa informação foi de suma importância para a condução desse trabalho, uma vez que pretende-se usar essa região para testar o sítio de ligação com o microRNA-1257, preconizado através da bioinformática.

Métodos de integração de dados em larga escala utilizando ferramentas de bioinformática vem possibilitando reconhecer possíveis vias regulatórias e prever moléculas regulatórias (BARTEL, 2009; LIU *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2016). Como exemplo dessas moléculas regulatórias, temos os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs endógenos não codificantes que exercem uma importante função regulatória pós transcricional (BARTEL, 2009). Os miRNAs geralmente se ligam à região 3' UTR dos mRNAs do alvo, inibindo a tradução da proteína e causando algum grau de degradação do mRNA (CROCE, 2009; LIAG *et al.*, 2016). Com o crescente interesse nas funções biológicas dos microRNA, são necessários métodos adequados para quantificação dessas moléculas regulatórias, pois se tratando de moléculas muito curtas (17-24 nt), não são capazes de comportar um par de *primers* de tamanho padrão (normalmente 20 nt cada) (KRAMER, 2011). Uma abordagem desenvolvida para contornar essa situação, são os *stem-loop RT primers*, que servem não só para

microRNAs mas também para outros tipos de pequenos RNAs como os RNAs de interferência (siRNA) e os pequenos RNAs nucleolares (snoRNA) (CHEN *et al.*, 2005). Os RT-*primers* possuem uma região em *loop* altamente estável e uma região complementar específica à região *seed sequence* 5' (de 6 bases) do miRNA que aumentam o comprimento do cDNA alvo, nesse caso. O *primer forward* para a qRT-PCR adiciona mais nucleotídeos que otimizam sua temperatura de fusão (T_m) e melhoram a especificidade do ensaio. O *primer reverse* possui uma sequência universal para microRNAs que interrompe o stem-loop (CHEN *et al.*, 2005; KRAMER, 2011; AOKI, 2014). Os *primers* desenhados utilizando essa abordagem para quantificar o miRNA-1257 foram testados e se mostraram eficientes ao dobrar o número de cópias a cada ciclo, podendo ser utilizados para as próximas etapas desse estudo.

Quando polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) ocorrem em sítios de ligação de miRNAs – podendo assim, ser chamado de miRSNP – na região 3'UTR de mRNAs, estes podem alterar a afinidade do microRNA com seu gene alvo (CHEN *et al.*, 2008). As consequências da mudança no sítio de ligação do miRNA irão depender da função exercida pelo gene alvo. Diversos estudos vêm investigando o papel de miRSNPs como fator de risco para diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (CROCE, 2009; MULRANE *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2016).

Como exemplo, temos que vários estudos vêm associando o SNP rs4245739 A>C do gene *MDM4* a diminuição do risco de desenvolver câncer de mama (LIU *et al.*, 2013; GANSIMO *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016). Esse SNP, que também tem um estudo sendo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, teve os genótipos AC e CC associados com a diminuição do risco ao câncer de mama comparados ao genótipo AA em dois casos-controle na China (LIU *et al.*, 2013). O SNP rs4245739 está localizado no sítio de ligação para o miR-887-3p e o miR-191-5p. Em estudo sobre o câncer de próstata cuja abordagem foi similar com a que vem sendo empregada neste trabalho, os pesquisadores observaram a afinidade de ligação do miR-887 com o mRNA do gene *MDM4* portador da variante C, através de ensaio com gene repórter luciferase (STEGEMAN *et al.*, 2015). No câncer de ovário, Wynendaele *et al.* (2010) demonstraram que o miR-191-5p possui maior afinidade pelo alelo C do SNP rs4245739 do gene *MDM4*, resultando em níveis mais altos de expressão de MDM4 a partir do alelo A (WYNENDAELE *et al.*, 2010).

Enquanto alguns SNPs, como o rs4245739, tenham seus papéis na patogênese do câncer de mama e de outros tipos de neoplasias malignas estudados, ainda existem muitas predições sobre associações entre miRNAs e SNP obtidos por dados robustos de bioinformática que necessitam de validações.

7 CONCLUSÃO

Os experimentos realizados por esse estudo permitiram a confirmação de genotipagens prévias do SNP rs10900596 do gene *MDM4*, podendo assim definir corretamente as linhagens que serão usadas no ensaio de transfecção para a validação funcional dos dados obtidos através da bioinformática. A obtenção dos clones dos alelos T e C para serem utilizados em ensaio de transfecção, o desenho de *primers* pela abordagem de *stem-loop* eficientes para quantificar o miR-1257 nas linhagens tumorais de mama também são pontos importantes alcançados até o momento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, M. N. Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em células pulmonares e pancreáticas transformadas pelo oncogene *KRAS*. 2014. 157p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 28–97, 2004.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v.136, p. 215-233, 2009.

BERBERICH, S. J. Mdm2 and MdmX Involvement in Human Cancer. **Springer Link**, p. 263-280, 2014.

