

**FRANCIELE SCHLEMMER**

**IMITADORES SINTÉTICOS DE miR-7 E miR-34a ASSOCIADOS AO PACLITAXEL  
NA TERAPIA EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA**

**BRASÍLIA**

**2019**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FRANCIELE SCHLEMMER

IMITADORES SINTÉTICOS DE miR-7 E miR-34a ASSOCIADOS AO PACLITAXEL  
NA TERAPIA EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida  
Coorientadora: Prof. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

BRASÍLIA

FRANCIELE SCHLEMMER

IMITADORES SINTÉTICOS DE miR-7 E miR-34a ASSOCIADOS AO PACLITAXEL  
NA TERAPIA EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 31 de maio de 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida (presidente)  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dra. Doralina do Amaral Rabello Ramos (membro titular)  
Universidade de Brasília

---

Prof. Diêgo Madureira de Oliveira (membro titular)  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dra. Sônia Nair Bão (membro suplente)  
Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho à Patrícia, pela coragem e serenidade  
com que enfrentou (e venceu!) o câncer de mama.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo suporte financeiro e emocional que me possibilitou chegar até aqui.

Ao prof. Ricardo Titze de Almeida, pela oportunidade de crescimento, pessoal e profissional, e pela confiança inabalável no meu trabalho.

À profa. Marcella Lemos Brettas Carneiro, pelo apoio financeiro e por sempre atender minhas solicitações com carinho e prontidão.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica: Ana Catarina, Cíntia, Camila, Leidiane, Andrezza, Simoneide e Gabriel. Agradeço pelo apoio, chocolates, risadas e por tornarem esse lugar minha segunda casa. Aos colegas de corredor, Virgílio, Emília, Hayanna e Jaque, idem.

À profa. Sônia Nair Bão e aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela enriquecedora troca de experiências, em especial Eloísio, Daisy e Stefanny, meus companheiros na eterna jornada ICC – IB / IB – ICC.

Aos professores Osmindo Rodrigues Pires Júnior e Bergman Moraes Ribeiro, por gentilmente disponibilizarem o espaço físico e equipamentos de seus laboratórios para a realização dos meus ensaios.

Às amigas Natália e Amanda, pelos cafés (sem café) e longas conversas, científicas ou não, que me ajudaram a manter a sanidade mental nesse ambiente acadêmico.

À amiga Paula, pelos desabafos, dicas, ensinamentos e por partilhar sua experiência comigo, de forma sempre muito gentil.

Ao Júnior, pelo amor, paciência e apoio incondicional em tudo que eu faço. Obrigada por ser meu porto seguro em meio à tempestade.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPDF, pela viabilização financeira deste trabalho.

## *"Perseverança*

*Jogo a minha rede no mar da vida e às vezes, quando a recolho, descubro que ela retorna vazia. Não há como não me entristecer e não há como desistir. Deixo a lágrima correr, vinda das ondas que me renovam, por dentro, em silêncio: dor que não verte, envenena. O coração marejado, arrumo, como posso, os meus sentimentos. Passo a limpo os meus sonhos. Ajeito, da melhor forma que sei, a força que me move. Guardo a minha rede e deixo o dia dormir.*

*Com toda a tristeza pelas redes que voltam vazias, sou corajosa o bastante para não me acostumar com essa ideia. Se gente não fosse feita pra ser feliz, Deus não teria caprichado tanto nos detalhes. Perseverança não é somente acreditar na própria rede. Perseverança é não deixar de crer na capacidade de renovação das águas.*

*Hoje, o dia pode não ter sido bom, mas amanhã será outro mar. E eu estarei lá na beira da praia de novo."*

