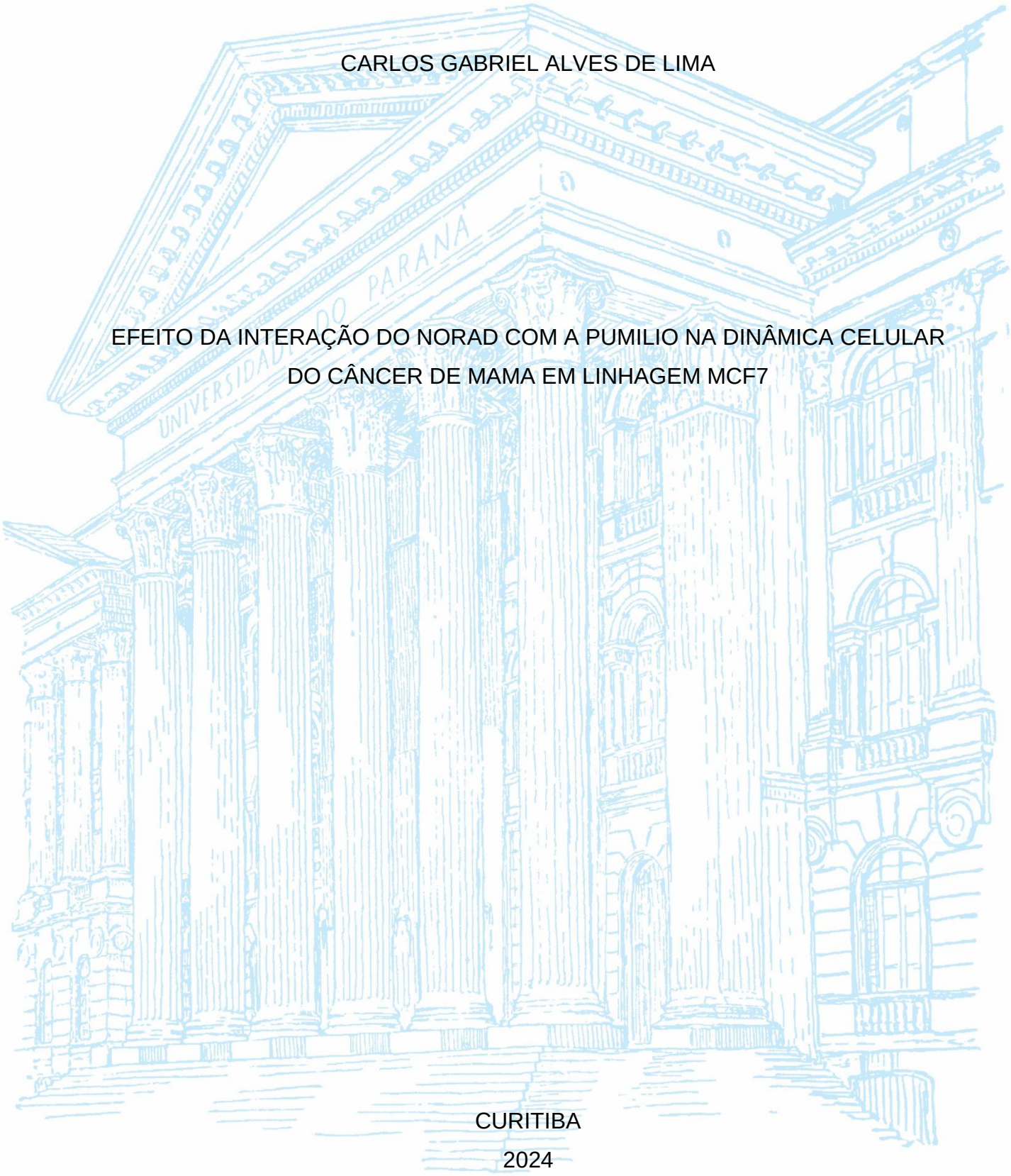
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS GABRIEL ALVES DE LIMA



# EFEITO DA INTERAÇÃO DO NORAD COM A PUMILIO NA DINÂMICA CELULAR DO CÂNCER DE MAMA EM LINHAGEM MCF7

CURITIBA

2024

CARLOS GABRIEL ALVES DE LIMA

# EFEITO DA INTERAÇÃO DO NORAD COM A PUMILIO NA DINÂMICA CELULAR DO CÂNCER DE MAMA EM LINHAGEM MCF7

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profª. Drª. Daniela Fiori Gradia

CURITIBA

2024

## AGRADECIMENTOS

À minha família, que desde criança me incentivou a seguir meus sonhos. Especialmente à minha mãe, Dona Joaninha (*in memoriam*), que mesmo com todas as adversidades da vida, nunca deixou de depositar suas esperanças em mim. Que vibrou e chorou muito de orgulho quando seu filho, o primeiro da família, conquistou uma vaga na UFPR. Serei eternamente grato por tudo e tenho muito orgulho de ser seu filho. Ao meu pai, que mesmo sem compreender plenamente a diferença entre Biomedicina e Medicina, sempre me encorajou a seguir em frente. Às minhas irmãs, Lucimara, que vibra com cada conquista minha e sempre esteve ao meu lado, e Miriam, que me ajudou a superar os momentos de tristeza após a partida de nossa mãe, transmitindo força e confiança, sempre confiando em mim e no meu potencial. Amo todos vocês!

Aos meus familiares e amigos, Tia Maria, André, Dylan, Juliano e Clara, que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Sou imensamente grato pelo carinho e apoio de vocês.

À Profª. Drª. Daniela Fiori Gradia, minha orientadora, agradeço profundamente por sua dedicação, paciência e apoio ao longo desta jornada. Sua confiança em minhas ideias e seu incentivo constante foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal. Obrigado por criar um ambiente acolhedor para minhas dúvidas e teorias, sempre com um sorriso no rosto. Sua amizade e confiança me deram a autoconfiança necessária para seguir meu sonho de ser cientista.

À Profª. Drª. Jaqueline Carvalho de Oliveira, minha segunda orientadora da vida e da graduação, que despertou em mim ainda mais admiração pela Genética, com sua didática excepcional e personalidade ímpar. Obrigado por me acolher durante um momento desafiador de pandemia e abrir as portas do LabCHO para mim. Sua generosidade e orientação fizeram toda a diferença.

À Ma. Cristiane Muller, agradeço pela oportunidade de integrar seu trabalho, pelas valiosas reuniões e pela confiança em mim. Sua gentileza e dedicação foram fundamentais para meu desenvolvimento.

Aos colegas do LabCHO, agradeço pelo apoio nos momentos mais desafiadores e por suportarem minha energia em meio à pressão do TCC. Em especial, agradeço à Drª. Carla Royer, por seu suporte ao longo das minhas ICs; à Drª. Priscila Stricker, pelo auxílio na compreensão dos resultados e elaboração de

protocolos; e à Ma. Ana Carolina, por sua paciência e didática desde os meus primeiros passos no laboratório. Aos colegas Suelen, Iago, Jhon, Clayton, Guta, Carol e Alexandre, agradeço pelas risadas, conversas e aprendizados compartilhados. À Ana Luiza Mattana, eterna técnica do LabCHO, obrigado pelo suporte e pelos ensinamentos que levarei para a vida.

Aos amigos que tornaram essa jornada mais leve: Maria Eduarda, Laura Pacheco, Bruna Visnheski, Gabriel Salkovski, Sabrina Kurscheidt e Larissa Valandro. Obrigado pelo companheirismo, pelas risadas e pelos desabafos. Tenho certeza que essa jorna teria sido muito mais difícil sozinho. Vocês fizeram toda a diferença e têm um lugar especial no meu coração.

Ao meu namorado Bruno Knebel, agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos, acreditando nos meus sonhos e me apoiando incondicionalmente. Você é uma inspiração como profissional, amigo, filho e companheiro. Tenho muito orgulho de compartilhar minha vida com você. Amo você!

Agradeço à Drª. Ana Mion por proporcionar um estágio valioso no CHC-UFPR, onde aprendi práticas em biologia molecular que jamais esquecerei. Agradeço também aos colegas e ao Prof. Benoit Laurent, no Canadá, por me receberem de forma calorosa e por oferecerem experiências que transformaram minha vida acadêmica e pessoal. Meu sincero agradecimento a Lèa Ferreira, Salomé, Suzanne, Colin e José.

Agradeço aos professores que marcaram minha trajetória acadêmica, em especial às Profª. Drª. Djanira Veronez, Profª. Drª. Débora Klisiowicz e Profª. Drª. Edileusa Gerhardt, por serem exemplos de dedicação e excelência.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, participaram da minha jornada e contribuíram para a realização deste trabalho. Minha gratidão é infinita.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

*Cora Coralina*

## RESUMO

O carcinoma mamário é o tipo de câncer mais incidente entre mulheres, e sua principal causa de morte por neoplasia. Apresenta uma alta heterogeneidade molecular e clínica, o que o torna um grande desafio terapêutico. Dentre seus subtipos, o Luminal A é o mais frequente e menos agressivo, embora seja suscetível à recidiva e à resistência terapêutica. Pesquisas recentes têm desvendado o papel dos RNAs longos não codificantes (lncRNAs) na regulação de vias biológicas fundamentais, como o controle da proliferação celular, apoptose e estabilidade genômica. As proteínas PUMILIO, proteínas de ligação ao RNA (RBPs), foram descritas por regular positivamente a proliferação celular e instabilidade genômica no câncer. Em contrapartida, o lncRNA NORAD desempenha uma função crucial ao sequestrar essas proteínas, reduzindo sua atividade desregulada e prevenindo instabilidade cromossômica. Neste trabalho, investigamos os efeitos da superexpressão de duas formas do NORAD – selvagem e mutada – na linhagem celular de câncer de mama MCF7. A forma selvagem do NORAD apresentou um impacto significativo na redução da viabilidade (61%) e proliferação celular (55%), e da capacidade clonogênica (65%), reforçando seu papel regulador sobre PUMILIO. Em contrapartida, a forma mutada, que não possui os sítios de interação com as proteínas PUMILIO, demonstrou um efeito oposto na capacidade clonogênica, promovendo um aumento de 75% em relação ao controle. Esses achados sugerem que a interação NORAD/PUMILIO é essencial para a manutenção da estabilidade genômica e na supressão da progressão tumoral. A forma mutada, mesmo sem os sítios de interação, parece ter um impacto próprio, possivelmente devido a outras funções mediadas por suas extremidades 5' e 3'. Portanto, os resultados obtidos contribuem para o entendimento da função do NORAD no câncer de mama e abrem novas perspectivas para investigação mais aprofundada dos mecanismos moleculares subjacentes à ação do NORAD, incluindo a análise de alvos alternativos das proteínas PUMILIO e a exploração de outras vias de regulação.



Palavras-chave: NORAD; PUMILIO; lncRNAs; RBPs; câncer de mama.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women and the leading cause of death. It has a high degree of molecular and clinical heterogeneity, which makes it a major therapeutic challenge. Among its subtypes, Luminal A is the most common and least aggressive, although it is susceptible to recurrence and therapeutic resistance. Recent research has uncovered the role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the regulation of fundamental biological pathways, such as the control of cell proliferation, apoptosis and genomic stability. PUMILIO proteins are RNA-binding proteins (RBPs) that have been described for positively regulating cell proliferation and genomic instability in cancer. In contrast, the lncRNA NORAD plays a crucial role in sequestering PUMILIO proteins, reducing their deregulated activity and preventing chromosomal instability. In this study, we investigated the effects of overexpressing two forms of NORAD - wild-type and mutated - in the MCF7 breast cancer cell line. The wild-type form of NORAD had a significant impact on reducing viability (61%) cell proliferation (55%), and clonogenic capacity (65%), reinforcing its regulatory role on PUMILIO. In contrast, the mutated form, which lacks the sites of interaction with PUMILIO proteins, showed an opposite effect on clonogenic capacity, promoting a 75% increase compared to the control. These findings suggest that the NORAD/PUMILIO interaction is essential for maintaining genomic stability and suppressing tumor progression. The mutated form, even without the interaction sites, seems to have an impact of its own, possibly due to other functions mediated by its 5' and 3' ends. Therefore, the results obtained contribute to the understanding of NORAD's function in breast cancer and open new perspectives for further investigation of the molecular mechanisms underlying NORAD's action, including the analysis of alternative PUMILIO targets and the exploration of other regulatory pathways.



Keywords: NORAD; PUMILIO, RBPs; lncRNAs; Breast cancer.