BERINDAN-NEAGOE, I. *et al.* MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 5, p. 311–336, 2014.

BHARGAVA, R. *et al.* CK5 Is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. **Am J Clin Pathol**, v. 130(5), p. 724-730, 2008.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v.68, p.394-424, 2018.

CASTRO, M.A.A. *et al.* Regulators of genetic risk of breast cancer identified by integrative network analysis. **Nature Genetics**, v. 48, p. 12–21, 2016.

CHEANG, M. C. U. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 101, p. 736–750, 2009.

CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33(20), 2005.

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

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.

DANOVI, D. *et al.* Amplification of Mdmx (or Mdm4) Directly Contributes to Tumor Formation by Inhibiting p53 Tumor Suppressor Activity. **Mol Cell Biol.**, v.24, p.5835–5843, 2004.

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.

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 long-term 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.

FRIEDMAN, R. C. *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res.**, v. 19, p. 92-105, 2009.

GAMAZON, E. R. *et al.* Genetic architecture of microRNA expression: implications for the transcriptome and complex traits. **Am. J. Hum. Genet**, v.90, p.1046–63, 2012.

GANSIMO, 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.

HAUPT, S. *et al.* The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 9(1), p. 53-61, 2017.

HAUPT, Y. *et al.* Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v.387, p.296-299, 1997.

HERSCHKOWITZ, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v.8, p-1, 2007.

HISAOKA, M.; MATSUYAMA, A; NAKAMOTO, M. Aberrant Calreticulin Expression Is Involved in the Dedifferentiation of Dedifferentiated Liposarcoma. **The American Journal of Pathology**, v. 180, p. 2076-2083, 2012.

HUANG, X. *et al.* Functional role of BTB and CNC Homology 1 gene in pancreatic cancer and its association with survival in patients treated with gemcitabine. **Theranostics**, v. 8, p. 3366-3379, 2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. A situação do câncer de mama no Brasil: Síntese de dados dos sistemas de informação. Ministério da Saúde, 2019.

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.

KAWAI, H. *et al.* RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. **Cancer Res**, v. 67, p. 6026-6030, 2007.

KRAMER, M. F. RT-qPCR STEM-LOOP para miRNAS. **Current protocols in molecular biology**, 2011.

LANE, D. P. p53, guardian of the genome. **Nature**, v.358, p. 15-16, 1992.

LAURIE, N. A. *et al.* Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. **Nature**, v. 444, p. 61-66, 2006.

LEVA, G.; GAROFALO, M.; CROCE, C. M. microRNAs in cancer. **Annu Rev Pathol.**, v. 9, p. 287-314, 2013.

LIANG, D. *et al.* Genetic Variants in MicroRNA Biosynthesis Pathways and Binding Sites Modify Ovarian Cancer Risk, Survival, and Treatment Response. **Cancer Research**, v. 70, 2010.

LIANG, D. *et al.* Genetic Variants in MicroRNA Biosynthesis Pathways and Binding Sites Modify Ovarian Cancer Risk, Survival, and Treatment Response. **Cancer Research**, v. 70, 2010.

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

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.

MICHAEL, D., OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. **Seminars in Cancer Biololy**, v 13(1), p. 49-58, 2003.

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

NIELSEN, T. O. *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like. **Clinical Cancer Research**, v. 10(16), p. 5367-5374, 2004.

PENG, Y.; CROCE, C.M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v.1, p.15004, 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.

PERRY, M. E. The Regulation of the p53-mediated Stress Response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2(1), 2010.

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

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.

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

SALZMAN, D.W., WEIDHAAS, J.B. SNPping 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.

SHADFAN, M.; LOPEZ-PAJARES, V.; YUAN, Z. M. MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53. **Transl Cancer Res.**, v.1, p.88-89, 2012.

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

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.

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.

STRATTON, M. R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. **Science**, v. 331, p-1553-1558, 2011.

SUN, G. *et al.* SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. **RNA**, v. 15, p. 1640-1651, 2009.

THERMO SCIENTIFIC. *DoubleDigest Calculator-Thermo Scientific*. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>> Acesso em: 15 fev. 2019.

VODUC, K. D. *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, p. 1684-1691, 2010.

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.

WELTER, D. *et al.* The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. **Nucleic acids research**. v.42, p.1001-1006, 2014.

WINTER, J. *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, 228, 234, 2009.

WYNENDAELE, J, *et al.* An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. **Cancer Research**, v. 70(23), 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.

YUAN, P. *et al.* Identification of Differently Expressed Genes with Specific SNP Loci for Breast Cancer by the Integration of SNP and Gene Expression Profiling Analyses. **Pathology and Oncology Research**, 2014.

ZIEBARTH J. D.; BHATTACHARYA, A.; CUI, Y. Integrative Analysis of Somatic Mutations Altering MicroRNA Targeting in Cancer Genomes. **PLoS One**, v.7, p. e47137, 2012.