*Ana Jácomo*

## RESUMO

O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo, com mais de 2 milhões de novos casos diagnosticados em 2018. Paclitaxel é um antineoplásico amplamente utilizado, entretanto, seus efeitos adversos comprometem a continuidade do tratamento, gerando impacto na progressão da doença. Estudos baseados em RNA de interferência revelaram microRNAs como potencializadores terapêuticos, apontando o controle pós-transcricional da expressão gênica como alternativa promissora para o tratamento do câncer. Neste sentido, miR-34a e miR-7 se destacam como supressores tumorais no câncer de mama, visto que regulam genes envolvidos em vias de sinalização, proliferação celular e metástase. Assim, o aumento do conteúdo destes microRNAs em células cancerosas, por meio de imitadores sintéticos, representa uma nova abordagem terapêutica da doença. No presente estudo objetivou-se avaliar a capacidade dos imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 em sensibilizar as células de tumor mamário, das linhagens MCF-7 (ER+) e MDA-MB-231 (triplo-negativa), para os efeitos do paclitaxel. O nível de expressão gênica de miR-7 e miR-34a foi determinado por RT-qPCR e calculado pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT e a análise morfológica por meio de microscopia óptica. A linhagem MDA-MB-231 apresentou menor expressão basal de microRNAs em relação à MCF-7, tanto de miR-34a quanto de miR-7. O tratamento com 100 nM de paclitaxel promoveu o aumento da expressão dos microRNAs em estudo, em ambas as linhagens, exceto na expressão de miR-7 na linhagem MCF-7, na qual teve efeito oposto. A transfecção de células tumorais com imitadores sintéticos de miR-34a (30 nM) e de miR-7 (10 nM) reduziu a viabilidade celular em relação ao controle negativo, em ambas as linhagens testadas. A associação entre miR-34a *mimic* (30 nM) e paclitaxel (100 nM) foi mais efetiva na redução da viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231, comparativamente ao uso isolado do paclitaxel (74,7% versus 83,5%). Na linhagem MCF-7 houve a mesma tendência, porém sem significância estatística (77,6% versus 81,0%). Já a associação entre miR-7 *mimic* (10 nM) e paclitaxel (100 nM) foi mais efetiva na redução da viabilidade em comparação à terapia isolada, tanto em células MCF-7 (44,6% versus 77,2%) quanto em células MDA-MB-231 (73,3% versus 85,6%). Quando avaliados na mesma concentração (30 nM), miR-7 apresentou resultados mais expressivos que miR-34a na redução da viabilidade celular, em ambas as linhagens MCF-7 (37,9% versus 74,0%) e MDA-MB-231 (74,7% versus 88,8%). O aumento do conteúdo de miR-7 mediante oligonucleotídeos sintéticos na concentração de 10 nM promoveu alterações morfológicas, como perda de prolongamentos citoplasmáticos, rompimento da membrana e maior granulosidade, nas duas linhagens estudadas, porém mais evidentes na linhagem MCF-7. Com o presente estudo foi possível concluir que o uso de imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 representa uma abordagem promissora na terapêutica do câncer de mama e a associação destes microRNAs com paclitaxel apresenta, no geral, efeitos superiores em relação à terapia isolada sobre as alterações morfológicas e de viabilidade celular. Entre os microRNAs testados, miR-7 apresenta maior potencial terapêutico e surge como alvo promissor para a terapia gênica do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama; MCF-7; MDA-MB-231; miR-34a; miR-7; paclitaxel.

## ABSTRACT

Breast cancer places the second position among oncology disorders, with two million new cases in 2018. Chemotherapy with paclitaxel holds satisfactory anticancer efficacy. However, the inherent side effects bring additional difficulties in the patient's medical care. MicroRNAs are short double-stranded RNA interference (RNAi) molecules with the capacity to potentiate conventional antineoplastic drugs. In such sense, miR-34a and miR-7 suppress breast cancer growth by exerting an RNAi-mediated silencing of oncogenes involved in cell signaling, tumor growth, and metastasis. Targeting microRNA aberrantly expressed in cancer cells represents a wide avenue for drug development in oncology. In the present study, we evaluated whether miR-34 and miR-7 mimics could potentiate the effects of paclitaxel on breast cancer cells of lineages MCF-7 (ER+) and MDA-MB-231 (triple negative). miR-34a and miR-7 cell content was quantified by RT-qPCR, normalized to housekeeping genes, and presented as relative expression by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Cell viability, determined by MTT colorimetry assays, and morphological changes by optical microscopy. The triple-negative MDA-MB231 showed a lower miR-34a and miR-7 basal expression compared to MCF-7 cell line. Paclitaxel (100nM) increased the expression of microRNAs in both cancer cell lines, except for miR-7 in MCF-7 cells. Regarding microRNAs, miR-34a (30nM) and miR-7 (10nM) caused a significant reduction in cell viability of both lineages, in comparison to negative controls. miR-34a mimics (30nM) in association with 100nM paclitaxel potentiated the drug effect on the viability of MDA-MB-231 cells (74,7% versus 83,5%). The same occurred for MCF-7 cells (77,6% versus 81,0%), although the difference was not statistically significant. The second miRNA target also showed efficacy when associated with paclitaxel. miR-7 worked at lower concentration (10nM), meaning it holds increased potency. This miRNA potentiated paclitaxel actions on the viability of MCF-7 (44,6% versus 77,2%) and MDA-MB-231 (73,3% versus 85,6%) cell lineages. miR-7 showed superior efficacy in reducing cell viability in comparison with miR-34 at the same 30nM concentration, in both MCF-7 (37,9% versus 74,0%) and MDA-MB-231 (74,7% versus 88,8%) cells. The morphology of cancer cells was strikingly affected by miR-7 mimics (10nM). We observed a loss of cell extensions, membrane disruption, and increased granularity in both lineages, which were more pronounced in MCF-7 lineage. In conclusion, miR-34a and miR-7 mimics showed efficacy against tumor cell lines MCF-7 and MDA-MB-231, and ability to potentiate the effects of paclitaxel. Our results point miR-7 as the most promising target for a miRNA-targeted gene therapy for breast cancer.