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 9**
**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 12**
2.1 O CICLO CELULAR ..... 12
2.2 O CÂNCER ..... 13
2.3 CÂNCER DE MAMA ..... 14
2.4 RNAS LONGOS NÃO CODIFICANTES ..... 17
2.5 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA ..... 18
2.6 NORAD/PUMILIO ..... 21
**3 JUSTIFICATIVA ..... 22**
**4 OBJETIVOS ..... 24**
4.1 OBJETIVO GERAL ..... 24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 24
**5 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 25**
5.1 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS ..... 25
5.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA ..... 26
5.3 MINIPREP ..... 27
5.4 CULTIVO CELULAR ..... 27
5.5 TRANSFECÇÃO ..... 27
5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ..... 29
5.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR ..... 30
5.8 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA ..... 31
5.9 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA E RT-PCR ..... 32
5.10 PCR EM TEMPO REAL ..... 33
5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ..... 33
**6 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 34**
6.1 ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR ..... 34
6.2 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA ..... 35
6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA ..... 36
**7 CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 40**
**REFERÊNCIAS ..... 41**

## 1 INTRODUÇÃO

Alterações no ciclo celular previamente à mitose, processo que garante a proliferação celular e a manutenção dos organismos, podem levar à desregulação celular e à neoplasia, facilitando o desenvolvimento do câncer (KUMAR, 2018; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2019; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023). O câncer, um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças, é marcado pelo crescimento descontrolado de células devido ao acúmulo de mutações, e pode ser desencadeado por diversos fatores (KUMAR, 2018).

Na trajetória de desenvolvimento e progressão do câncer, algumas características isoladas ou em conjunto estão sempre presentes, e são denominadas marcas do câncer. Essas marcas caracterizam sua progressão, como evasão da apoptose, replicação ilimitada, insensibilidade a sinais de supressão de crescimento e angiogênese sustentada (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HANAHAN, 2022). Dentre os mais de 100 tipos de câncer caracterizados, o mais incidente em mulheres é o câncer de mama (WHO, 2024), excetuando-se o câncer de pele não melanoma.

O carcinoma mamário é o tipo de câncer que mais causa a morte de mulheres em todo o mundo, e é considerado uma doença heterogênea com diversos perfis e com alta complexidade clínica (INCA, 2023; WHO, 2024). Pode ser classificado por subtipos histológicos, expressão de receptores hormonais (ER, PR, HER2) e por características moleculares. Dentre as classificações, sua heterogeneidade é refletida em subtipos como Luminal A, Luminal B, HER2-positivo e Basal-like (triplo negativo), sendo os subtipos Luminal A e B, os mais frequente (TSANG; TSE, 2020; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021, 2021).

As estratégias terapêuticas incluem cirurgia, quimioterapia, terapias endócrinas e emergentes como terapia gênica e vacinas, buscando abordagens mais personalizadas e eficazes (BARZAMAN et al., 2020; GRADISHAR, 2004; HARBECK et al., 2019; MOO et al., 2018). Essas terapias sofrem constante atualização, sendo a pesquisa básica fundamental na busca de conhecimentos sobre mecanismos moleculares básicos no câncer. Nesse sentido, o estudo do genoma humano revelou que apenas 1,5% do genoma é composto por regiões codificantes, enquanto o restante inclui regiões anteriormente consideradas "DNA lixo", que transcrevem RNAs não codificantes (COLLINS et al., 1998; ALEXANDER et al., 2010). Entre esses, estão os RNAs longos não codificantes (lncRNAs), que desempenham papéis centrais na

regulação de processos celulares, como ciclo celular, apoptose, reparo de DNA e transcrição gênica (MA; BAJIC; ZHANG, 2013; MATTICK et al., 2023; NANDAGOPAL et al., 2023). Além disso, exibem padrões de expressão específicos que os associam à identidade celular (MATTICK et al., 2023).

No câncer, os lncRNAs têm sido implicados na promoção ou inibição da progressão tumoral (ALSAEDY; MIRZAEI; ALHASHIMI, 2023; GIULIANI; TORDONATO; NICASSIO, 2023; NANDAGOPAL et al., 2023). O lncRNA NORAD (LINC00657) é um exemplo notável, associado à estabilidade genômica (LEE et al., 2016; MUNSCHAUER et al., 2018; CAPELA et al., 2024). Sua função principal é sequestrar proteínas PUMILIO, prevenindo a atividade descontrolada dessas proteínas, que podem levar à instabilidade cromossômica. A baixa expressão do NORAD foi relacionada ao aumento de aneuploidia e mutações somáticas (LEE et al., 2016; TICHON et al., 2016; GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; YANG et al., 2019; FARBEROV et al., 2024).

As proteínas de ligação ao RNA (RBPs, do inglês *RNA binding proteins*), como as proteínas PUMILIO, são cruciais na regulação de RNAs em todos os estágios de seu ciclo de vida, desde a síntese até a degradação (GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; GEBAUER et al., 2021). Essas proteínas interagem com RNAs por meio de sequências específicas, como os elementos de reconhecimento de PUMILIO (PREs, do inglês *Pumilio recognition element*), regulando sua estabilidade e tradução (GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; SMIALEK et al., 2020). Em condições normais, essas interações contribuem para a homeostase celular. No entanto, sua desregulação é frequentemente associada a doenças, incluindo câncer, onde favorecem processos como proliferação e migração celular (STERNBURG et al., 2023).

O lncRNA NORAD, com aproximadamente 20 sítios PRE, exerce uma função essencial no equilíbrio das atividades das proteínas PUMILIO (LEE et al., 2016; TICHON et al., 2016). Este lncRNA protege o genoma ao inibir a interação excessiva de PUMILIO com seus RNAs-alvo, mantendo a estabilidade celular. Alterações na expressão de NORAD impactam diretamente a regulação mediada por essas proteínas, ressaltando sua relevância em contextos patológicos, como o câncer (LEE et al., 2016; YANG et al., 2019; CAPELA et al., 2024). Em razão da necessidade de estudos que elucidem mecanismos moleculares básicos em vias de regulação endógena no câncer, além da carência de pesquisas que avaliam a dinâmica de

interação do NORAD e as proteínas PUMILIO no câncer de mama, esse trabalhou buscou avaliar o efeito da superexpressão das formas selvagem e mutada do lncRNA NORAD sobre a dinâmica celular em linhagem celular de câncer de mama.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 O CICLO CELULAR

Estima-se que um ser humano seja constituído a partir do aglomerado de mais de 10 trilhões de células, as quais se multiplicam a partir de um processo complexo e organizado denominado mitose, que faz parte do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em interfase e mitose (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2019).

A interfase precede a mitose e é constituída pelas subfases, G1, S e G2. Algumas células diferenciadas encontram-se estacionadas na subfase G1, denominada G0 nesse caso, pois permanecem assim durante toda sua vida. É o caso de células que raramente entram em mitose pois se concentram na sua função, como células neuronais, secretoras, imunes, entre outras. Por outro lado, quando há o estímulo para divisão em G1, a célula se prepara para a replicação do DNA, realizando crescimento, síntese de proteínas, RNA e organelas. Na fase S (de síntese) ocorre a replicação do DNA e a duplicação dos centríolos. E num intervalo prévio e de preparo à mitose, G2, ocorrem processos de checagem e reparo do material genético (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2019; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

Como a dinâmica celular é extremamente regulada a fim de corrigir possíveis erros, existem pontos de checagem durante o ciclo celular. De G1 para S, o tamanho da célula, os fatores de crescimento, nutrientes e integridade do DNA são checados. De G2 para M (mitose) a replicação completa do genoma celular é checada, além de possíveis danos que podem ter ocorrido nesse processo, os quais devem ser corrigidos antes da mitose. Finalmente, durante a mitose, ocorre a checagem do fuso e o devido acoplamento das cromátides irmãs para sua correta migração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

Durante toda a fisiologia celular, seja na interfase ou na mitose, os mecanismos de controle e reparo estão ativados e comunicando-se dentro de distintas e variáveis vias, de modo a garantir o reparo de erros, ou a ativação de vias apoptóticas quando a correção é falha. Além disso, e valendo-se do fato que diferentes células se comunicam para formar tecidos, órgãos e organismos, células aberrantes podem ser controladas e mortas pela atividade de outras células diretamente ou indiretamente (KUMAR, 2018; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023). E mesmo com todos os mecanismos de reparo, checagem e controle contra alterações na dinâmica celular,

algumas células conseguem escapar e se multiplicar, levando adiante mutações que somadas favorecem a desdiferenciação celular (anaplasia) e podendo gerar diversas doenças, entre elas o câncer (KUMAR, 2018).

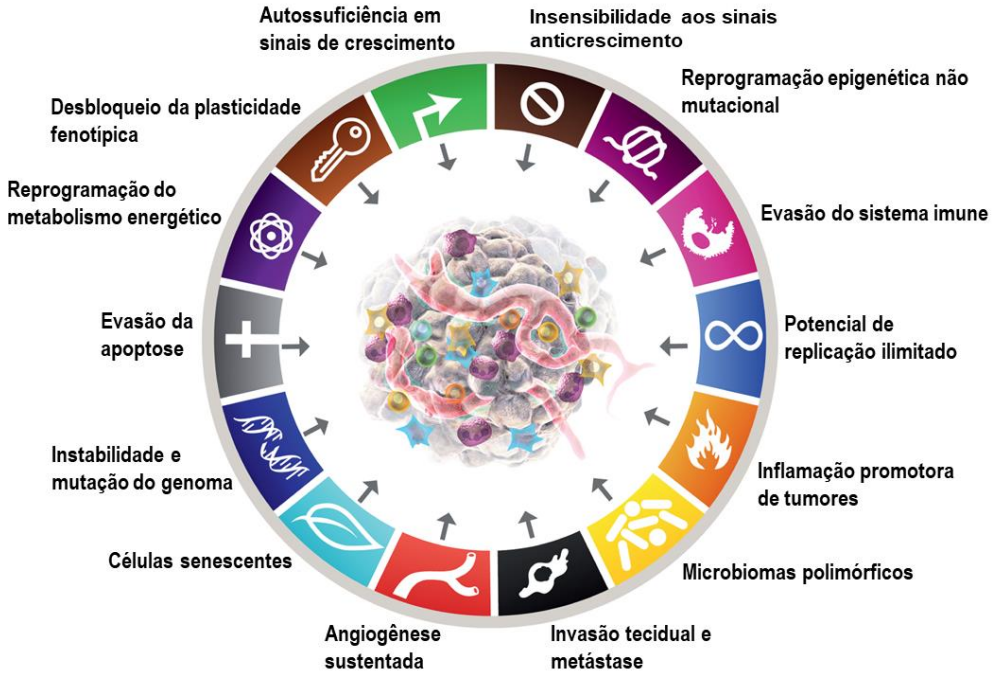
## 2.2 O CÂNCER

O câncer é um nome genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Sua causa pode ser atrelada a agentes físicos, químicos e biológicos, que podem ou não ser combinados com fatores hereditários de predisposição. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, o câncer foi a causa da morte de aproximadamente 10 milhões de pessoas em todo o mundo no ano de 2020. Essa doença pode ser classificada a partir de diversos fatores, como localização, tipo celular e tecido de origem, facilitando seu entendimento e direcionamento de terapias específicas (KUMAR, 2018; WHO, 2024).

Embora diferentes tipos de câncer possam ser classificados a partir de suas particularidades, um grupo de características pode ser atribuído na identificação e nas marcas de sua progressão. Hanahan e Weinberg (2000) descreveram seis habilidades adquiridas pelas células tumorais durante o seu desenvolvimento: evasão da apoptose; autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade aos sinais anticrescimento; potencial de replicação ilimitado; angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase. Em 2011 mais quatro características foram adicionadas: instabilidade e mutação do genoma; inflamação promotora de tumores; reprogramação do metabolismo energético e evasão do sistema imune. Mais recentemente, em 2022 mais quatro características foram incluídas: desbloqueio da plasticidade fenotípica; reprogramação epigenética não mutacional; microbiomas polimórficos e células senescentes (Figura 1). Esses processos juntos ou individualmente, a depender do tipo de câncer, favorecerem e estão presentes na progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HANAHAN, 2022).

Mais de 100 tipos de câncer foram classificados pela OMS e pelo Instituto Nacional do Câncer. Os tumores de mama, próstata, pulmão, colorretal e cervical foram classificados como top 5 em incidência para ambos os sexos em todo o mundo no ano de 2022 (exceto pele não melanoma). Dentre estes tipos de câncer, o carcinoma mamário se enquadra como o subtipo que mais mata mulheres no Brasil e no mundo (INCA, 2023; WHO, 2024).

FIGURA 1: MARCAS DO CÂNCER.




FONTE: Adaptado de Hanahan (2022).

LEGENDA: A figura evidencia as 14 marcas do câncer (*Hallmarks of Cancer*).

## 2.3 CÂNCER DE MAMA

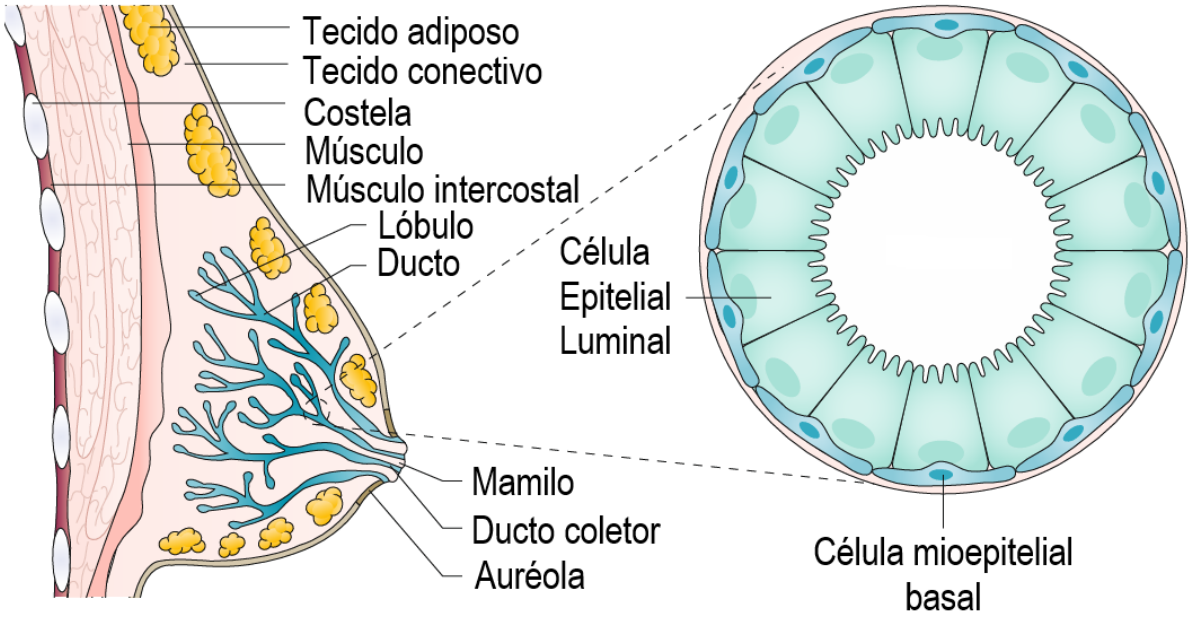
O câncer de mama possui uma classificação ampla e multifacetada, com diferentes origens, perfis clínicos e moleculares. Pode ter origem a partir de células do epitélio luminal ou do mioepitélio basal mamário (Figura 2). Suas bases moleculares são complexas e heterogêneas, com distintas causas: fatores ambientais e epigenéticos promotores de mutações somáticas; herança genética familiar; agentes infecciosos; e causas esporádicas, sem origem definida (KUMAR, 2018; SOKOLOVA et al., 2023). Sua classificação histológica é baseada no padrão de crescimento patológico, com mais de vinte subtipos histológicos de câncer de mama invasivo (TSANG; TSE, 2020). De acordo com sua classificação imunoistoquímica, é subdividido em ER+ (receptor de estrógeno positivo) ou PR+ (receptor de progesterona positivo), HER2+ (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 positivo), e câncer de mama triplo negativo ou *Basal like* (ER-, PR- e HER2-). Além dessas classificações, também pode ser classificado em 4 subtipos a partir de sua heterogeneidade molecular descrita em estudos globais de expressão gênica: Luminal

A; Luminal B; HER2-superexpresso; *Basal like* (TSANG; TSE, 2020; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021). A expressão de ER estratifica o câncer de mama em dois distintos grupos, ER+ e ER-: Os subtipos Luminal A e Luminal B são ER+ enquanto tumores *Basal like* e HER2 são ER- (TSANG; TSE, 2020).

Os subtipos Luminal A e Luminal B são caracterizados pela sua expressão gênica e associados ao epitélio luminal mamário normal e com genes ligados à ativação de ER. Luminal A é o subtipo mais comum, representando de 40 % a 50 % dos diagnósticos de câncer de mama e normalmente possui menor grau e melhor prognóstico se comparado aos outros subtipos. O subtipo Luminal B apresenta um pior prognóstico em relação ao Luminal A, com alta expressão de genes associados à proliferação e expressão variável de genes ligados ao HER2. Portanto, pacientes com o subtipo Luminal A apresentam melhor resposta clínica a tratamentos hormonais individuais, enquanto mulheres com o subtipo Luminal B necessitem de eventual quimioterapia (WAKS; WINER, 2019; BARZAMAN et al., 2020; TSANG; TSE, 2020).

O subtipo basal-like é associado à expressão de genes do epitélio mamário basal normal e apresenta superexpressão de genes relacionados à proliferação celular. Além disso, pode ser nomeado também como câncer de mama triplo negativo, pois raramente expressa ER, PR e HER2. Consequentemente possui menores opções de tratamento e pior prognóstico em relação aos outros, já que carece dos receptores que podem ser utilizados como alvos terapêuticos (HARBECK et al., 2019; WAKS; WINER, 2019; BARZAMAN et al., 2020; TSANG; TSE, 2020; ZUBAIR; WANG; ALI, 2021).

FIGURA 2: MORFOLOGIA DA MAMA.




FONTE: Adaptado de Harbeck et al (2019).

LEGENDA: A imagem possibilita a visualização da morfologia celular interna da mama, com destaque para as células do epitélio luminal e do mioepitélio basal.

O tratamento do câncer de mama pode necessitar de diferentes estratégias e requer uma abordagem multidisciplinar. Diagnósticos precoces podem envolver cirurgia de conservação da mama, normalmente seguida de radioterapia, enquanto a mastectomia é indicada para casos mais específicos e com recidiva local. Ao mesmo tempo, e a depender do subtipo tumoral e da presença de receptores hormonais sendo constitutivamente expressos, a terapia endócrina é amplamente empregada e o medicamento mais utilizado nesse caso é o Tamoxifeno. Esse fármaco atua como um modulador seletivo do receptor de estrogênio ao competir pelo receptor e, a partir de seu mecanismo de ação, interrompe uma série de mecanismos celulares que regulam a replicação celular, consequentemente perturbando a proliferação tumoral. Já no tratamento de subtipos mais agressivos e que não expressam receptores hormonais, como o triplo negativo, ou como adjuvante nas cirurgias de remoção de tumores, a quimioterapia é rapidamente adotada, principalmente a fim de reduzir riscos e recidivas (GRADISHAR, 2004; MOO et al., 2018; HARBECK et al., 2019; WON; SPRUCK, 2020; BARZAMAN et al., 2020; WANG; WU, 2023).

## 2.4 RNAS LONGOS NÃO CODIFICANTES

Um dos principais objetivos do projeto Genoma Humano foi identificar todos os genes humanos e caracterizá-los. Entretanto, a quantidade de genes encontrados foi muito menor que o esperado por seu tamanho, pois o projeto identificou que apenas 1,5 % do genoma era composto por regiões codificantes, ou seja, informação genética que pode ser transcrita em proteínas. Desconhecendo a função dos outros 98 % do genoma, muitos estudos caracterizaram esse conteúdo como DNA lixo. Essa ideia se baseia no dogma central da biologia molecular, que considera relevante toda a informação contida no DNA que vai ser transcrita em mRNA (RNA mensageiro) e subsequentemente traduzida em proteínas, as quais desempenham papéis essenciais na dinâmica celular (CRICK, 1958; COLLINS et al., 1998; ALEXANDER et al., 2010; DOGINI et al., 2014).

Muitas pesquisas focaram em compreender a região não codificante do genoma humano e suas possíveis funções. Nisso compreende-se informações para transcrição de RNAs não codificantes, que diferentemente dos mRNAs não traduzem informações para a síntese proteica. Como por exemplo: snRNA, que promove a remoção dos íntrons no *splicing* para formação do pré-mRNA; miRNA e siRNA que são importantes reguladores da expressão gênica em eucariotos; piRNAs que protegem linhagens germinativas de animais contra elementos de transposição; e os lncRNAs que são descritos por participar em diversos processos celulares (ALBERTS et al., 2010).

Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) são definidos como RNAs com mais de 500 nucleotídeos (MATTICK et al., 2023). De acordo com sua posição em relação ao gene codificante mais próximo, podem ser classificados em intrônicos, intergênicos, *sense* e *antisense*. São descritos por atuar na regulação da arquitetura celular, do genoma e na transcrição gênica por meio de interações com outros RNAs, DNA e proteínas. Sua expressão e atuação molecular têm sido associada com diversos processos celulares, como transcrição, apoptose, divisão celular, tradução, localização proteica, integridade celular, ciclo celular, pluripotência, *splicing*, *imprinting* e resposta ao choque térmico (MA; BAJIC; ZHANG, 2013; MATTICK et al., 2023; NANDAGOPAL et al., 2023). Apresentam padrão de expressão mais restrito se comparado aos mRNAs e geralmente são específicos para o tipo celular, denotando

sua atuação na definição da trajetória e desenvolvimento celular (MATTICK et al., 2023).

No contexto do câncer, diversos lncRNAs foram associados com a inibição da proliferação celular, resistência a inibidores do crescimento, prevenção contra o acúmulo de mutações, entre diversos outros processos que podem influenciar a progressão tumoral (ALSAEDY; MIRZAEI; ALHASHIMI, 2023; GIULIANI; TORDONATO; NICASSIO, 2023; NANDAGOPAL et al., 2023). Além disso, interações RNA-proteína são fundamentais para a homeostase celular, e desequilíbrios entre essas interações podem levar à disfunção celular e a doenças, como o câncer (RAMANATHAN; PORTER; KHAVARI, 2019; HUANG; LI; WEN, 2021).

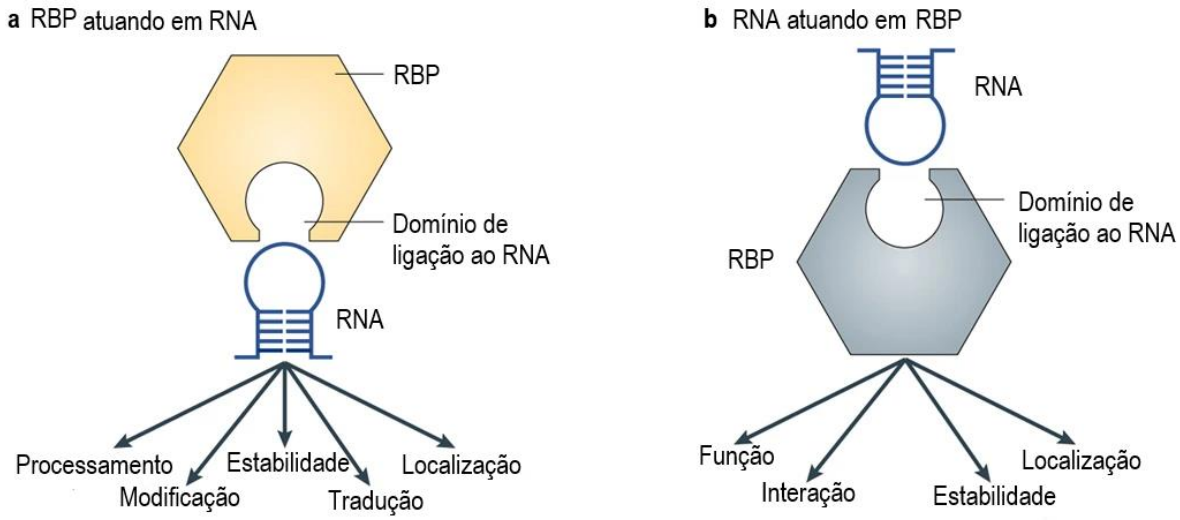
## 2.5 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA

Uma classe de proteínas denominadas proteínas de ligação ao RNA, do inglês *RNA binding-proteins* (RBPs), atuam em todo o controle do ciclo de vida dos RNAs. As RBPs foram descritas por controlar e regular os processos de transcrição, *splicing*, tráfico intracelular, modificação, tradução e sequestro de RNAs (GEBAUER et al., 2021). Essas proteínas podem participar da formação de complexos ribonucleoproteicos, que tem sua função atrelada principalmente à expressão gênica (HENTZE et al., 2018).

RNAs e proteínas são biomoléculas complexas que participam de diversas vias moleculares. O mRNA carrega informações específicas para a síntese proteica e sequências reguladoras. Essas sequências não codificantes do mRNA podem regular a tradução da molécula, endereçar a proteína codificada e impactar na sua interação com distintas proteínas (ALBERTS et al., 2010; HENTZE et al., 2018; RAMANATHAN; PORTER; KHAVARI, 2019). Por outro lado, as RBPs podem modular a expressão e função do RNA ao interagir fisicamente com essa biomolécula. Essas interações vão da síntese até a degradação do RNA e são extremamente importantes no equilíbrio dinâmico molecular da célula, enquanto o desbalanço dessas interações propicia o desenvolvimento de doenças como resultado da disfunção celular (COOPER; WAN; DREYFUSS, 2009; RAMANATHAN; PORTER; KHAVARI, 2019; BERTOLDO; MÜLLER; HÜTTELMAIER, 2023). Portanto, as funções e tempo de atividade dessas duas biomoléculas dentro da célula podem sofrer modulação, já que atuam como

moduladoras umas das outras (Figura 3) (RAMANATHAN; PORTER; KHAVARI, 2019).

FIGURA 3 - INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE RBP E RNA.



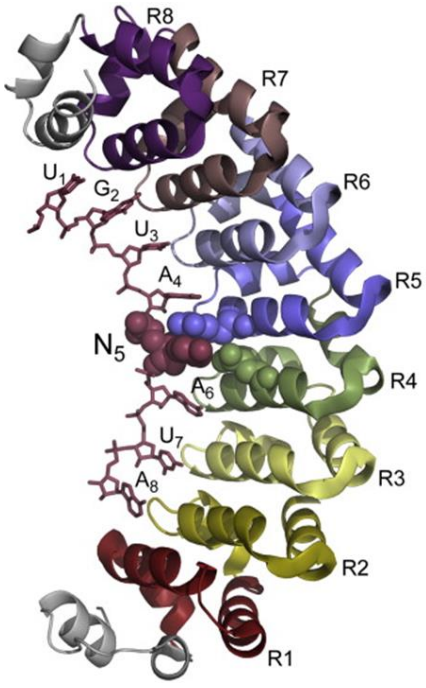

FONTE: Adaptado de Hentze et al (2018).

LEGENDA: A imagem retrata a dinâmica de interações entre RBP e RNA. Em **a** pode-se visualizar possíveis resultados da modulação de uma molécula de RNA mediada por uma RBP. Já em **b** o resultado dessa interação tem efeito na proteína. Essa representação gráfica evidencia a natureza bidirecional da relação entre RBPs e RNAs, onde cada biomolécula pode influenciar a outra em um ciclo de regulação crucial para a manutenção da homeostase celular.

No contexto das RBPs, é descrito que uma única proteína pode controlar grupos de RNAs com funções semelhantes, como por exemplo aqueles relacionados à proliferação celular, de modo a controlar a estabilidade, tradução e localização celular desse grupo de RNAs (WILINSKI et al., 2017). A família de RBPs conhecida como PUF (PUmilio-Fem-3-binding fator) engloba as proteínas PUMILIO (Pum) e o fator de ligação Fem-3 (GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018). Esse grupo de RBPs ao qual as proteínas PUMILIO estão inseridas está relacionado com o controle da tradução do mRNA e estabilidade ao se ligarem na extremidade 3’ UTR (STERNBURG et al., 2023). A categorização e descobrimento das proteínas PUMILIO se deu em *Drosophila* por seu papel intrínseco e essencial no desenvolvimento embrionário (GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018). Mamíferos possuem duas proteínas PUMILIO canônicas parálogas, PUMILIO1 (PUM1) e PUMILIO2 (PUM2), as quais possuem vários domínios de homologia (PUM-HD), e são super conservadas evolutivamente em diversos organismos (GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; STERNBURG et al., 2023). O PUM-HD confere especificidade de interação pela

presença de uma sequência consenso no RNA, 5’ UGUAHAUA 3’, onde H pode representar A, C ou U, como elemento de reconhecimento/resposta da PUMILIO (PRE) (Figura 4) (GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; SMIALEK et al., 2020; STERNBURG et al., 2023; FARBEROV et al., 2024). Estudos identificaram uma vasta biblioteca com mais de 4 mil RNAs relacionados com a PUMILIO em células humanas e de camundongos, sendo que mais da metade desses RNAs apresentaram sequências PRE (GALGANO et al., 2008; MORRIS; MUKHERJEE; KEENE, 2008; HAFNER et al., 2010; CHEN et al., 2012; LEE et al., 2016; ZHANG et al., 2017; GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018). Em humanos, mais de 7 mil genes de mRNAs e RNAs não codificantes foram descritos por conter de 1 a 19 sítios PRE, denotando o papel das proteínas PUMILIO no controle da expressão gênica, pelo recrutamento de complexos de regulação de RNA (BOHN et al., 2017; GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018). A atividade de PUM1/2 foi associada com a morfologia celular na regulação dos filamentos de actina e com a taxa de migração, controle da adesão, crescimento e proliferação celular, mecanismos que quando desregulados propiciam o desenvolvimento de doenças, como o câncer (LEE et al., 2016; GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; LECHERMEIER et al., 2020; SMIALEK et al., 2020; RAJASEKARAN et al., 2022).

FIGURA 4 - PUM-HD.



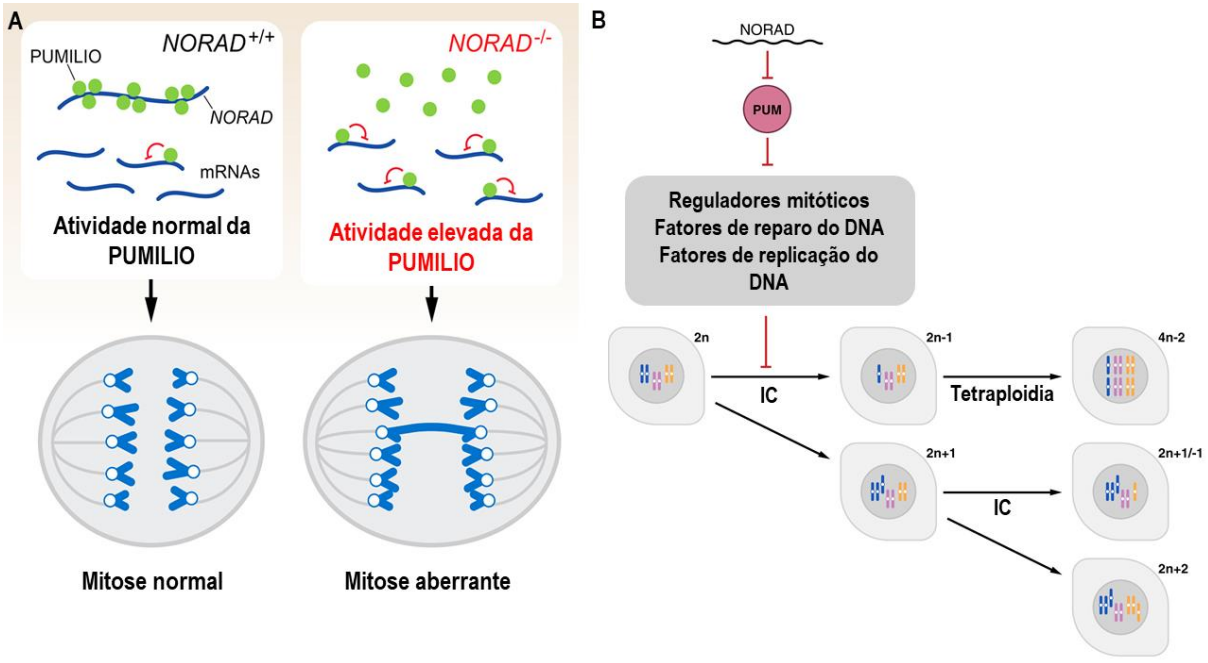

FONTE: Adaptado de Ryder (2011).

LEGENDA: O domínio de homologia das proteínas PUMILIO possui oito repetições seguidas (R1-R8), formando um único domínio. $N_5$ representa a posição H, que pode ser A, C ou U.

## 2.6 NORAD/PUMILIO

O lncRNA ativado por dano ao DNA (NORAD, também conhecido como LINC00657) é um RNA longo não codificante altamente conservado, de 5,3 kb e localizado no cromossomo 20, que se acumula no núcleo quando ocorre replicação, estresse ou dano ao DNA (MUNSCHAUER et al., 2018; YANG et al., 2019; CAPELA et al., 2024). Esse lncRNA é associado com estabilidade genômica, ao passo que sua baixa expressão pode ser relacionada com instabilidade cromossômica e aneuploidia (LEE et al., 2016; YANG et al., 2019; CAPELA et al., 2024). NORAD possui aproximadamente 20 PRE, o que caracteriza seu principal mecanismo de ação, ligar-se às proteínas PUMILIO. Esse elevado número de sequencias de reconhecimento de PUMILIO atribui a esse lncRNA a habilidade de sequestrar proteínas PUM1/2, prevenindo sua atividade descontrolada de inibição aos RNAs, mantendo dessa forma a estabilidade cromossômica (LEE et al., 2016; TICHON et al., 2016; GOLDSTROHM; HALL; MCKENNEY, 2018; YANG et al., 2019; FARBEROV et al., 2024).

FIGURA 5 – RELAÇÃO NORAD/PUMILIO DINÂMICA CELULAR.




FONTE: Adaptado de Lee et al (2016).

LEGENDA: Em **A** é possível diferenciar o contexto mitótico modulado pela PUMILIO com NORAD equilibradamente expresso versus NORAD com expressão diminuída. Em **B** pode-se visualizar o efeito inibitório de NORAD sobre as proteínas PUMILIO, ao passo que sua atividade ao sequestrar essas RBPs impede a instabilidade cromossômica (IC).

Os lncRNAs fazem parte de uma classificação heterogênea de RNAs que constitutivamente têm seu papel revelado em diversos estudos, atuando quase sempre como reguladores de diversos processos biológicos (STATELLO et al., 2021; ALSAEDY; MIRZAEI; ALHASHIMI, 2022; MULLER et al., 2022). Associados às RBPs, podem formar complexos ribonucleicos no núcleo ou no citoplasma e por mecanismos distintos controlar a expressão gênica, podendo estar envolvidos em processos fisiológicos ou patológicos como o câncer (RAMANATHAN; PORTER; KHAVARI, 2019; HUANG; LI; WEN, 2021; STATELLO et al., 2021; MULLER et al., 2022; CHAUDHARY et al., 2023). A elevação de expressão de alguns desses RNAs pode levar ao sequestro de RBPs, como PUM1/2, de forma a impactar a interação com seus genes-alvo (MATHIAS et al., 2021; MULLER et al., 2022; CAPELA et al., 2024; FARBEROV et al., 2024). Tendo isso em vista, e numa tentativa de elucidar a relação NORAD/PUMILIO no câncer de mama, o presente trabalho busca avaliar de forma experimental o impacto da superexpressão de duas formas do NORAD, selvagem e mutada, que não apresenta os sítios de ligação à PUMILIO, na dinâmica celular de progressão tumoral em linhagem celular de câncer de mama MCF-7, do subtipo luminal A.

## 3 JUSTIFICATIVA

O carcinoma mamário é o tipo de câncer, excluindo o câncer de pele não melanoma, com maior incidência entre as mulheres em todo o mundo, além de ser sua principal causa de morte por neoplasia. A complexidade dessa doença é refletida na sua heterogeneidade molecular e clínica, que resulta em desafios significativos na definição de estratégias terapêuticas eficazes. Embora diferentes subtipos do câncer de mama demandem abordagens específicas, muitas terapias falham devido à resistência intrínseca ou adquirida, o que leva à progressão da doença e altas taxas de recidiva. Essas limitações terapêuticas frequentemente refletem o desequilíbrio nas vias moleculares de regulação endógena, cuja total complexidade ainda não foi completamente elucidada. Esses mecanismos envolvem redes de interação molecular

intricadas que regulam a dinâmica celular, incluindo controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e proliferação celular.

Nos últimos anos, avanços científicos têm revelado a importância de regiões previamente consideradas como “DNA lixo” no genoma humano. Atualmente sabe-se que tais regiões não codificantes são cruciais para a manutenção da homeostase celular. Dentro desse contexto, os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) emergem como biomoléculas cruciais pois desempenham papéis na regulação de diversos processos celulares, como controle da expressão gênica, *splicing*, manutenção da integridade genômica e regulação da apoptose. Alterações na expressão de lncRNAs têm sido associadas a diversas patologias, incluindo o câncer, sugerindo seu potencial como biomarcadores e alvos terapêuticos.

O lncRNA NORAD é associado com dano ao DNA e possui papel crítico na estabilidade genômica, sendo descrito por atuar no sequestro de proteínas PUMILIO, uma família de proteínas de ligação ao RNA (RBPs) descrita por regular positivamente a proliferação celular no câncer. Essas RBPs formam um grupo de proteínas que desempenham papéis centrais na regulação dos RNAs, influenciando desde sua síntese até sua degradação. As proteínas PUMILIO têm capacidade de modular a proliferação celular ao inibir e regular RNAs específicos, contribuindo para a instabilidade genômica em contextos tumorais.

Dado o crescente reconhecimento da relevância dos lncRNAs e das RBPs na biologia do câncer, é de suma importância aprofundar o entendimento sobre tais agentes moleculares e suas interações. A elucidação dos mecanismos subjacentes à relação NORAD/PUMILIO, assim como identificação de possíveis alvos moleculares dessas moléculas pode fornecer novas perspectivas sobre a progressão do câncer de mama e abrir caminhos para o desenvolvimento de terapias direcionadas mais eficazes.

Tendo em vista a relação NORAD/PUMILIO descrita na literatura, este trabalho buscou avaliar as alterações na dinâmica celular, como viabilidade, proliferação e capacidade clonogênica ao superexpressar diferentes formas do NORAD, uma selvagem e outra mutada, que não apresenta nenhum sítio de interação com a PUMILIO. Portanto, o presente trabalho se justifica pela necessidade de explorar esses mecanismos, contribuindo para o avanço do conhecimento científico no combate ao câncer de mama.

# 4 OBJETIVOS

## 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da interação do NORAD com a PUMILIO na dinâmica celular do câncer de mama do subtipo luminal A, em linhagem celular MCF7.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

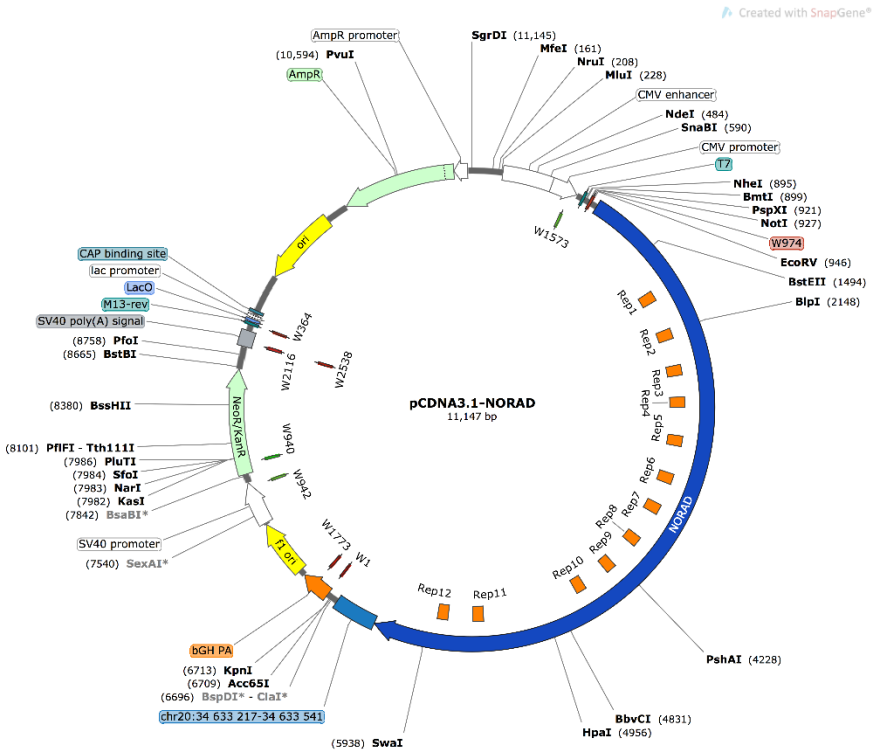
- Superexpressar duas formas do NORAD, selvagem e mutada, em MCF7;
- Avaliar a viabilidade e proliferação celular após a transfecção das diferentes formas;
- Avaliar o impacto da transfecção sobre a capacidade clonogênica das células;
- Quantificar via qPCR a expressão do NORAD selvagem entre outros genes.

# 5 MATERIAIS E MÉTODOS

## 5.1 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS

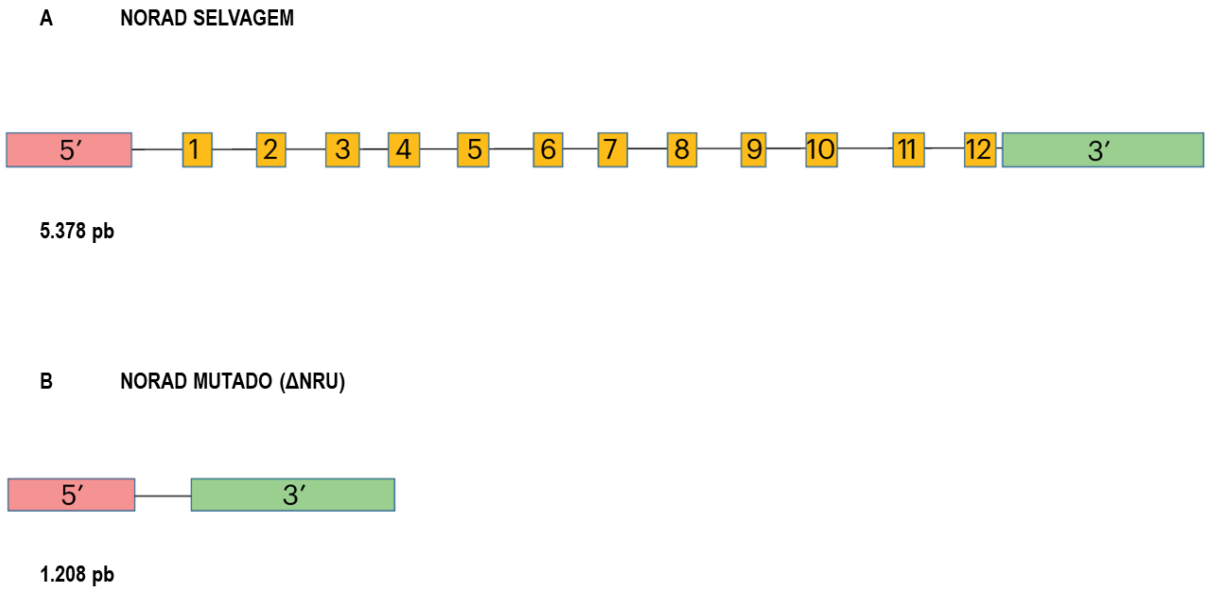
Para realização dos ensaios, este trabalho fez uso dos plasmídeos produzidos e gentilmente disponibilizados pelo grupo de pesquisa do professor Igor Ulitsky, do Instituto de Ciência Weizmann, em Israel. O presente trabalho baseou todos os ensaios a partir da superexpressão de vetores contendo a sequência do gene do lncRNA NORAD selvagem, pcDNA3.1 NORAD (Figura 6), anteriormente construídos por Tichon e colaboradores, 2016, (AddGene #120383) e a sequência mutada do NORAD (pcDNA3.1 ΔNRU), com excisão das bases 604 – 4.774 (FARBEROV et al., 2024). A exclusão das bases possibilita a criação de um vetor sem sequências PREs e sem as 12 unidades de repetição do NORAD (NRU) (Figura 7). Como controle da superexpressão, foi utilizado vetor pcDNA3.1 (+) vazio (Invitrogen). Os plasmídeos foram recebidos liofilizados, reconstituídos em tris-EDTA pH 8.0 e dosados em espectrofotômetro Nanodrop.

FIGURA 6 - VETOR PCDNA3.1 - NORAD




FONTE: Disponível em: https://www.addgene.org/120383/. Acesso em 28/11/2024.

FIGURA 7 - SEQUÊNCIAS DOS VETORES NORAD.




FONTE: Adaptado de Farberov et al (2024).

LEGENDA: Representação esquemática das sequências do NORAD nos diferentes vetores pcDNA3.1. Em **A** nota-se que a forma selvagem do lncRNA possui 12 unidades de repetição (NRU), enquanto em **B** há a exclusão de todas essas unidades.

## 5.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Para o processo de transformação, que se refere à introdução do DNA (plasmídeo) em células bacterianas, a estirpe utilizada foi DH10b de *Escherichia coli*. As bactérias foram tratadas com cloreto de cálcio para aumentar a permeabilidade ao DNA. Esse processo foi realizado por meio do crescimento do inóculo de DH10b até atingir OD600 (densidade óptica em 600 nm) de 0,4 a 0,7. Após, as células foram incubadas no gelo por 30 minutos e centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos. Em seguida, foram mantidas no gelo por mais 10 minutos e após esse tempo o sobrenadante foi descartado. Na sequência, foi adicionado 10 mL de CaCl2 (0,1M) gelado e o *pellet* de células ressuspendido e centrifugado por mais 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi dispensado e o *pellet* ressuspendido em 750 µL de CaCl2 (0,1M) com glicerol. A transformação foi realizada adicionando 200 ng do DNA plasmidial em 100 µL de células competentes. Após a adição do DNA, os tubos foram mantidos no gelo por 30 minutos e posteriormente acondicionados em banho seco a

42 ºC por 45 segundos para causar choque térmico nas células, possibilitando assim a entrada dos plasmídeos nas células competentes. Em seguida, os tubos foram incubados em gelo por mais 1 minuto, 700 µL de meio de cultura LB foi acrescentado, e depois os tubos foram mantidos em estufa a 37ºC por 45 minutos sob leve agitação. Por fim, as células foram semeadas em placas com meio LB mais ampicilina (100 g/mL) e levadas à estufa a 37ºC por 16 horas.

## 5.3 MINIPREP

A mini preparação ou purificação do DNA plasmidial foi realizada com o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kits (Invitrogen). Previamente à miniprep, a partir de uma cultura onde uma colônia obtida após a transformação, foi deixada por 16 horas em 5 mL de meio LB amp. Foram usadas bactérias expressando os vetores pcDNA3.1 vazio, NORAD selvagem ou NORAD ΔNRU. Em seguida, o meio contendo as bactérias foi centrifugado em velocidade máxima e o sobrenadante removido. Na sequência, a miniprep foi realizada seguindo o protocolo da fabricante e o DNA circular quantificado em espectrofotômetro Nanodrop.

## 5.4 CULTIVO CELULAR

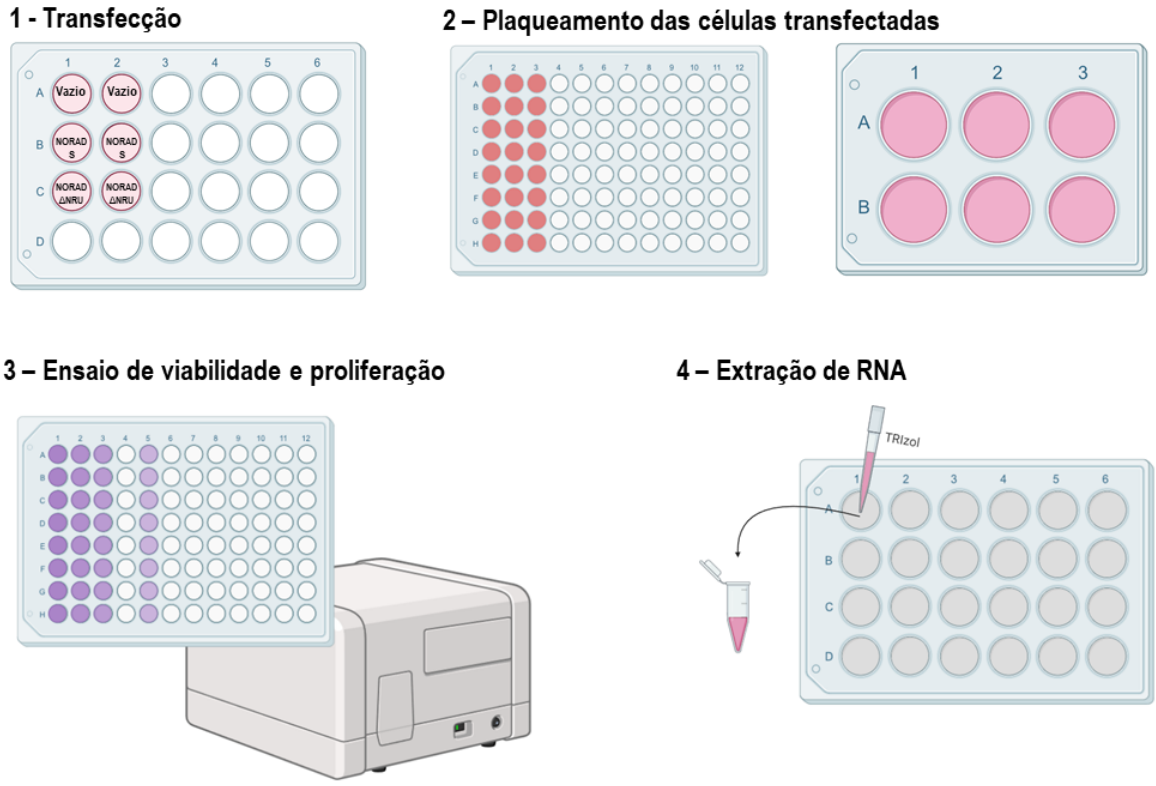
Para a realização dos ensaios, foi cultivada a linhagem celular de câncer de mama MCF7 em meio RPMI com 10% FBS e 1% de solução de antibióticos, em 37ºC e 5% CO2. A linhagem celular MCF-7 é do subtipo luminal A e apresenta menor capacidade invasiva e representa o subtipo de câncer de mama de maior incidência entre as pacientes portadoras desse tumor.

## 5.5 TRANSFECÇÃO

Para a transfecção de plasmídeos pcDNA3.1, as células foram cultivadas até 70 - 80% de confluência, tripsinizadas e contadas para um total de 50.000 células por poço, na placa de 24 poços. 24 h após o plaqueamento, as células foram transfectadas com os reagentes de transfecção Lipofectamina-3000 (ThermoFisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, para a transfecção mediada pela Lipofectamina 3000, o mix de lipofectamina e o mix de plasmídeo foram preparados

separadamente e, por fim, misturados e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem adicionadas às células no meio Opti-MEM®. A mistura de lipofectamina foi preparada diluindo-se 1 µL do reagente Lipofectamina® 3000 em 50 µL de meio Opti-MEM®. A mistura de plasmídeo foi preparada diluindo 0,45 µg de plasmídeo e 1,0 µL de reagente P3000™ em 50 µL de meio Opti-MEM®. O meio foi trocado após 5 h de transfecção e cultivado por mais 19 h antes dos ensaios funcionais. Cada transfecção foi realizada em duplicata técnica para cada plasmídeo (Figura 8).

FIGURA 8 - DISPOSIÇÃO CRONOLÓGICA DOS ENSAIOS



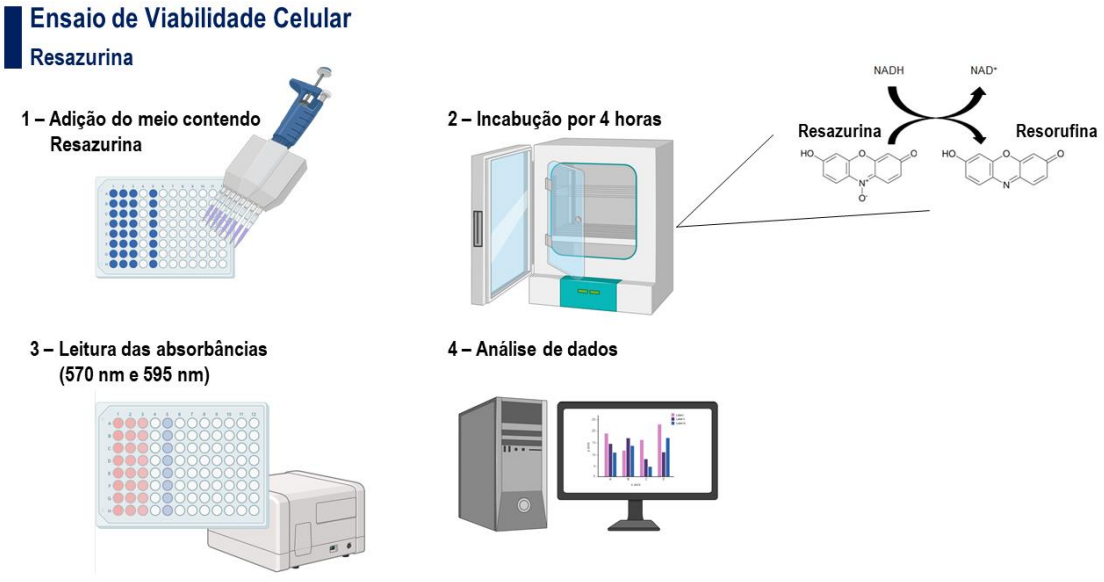

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: A imagem esquematiza a organização dos experimentos após a transfecção. Em **1** indica a placa de transfecção utilizando os plasmídeos pcDNA 3.1 (+) vazio, como controle da transfecção (poços A1 e A2), pcDNA 3.1 NORAD selvagem (poços B1 e B2), e pcDNA 3.1 ΔNRU (poços C1 e C2). Após 24 horas da transfecção, em **2** as células dos poços A2, B2 e C2 foram coletadas e distribuídas em placas de 96 poços para realização dos ensaios de viabilidade e proliferação, e em placas de 6 poços para realização do ensaio de capacidade clonogênica. Em **3**, após 48 horas da transfecção, as células plaqueadas na placa de 96 poços passaram pelos ensaios de viabilidade e proliferação. E em **4**, também após 48 horas de transfecção, as células dos poços A1, B1 e C1, da placa de transfecção (**1**) foram lisadas para posterior extração de RNA.

## 5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade celular foi baseado no metabolismo da Resazurina. Esse é um composto redox, permeável e de cor azulada que quando metabolizado pelas células é reduzido em Resorufina, que possui cor rosa e fluorescente. Essa reação redox com mudança de cor possibilita a quantificação de células viáveis pois a quantidade de Resorufina produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis (RISS et al., 2016). Após 24 horas da transfecção, as células dos poços A2, B2 e C2 (Figura 8) foram tripsinizadas e contadas. As células foram então diluídas para um total de 8.000 em 200 µL de RPMI suplementado com 10% FBS e 1% de solução de antibióticos. Em seguida, estas células foram dispensadas em 8 poços de uma placa de 96 poços para cada grupo transfectado e a placa foi incubada em 37ºC e 5% $CO_2$ por 24 horas. Após esse tempo, o meio foi removido e substituído por 100 µL de meio RPMI com 10% FBS, 1% de solução de antibióticos e 10% de Resazurina (Sigma-Aldrich). O branco foi realizado adicionando o meio com Resazurina em poços sem células. A placa foi incubada por 4 horas e em seguida as absorbâncias (570 nm e 595 nm) foram lidas em leitor de placas *Multiskan FC Microplate Photometer* (ThermoFisher) e os dados foram processados utilizando o software *SkanIt RE 6.0.2* (ThermoFisher). Para a análise dos dados, as absorbâncias foram subtraídas (570 nm – 595 nm), e a média do branco foi subtraída de cada poço (Figura 9).

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

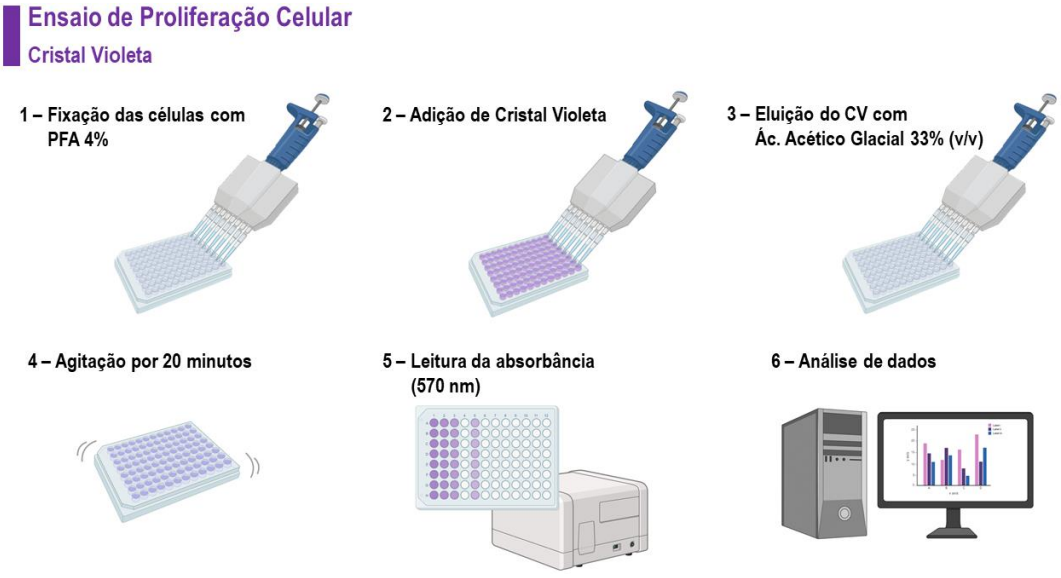



FONTE: O autor (2024).

## 5.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de proliferação celular também foi baseado em um método colorimétrico. Nesse caso foi utilizado o Cristal Violeta (CV) que se baseia na coloração do DNA. Esse composto possui carga positiva, possibilitando sua interação com DNA e proteínas, portanto sua intensidade é proporcional à quantidade de células (BONNEKOH et al., 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011). Após a leitura das absorbâncias do ensaio de viabilidade, o meio contendo Resazurina foi removido e as células foram fixadas com 100 µL de solução de Paraformaldeído 4% (PFA) por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o PFA 4% foi removido e as células foram coradas com 100 µL de solução de Cristal Violeta 0,25 mg/mL por 10 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de CV foi removido e os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de água destilada. Após a lavagem do CV residual, 100 µL de Ácido Acético Glacial 33% (v/v) foi pipetado nos poços para eluir o CV fixado. Para a realização do branco, todo o processo de fixação e coloração com CV também foi realizado em poços sem células. A placa foi incubada em agitador de placas por 20 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, a absorbância a 570 nm foi lida em leitor de placas *Multiskan FC Microplate Photometer* (ThermoFisher) e os dados foram processados utilizando o software *SkanIt RE 6.0.2* (ThermoFisher). Para análise dos dados, a média do branco foi removida de cada absorbância (Figura 10).

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

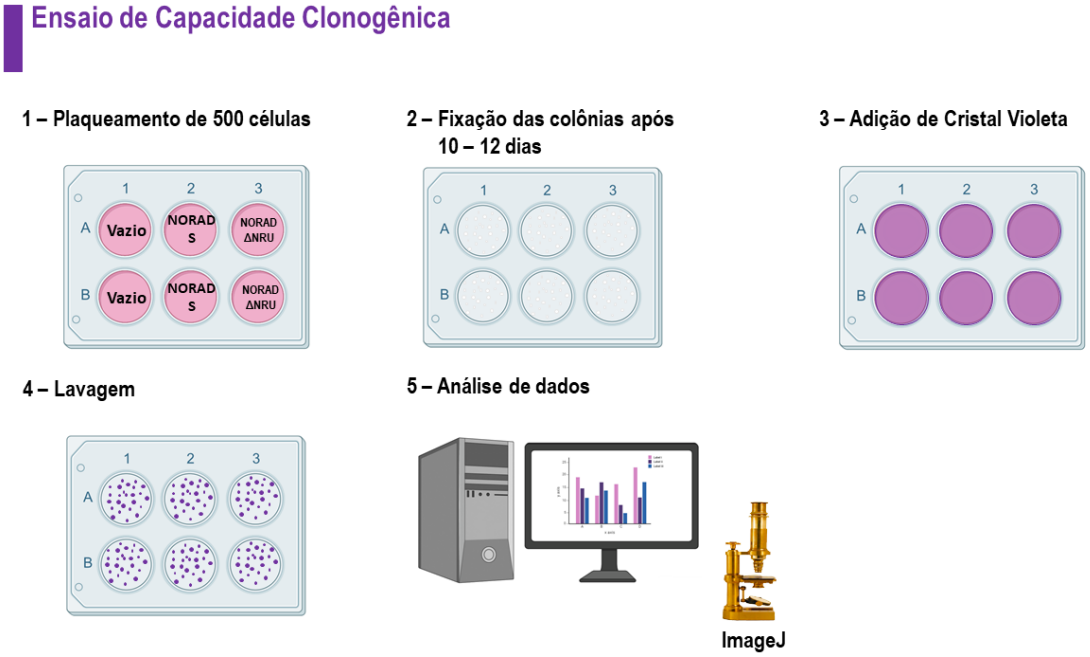



FONTE: O autor (2024).

## 5.8 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Para investigar se houve diferença entre as isoformas do lncRNA NORAD sobre a capacidade clonogênica das células, foi realizado o ensaio clonogênico. Esse ensaio permite identificar a capacidade de formação de colônias de células individualizadas que passaram por diferentes condições (FRANKEN et al., 2006). Após 24 horas da transfecção, as células dos poços A2, B2 e C2 (Figura 8) foram tripsinizadas e contadas. A partir da contagem, 500 células foram plaqueadas em duplicata técnica para cada grupo transfectado, em uma placa de 6 poços contendo 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% FBS e 1% de solução de antibióticos (Figura 11). A formação de colônias foi monitorada diariamente por aproximadamente 10 – 12 dias e o meio trocado a cada 3 dias. Em seguida, o meio foi removido e as colônias foram fixadas com 1 mL de solução de PFA 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o PFA 4% foi removido e as colônias foram coradas com 1 mL de solução de Cristal Violeta 0,25 mg/mL por 10 minutos em temperatura ambiente. Após, o CV foi removido e as colônias foram lavadas com 1 mL de água destilada. As colônias coradas foram fotografadas e analisadas utilizando o programa Image J® (Figura 11).

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO CLONOGÊNICO



FONTE: O autor (2024).

## 5.9 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA E RT-PCR

O processo de extração do RNA foi realizado 48 horas após a transfecção adicionando-se 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen) diretamente nos poços A1, B1 e C1 da placa de transfecção (Figura 8). Após, o conteúdo lisado de cada poço foi removido com a pipeta e acondicionado em tubos de 1,5 mL. Os tubos foram deixados em freezer -80 por pelo menos 12 horas. Após, as amostras foram incubadas em banho-maria por 5 minutos a 37ºC, e em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, os tubos foram vagarosamente homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados em velocidade máxima por 20 minutos a 4ºC. Após a centrifugação, aproximadamente 400 µL da fase aquosa foram coletados e transferidos para um novo tubo, ao qual foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado, os tubos foram vagarosamente homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados em velocidade máxima por mais 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi descartado com a pipeta e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 85% gelado, e os tubos foram centrifugados em velocidade máxima por 10 minutos. O processo de lavagem foi realizado mais uma vez e ao final o etanol foi removido dos tubos e o *pellet* secado à temperatura ambiente. Após a secagem, os *pellets* foram ressuspendidos com 20 µL de água ultrapura (DEPC) livre de nucleases, e o RNA quantificado em espectrofotômetro Nanodrop.

Anteriormente à reação de transcriptase reversa (RT-PCR), foi realizado tratamento com DNase (Invitrogen), a fim de selecionar apenas os transcritos para as análises, e não o DNA genômico. Assim, 650 ng de RNA foi diluído em água DEPC para um volume final em 10 µL. Em seguida, foi adicionado 1 µL de Buffer 10x e 1 µL de DNase (1U/µL) e as amostras foram incubadas em banho seco a 37 ºC por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 µL EDTA (25mM) em cada amostra para inativação da enzima. Após spin, 10 µL do sobrenadante foram coletados para realização da RT-PCR. Para a produção do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada amostra foram utilizados 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100nM), 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™

Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor, 3,2 µL de água DEPC e 10 µL de RNA tratado com DNase (500 ng total). Os tubos foram levados ao termociclador por 10 minutos a 25ºC, 120 minutos a 37ºC e 5 minutos a 85ºC. A reação de transcriptase reversa sem a enzima (RT-) foi realizada para todas as amostras, com 1 µL de RNA tratado com DNase. A partir desse controle, é possível identificar se há contaminação com DNA genômico, uma vez que não é esperada a amplificação dessas amostras na PCR quantitativa.

## 5.10 PCR EM TEMPO REAL

Para a análise de expressão do transcrito NORAD foi utilizado o método de PCR quantitativa (qPCR). Portanto, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para o lncRNA NORAD selvagem, GUSβ como gene de controle endógeno, bem como para outros genes de interesse (QUADRO 1). As reações de PCR foram realizadas utilizando o master mix SYBR Green (Applied Biosystems), os oligonucleotídeos e o cDNA obtido na RT-PCR. Os experimentos foram realizados em triplicata no equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems e analisados no software QuantStudio™ Design & Analysis (Thermo Fischer).

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS

| Gene | Primer Direto (5’-3’) | Primer Reverso (5’-3’) |
|---|---|---|
| GUSβ | GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT | CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA |
| NORAD WT | GCTTTACGAATGGGGTGACA | AACCTAATGAACAAGTCCTGACATACA |
| RALGAPB | TCGCAGCATTCATCTCGTCACC | CACAGAACTGATGGCTCGCTTC |
| Ki67 | ACGCCTGGTTACTATCAAAAGG | ACGCCTGGTTACTATCAAAAGG |

FONTE: O autor (2024).

## 5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

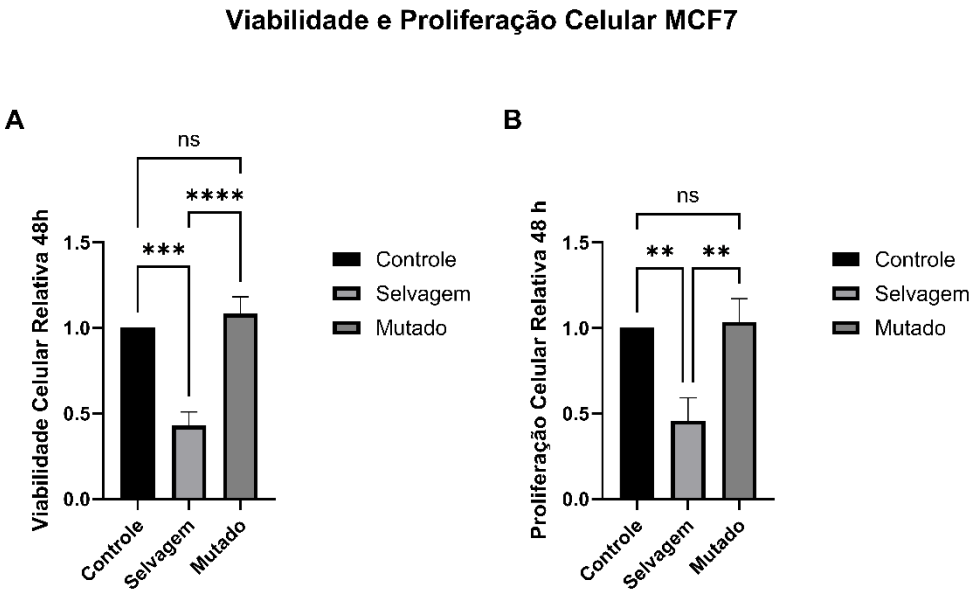
A análise estatística dos dados foi realizada no software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software®, Inc.), com no mínimo três experimentos independentes por ensaio e considerando grupos estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Para todos os ensaios foi aplicado o teste ANOVA de primeira via com teste de Tukey.

# 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1 ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

O câncer possui características intrínsecas (*hallmarks*) de insensibilidade aos sinais de genes supressores do crescimento, potencial de replicação ilimitado, evasão da apoptose e reprogramação do metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HANAHAN, 2022). A fim de elucidar a função do NORAD em contraste à sua forma mutada, que não possui os sítios de ligação à PUMILIO, em linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal A (MCF7), foram realizados os ensaios de viabilidade e proliferação celular 48 horas após a transfecção de plasmídeos pcDNA 3.1 contendo as sequências para o NORAD selvagem e mutado (Figura 12).

FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM MCF7




FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Células MCF7 foram transfectadas com plasmídeos pcDNA 3.1 vazio (controle), NORAD (selvagem), NORAD ΔNRU (mutado). Após 48 horas foram realizados os ensaios de viabilidade celular baseado no metabolismo da Resazurina, e proliferação celular baseado no cristal violeta. Os dados representam a média de 3 experimentos biológicos independentes e estão apresentados como média ± DP, onde **A** ****p<0,0001 e ***p≤0,0002, **B** **p<0,005.

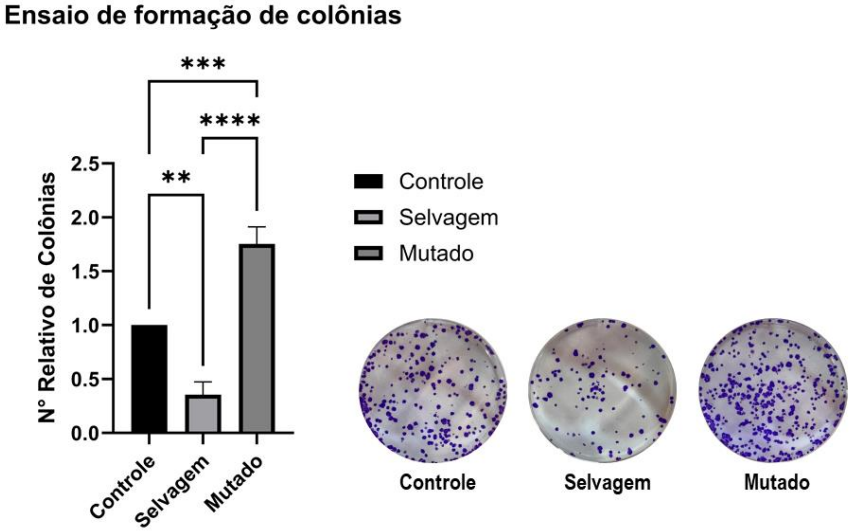
A partir dos resultados, foi possível identificar que a forma selvagem do NORAD foi capaz de diminuir em 61% a viabilidade celular das células transfectadas, enquanto sua forma mutada não teve efeito significativo em relação ao controle (Figura 12A). No ensaio de proliferação, a forma selvagem do lncRNA diminuiu em

55% a proliferação celular em relação ao controle, e sua forma mutada também não apresentou efeito significativo em relação ao controle neste ensaio (Figura 12B). Vale ressaltar que embora sem significância estatística para o período de 48 horas, em ambos os ensaios a forma mutada do lncRNA apresentou uma tendência de elevação em relação ao controle, considerando seu desvio padrão. Portanto, pode ser que a forma mutada desse lncRNA tenha sido inserida em vias biológicas, uma vez que não existe no ambiente celular em condições fisiológicas, por ser sintética, denotando a necessidade futura de outros experimentos que visam a avalição conjunta do silenciamento de PUMILIO.

## 6.2 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

A capacidade de formação de colônias a partir de uma única célula individualizada é outro parâmetro crucial a ser considerado em linhagens tumorais. A partir disso também é possível avaliar mais uma marca do câncer, já que esse processo é fundamental para que se dê a metástase (FRANKEN et al., 2006; STEEG, 2016). Portanto, as células foram plaqueadas 24 horas após a transfecção a fim de avaliar o efeito da superexpressão das distintas formas do NORAD sobre a capacidade clonogênica em MCF7 (Figura 13).

FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA EM MCF7




FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Para avaliação da capacidade clonogênica, após 24 horas da transfecção as células foram plaqueadas. Aproximadamente 10 a 12 dias após, foram fixadas e coradas com cristal violeta. As

colônias foram então contadas e seus números normalizados com àqueles do controle. Os dados representam a média de 3 experimentos biológicos independentes e estão apresentados como média ± DP, onde **p≤ 0,0011, ***p≤0,0005, ****p<0,0001.

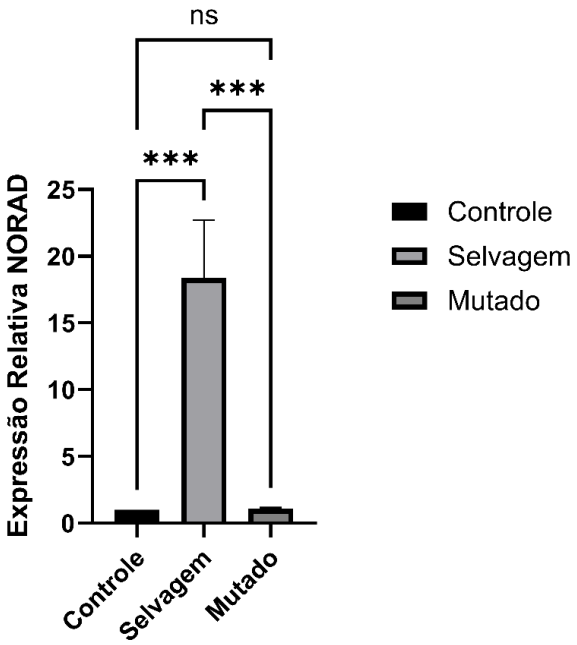
A partir dos resultados obtidos é possível identificar que a forma selvagem do NORAD reduziu em 65% a capacidade clonogênica de células MCF7 em relação ao controle. Além disso, é importante destacar a diferença entre a forma mutada e o controle, com aumento de 75% na capacidade clonogênica promovido pelo NORAD mutado em relação ao controle. Vale ressaltar que o princípio de uso da forma mutada baseou-se apenas no seu desenho, por não possuir nenhum sítio de interação com as proteínas PUMILIO, o que possibilita uma análise mais apurada da superexpressão da forma selvagem do NORAD. Entretanto, os resultados sugerem alguma alteração na dinâmica celular ao superexpressar a forma mutada, sem NRUs, PREs e que não existe naturalmente. Essa diferença pode estar associada à superexpressão somente de sua forma contendo as extremidades 5’ e 3’, que somente foram funcionalmente descritas com enfoque na sua interação com as proteínas PUMILIO, mas não com outros alvos (FARBEROV et al., 2024). Além disso, as análises propostas para este trabalho sofreram limitações de tempo, sendo necessárias análises mais aprofundadas, como o silenciamento de PUM1/2.

## 6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA

Visando avaliar a superexpressão do NORAD nas células transfectadas, sua associação com os resultados obtidos nos experimentos anteriores e possíveis efeitos sobre a expressão de alguns genes alvos foi realizado o ensaio de PCR quantitativa. As amostras foram processadas após 48 horas da transfecção, seguindo o mesmo tempo dos experimentos de viabilidade e proliferação, e o cDNA foi produzido a fim de avaliar a expressão gênica. Assim, primeiramente foi realizada a análise de expressão do NORAD selvagem (Figura 14). Na sequência, foi avaliada a expressão do gene que codifica para a proteína Ki67, que está associada com a proliferação celular e que não apresenta sítios de ligação à PUMILIO, ou seja, não se trata de um alvo direto (Figura 15A) (LEONARDI et al., 1992; PATHMANATHAN; BALLEINE, 2013). Por fim, para avaliar a expressão de um possível alvo das proteínas PUMILIO, foi realizada a qPCR do gene que codifica para a proteína RALGAP, subunidade β

(RALGAPB) (Figura 15B), previamente identificada em análises de bioinformática do nosso grupo, como tendo a sua expressão significativamente correlacionada ao NORAD (p<0,00001). RALGAPB mostra uma redistribuição celular dramática durante a mitose, deslocando-se do núcleo e do complexo de Golgi durante a prófase para o fuso mitótico e a ponte intercelular na citocinese. O RALGAPB e o NORAD foram relacionados de forma independente à instabilidade cromossômica, mas o princípio orientador desse eixo ainda não está claro (PERSONNIC et al., 2014; GAO et al., 2019; MULLER et al., 2022).

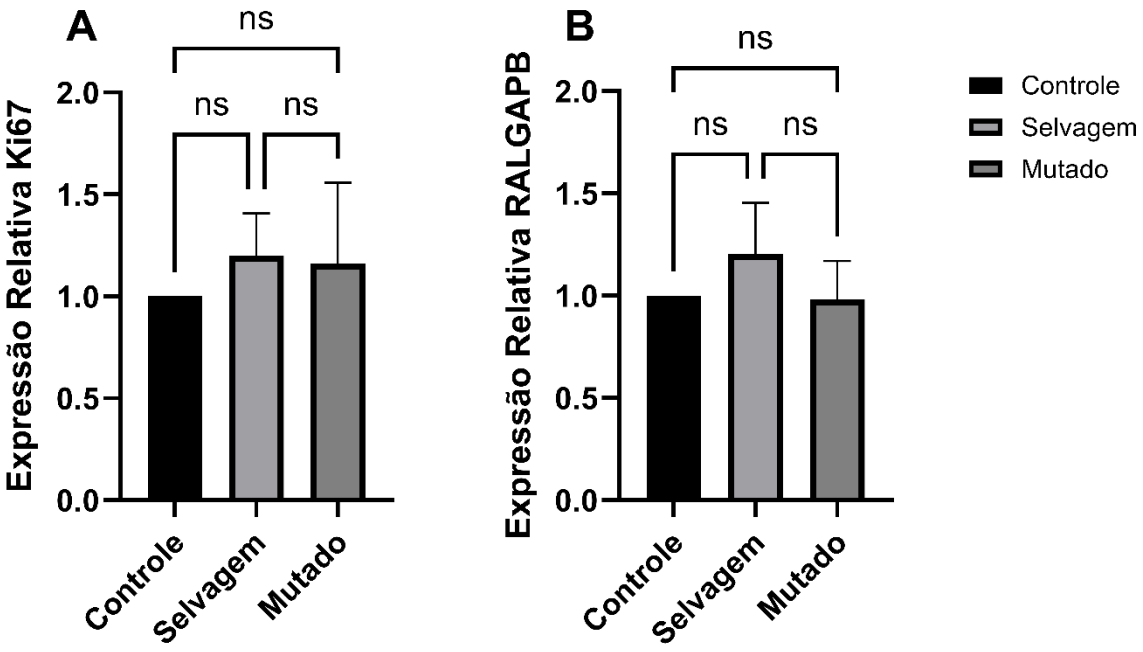
FIGURA 14 - EXPRESSÃO RELATIVA DO NORAD EM MCF7




FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Expressão relativa do lncRNA NORAD selvagem após 48 horas de transfecção. Os dados representam a média de 3 experimentos biológicos independentes, foram normalizados pelo gene de controle endógeno GUSβ e apresentados como média ± DP, onde ***p<0,0005.

Figura 15 – EXPRESSÃO RELATIVA DE KI67 E RALGAPB EM MCF7




FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Expressão relativa de Ki67 (**A**) e RALGAPB (**B**) após 48 horas de transfecção. Os dados representam a média de 3 experimentos biológicos independentes, foram normalizados pelo gene de controle endógeno GUSβ e apresentados como média ± DP, sem diferença estatística entre os grupos, tanto em **A**, quanto em **B**.

A partir da avaliação da expressão do lncRNA NORAD nas células transfectadas foi possível constatar sua superexpressão na forma selvagem. Também, a partir dessa análise, é possível associar sua superexpressão com a redução de viabilidade, proliferação e capacidade clonogênica. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos nas análises de expressão de Ki67 e RALGAPB. Além disso, não houve um aumento significativo de expressão de NORAD selvagem nas células MCF7 transfectadas com NORAD mutado, como observado na linhagem celular HCT116 por Farberov e colaboradores (2024).

Com base nessas análises, é possível que, embora a expressão de RALGAPB não tenha apresentado diferença estatística entre os grupos, pode ser que haja diferença a nível proteico, levantando a necessidade de mais experimentos, como por exemplo Western Blot, para elucidar o impacto da superexpressão do NORAD sobre possíveis alvos da PUMILIO. Aliado a isso, diferentes tempos de processamento de RNA pós transfecção podem ajudar a elucidar melhor o perfil transcricional de possíveis alvos.

Em relação à diferença encontrada na avaliação da capacidade clonogênica, é necessário elucidar as distintas vias que a forma mutada do lncRNA, carregando consigo um aumento significativo somente das regiões 5’ e 3’, pode ter regulado.

Portanto, embora tenha sido possível identificar uma diferença expressiva nos ensaios, confirmando o papel da forma selvagem do NORAD, se faz necessário aprofundar as análises para avaliar o impacto transcricional em PUM1/2 por qPCR, bem como investigar a nível proteico tanto PUM1/2 quanto seus possíveis alvos utilizando Western Blot. Além disso, são necessários ensaios de interação que esclareçam os mecanismos responsáveis pelo aumento da capacidade clonogênica causado pela forma mutada. Adicionalmente, é de grande importância científica que tais experimentos sejam replicados em outra linhagem celular de câncer de mama, como por exemplo do subtipo triplo negativo. Isso possibilitará uma análise comparativa das linhagens e elevará a abrangência científica no câncer de mama.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A superexpressão do lncRNA NORAD, em sua forma selvagem, foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade e proliferação celular, além da capacidade clonogênica em células MCF7, indicando seu papel protetor contra a progressão tumoral ao promover o sequestro das proteínas PUMILIO. Em contraste, a forma mutada, sem os sítios de interação com PUMILIO, não interferiu na viabilidade e proliferação celulares, porém aumentou a capacidade clonogênica, sugerindo uma modificação nos mecanismos moleculares associados ao NORAD. Apesar dos avanços na compreensão da dinâmica envolvendo NORAD e PUMILIO no câncer de mama do subtipo Luminal A, é necessário aprofundar em estudos futuros o entendimento dessa via molecular e de alvos possivelmente desregulados.

## REFERÊNCIAS


ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Artmed, 2010.

ALEXANDER, R. P. et al. Annotating non-coding regions of the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 559–571, ago. 2010.

ALSAEDY, H. K.; MIRZAEI, A. R.; ALHASHIMI, R. A. H. Investigating the structure and function of Long Non-Coding RNA (LncRNA) and its role in cancer. **Cellular, Molecular and Biomedical Reports**, v. 2, n. 4, p. 245–253, 1 dez. 2022.

ALSAEDY, H.; MIRZAEI, A.; ALHASHIMI, R. A. **Investigating the Structure and Function of Long Non-Coding RNA (LncRNA) and Its Role in Cancer**. Rochester, NY, 5 jun. 2023. Disponível em: <https://papers.ssrn.com/abstract=4470175>. Acesso em: 3 set. 2023

BARZAMAN, K. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106535, 1 jul. 2020.

BERTOLDO, J. B.; MÜLLER, S.; HÜTTELMAIER, S. RNA-binding proteins in cancer drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 28, n. 6, p. 103580, 1 jun. 2023.

BOHN, J. A. et al. Identification of diverse target RNAs that are functionally regulated by human Pumilio proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 362, 20 nov. 2017.

BONNEKOH, B. et al. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, n. 7, p. 487–490, 1 jan. 1989.

CAPELA, A. M. et al. NORAD-Regulated Signaling Pathways in Breast Cancer Progression. **Cancers**, v. 16, n. 3, p. 636, jan. 2024.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 4a ed**. Barueri: Editora Manole, 2019.

CHAUDHARY, S. et al. MUC16 promotes triple-negative breast cancer lung metastasis by modulating RNA-binding protein ELAVL1/HUR. **Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 25, 14 mar. 2023.

CHEN, D. et al. Pumilio 1 Suppresses Multiple Activators of p53 to Safeguard Spermatogenesis. **Current biology : CB**, v. 22, n. 5, p. 420, 16 fev. 2012.

COLLINS, F. S. et al. New Goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. **Science**, v. 282, n. 5389, p. 682–689, 23 out. 1998.

COOPER, T. A.; WAN, L.; DREYFUSS, G. RNA and Disease. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 777–793, fev. 2009.

CRICK, F. **On protein synthesis**. Symp Soc Exp Biol, , 1958.

DOGINI, D. B. et al. The new world of RNAs. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 285–293, 2014.

FARBEROV, S. et al. Structural features within the NORAD long noncoding RNA underlie efficient repression of Pumilio activity. **Nature Structural & Molecular Biology**, p. 1–13, 26 set. 2024.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, dez. 2006.

GALGANO, A. et al. Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF-Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the miRNA Regulatory System. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3164, 8 set. 2008.

GAO, P. et al. Ral GTPase Activation by Downregulation of RalGAP Enhances Oral Squamous Cell Carcinoma Progression. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 9, p. 1011–1019, 1 ago. 2019.

GEBAUER, F. et al. RNA-binding proteins in human genetic disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 22, n. 3, p. 185–198, mar. 2021.

GIULIANI, B.; TORDONATO, C.; NICASSIO, F. Mechanisms of Long Non-Coding RNA in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4538, jan. 2023.

GOLDSTROHM, A. C.; HALL, T. M. T.; MCKENNEY, K. M. Post-transcriptional Regulatory Functions of Mammalian Pumilio Proteins. **Trends in genetics : TIG**, v. 34, n. 12, p. 972, 10 out. 2018.

GRADISHAR, W. J. Tamoxifen—What Next? **The Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 378–384, 1 jul. 2004.

HAFNER, M. et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 129, 2 abr. 2010.

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

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1–31, 23 set. 2019.

HENTZE, M. W. et al. A brave new world of RNA-binding proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 327–341, maio 2018.

HUANG, H.; LI, L.; WEN, K. Interactions between long non-coding RNAs and RNA-binding proteins in cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 46, n. 6, p. 1–15, 1 dez. 2021.

INCA. **Disponível em:** <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estatisticas-de-cancer>. Acesso em: 26 nov. 2024.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023.

KUMAR, V. **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018.

LECHERMEIER, C. G. et al. Distribution of transcripts of the GFOD gene family members *gfod1* and *gfod2* in the zebrafish central nervous system. **Gene Expression Patterns**, v. 36, p. 119111, 1 jun. 2020.

LEE, S. et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. **Cell**, v. 164, n. 1, p. 69–80, 14 jan. 2016.

LEONARDI, E. et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 5, p. 416–419, 1 maio 1992.

MA, L.; BAJIC, V. B.; ZHANG, Z. On the classification of long non-coding RNAs. **RNA biology**, v. 10, n. 6, p. 925–933, jun. 2013.

MATHIAS, C. et al. Novel lncRNAs Co-Expression Networks Identifies LINC00504 with Oncogenic Role in Luminal A Breast Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2420, 28 fev. 2021.

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

MOO, T.-A. et al. Overview of Breast Cancer Therapy. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 339–354, jul. 2018.

MORRIS, A. R.; MUKHERJEE, N.; KEENE, J. D. Ribonomic Analysis of Human Pum1 Reveals cis-trans Conservation across Species despite Evolution of Diverse mRNA Target Sets. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 12, p. 4093, 14 abr. 2008.

MULLER, C. S. M. et al. The Potential of NORAD–PUMILIO–RALGAPB Regulatory Axis as a Biomarker in Breast Cancer. **Non-Coding RNA**, v. 8, n. 6, p. 76, dez. 2022.

MUNSCHAUER, M. et al. The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. **Nature**, v. 561, n. 7721, p. 132–136, set. 2018.

NANDAGOPAL, S. et al. Long Non Coding RNA in Triple Negative Breast Cancer: A Promising Biomarker in Tumorigenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP**, v. 24, n. 1, p. 49–59, 2023.

PATHMANATHAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 6, p. 512–516, 1 jun. 2013.

PERSONNIC, N. et al. A role for Ral GTPase-activating protein subunit β in mitotic regulation. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 13, p. 2977–2989, 2014.

RAJASEKARAN, S. et al. PUMILIO competes with AUF1 to control DICER1 RNA levels and miRNA processing. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 12, p. 7048–7066, 23 jun. 2022.

RAMANATHAN, M.; PORTER, D. F.; KHAVARI, P. A. Methods to study RNA–protein interactions. **Nature Methods**, v. 16, n. 3, p. 225–234, mar. 2019.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. Em: **Assay Guidance Manual [Internet]**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

RYDER, S. P. Pumilio RNA Recognition: The Consequence of Promiscuity. **Structure**, v. 19, n. 3, p. 277–279, 9 mar. 2011.

SMIALEK, M. J. et al. Characterization of RNP Networks of PUM1 and PUM2 Post-Transcriptional Regulators in TCam-2 Cells, a Human Male Germ Cell Model. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 984, 16 abr. 2020.

SOKOLOVA, A. et al. Hereditary breast cancer: syndromes, tumour pathology and molecular testing. **Histopathology**, v. 82, n. 1, p. 70–82, 2023.

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

STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201–218, abr. 2016.

STERNBURG, E. L. et al. Mammalian pumilio proteins control cellular morphology, migration, and adhesion. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3002, 21 fev. 2023.

TICHON, A. et al. A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12209, 13 jul. 2016.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 27, jan. 2020.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10–14, 2011.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 22 jan. 2019.

WANG, J.; WU, S.-G. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 15, p. 721–730, 31 dez. 2023.

WHO. **Disponível em:** <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 25 set. 2024a.

WILINSKI, D. et al. Recurrent rewiring and emergence of RNA regulatory networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. E2816–E2825, 4 abr. 2017.

WON, K.-A.; SPRUCK, C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 6, p. 1245–1261, 1 dez. 2020.

YANG, Z. et al. Noncoding RNA activated by DNA damage (*NORAD*): Biologic function and mechanisms in human cancers. **Clinica Chimica Acta**, v. 489, p. 5–9, 1 fev. 2019.

ZHANG, M. et al. Post-transcriptional regulation of mouse neurogenesis by Pumilio proteins. **Genes & Development**, v. 31, n. 13, p. 1354, 1 jul. 2017.

ZUBAIR, M.; WANG, S.; ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 26 fev. 2021.