Key words: breast cancer, MCF-7, MDA-MB-231, miR-7, miR-34, paclitaxel

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2018, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10 .....	15
Figura 2. Processo carcinogênico .....	16
Figura 3. Características adquiridas pelas células cancerosas .....	17
Figura 4. Estrutura da glândula mamária feminina e local de formação dos carcinomas .....	19
Figura 5. Representação da estrutura química do Paclitaxel .....	22
Figura 6. Biogênese dos microRNAs e mecanismo de regulação de mRNA por imitadores sintéticos – miRNAs mimics.....	24
Figura 7. Terapia de reposição de microRNAs direcionada para oncologia .....	25
Figura 8. Micrografias das linhagens celulares utilizadas no estudo.....	28
Figura 9. Diagrama esquemático do desenho experimental utilizado nos ensaios de viabilidade celular.....	32
Figura 10. Expressão basal de miRNAs nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 .....	37
Figura 11. Efeito do paclitaxel (25–200 nM) sobre a viabilidade de células de tumor mamário, avaliada pelo método de MTT .....	39
Figura 12. Expressão relativa de miR-34a após tratamento com paclitaxel 100 nM.	40
Figura 13. Expressão relativa de miR-7 após tratamento com paclitaxel 100 nM.....	40
Figura 14. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MCF-7 após transfecção com miR-34a mimic (30 nM) .....	42
Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após transfecção com miR-34a mimic (30 nM).....	43
Figura 16. Avaliação da viabilidade celular após transfecção com imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 (30 nM).....	44
Figura 17. Avaliação da viabilidade celular após transfecção com miR-7 mimic.....	45
Figura 18. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MCF-7 após transfecção com miR-7 mimic .....	46
Figura 19. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231, após transfecção com miR-7 mimic .....	47
Figura 20. Alterações morfológicas em linhagem MCF-7 induzidas por imitadores sintéticos de miRNAs isolados (10 nM).....	49

Figura 21. Alterações morfológicas em linhagem MDA-MB-231 induzidas por imitadores sintéticos de miRNAs isolados (10 nM) .....49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Imitadores sintéticos de miRNAs utilizados no estudo .....	29
Tabela 2 – Grupos e condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular com transfecção de miR-34a .....	31
Tabela 3 – Grupos e condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular com transfecção de miR-7. ....	31
Tabela 4 – Alvos utilizados nos ensaios de expressão gênica.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro  
BRCA1 – Oncogene de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 1  
BRCA2 – Oncogene de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 2  
cDNA – DNA complementar  
Cq – Ciclo de quantificação  
Ct – Ciclo limiar (*threshold cycle*)  
DMSO – Dimetilssulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
dNTP – Desoxinucleotideo de DNA  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor  
EMT – Epithelial-Mesenchymal Transition  
ER – Receptor de Estrogênio  
FDA – *Food and Drug Administration*  
HER2 – Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano  
HUB – Hospital Universitário de Brasília  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
LNA – *Locked nucleic acids*  
Mimic - Imitador Sintéticos de MicroRNA  
mRNA – RNA mensageiro  
MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]  
NCI – *National Cancer Institute*  
NTC – *No-template control*  
p53 – Proteína supressora de tumor p53  
PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada  
PR – Receptor de Progesterona  
Pré-miRNA – MicroRNA Precursor  
Pri-miRNA – MicroRNA primário  
PTX – Paclitaxel  
RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RPM – Rotações por minuto

RT-qPCR – Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia de Polimerase  
Quantitativa

SFB – Soro Fetal Bovino

siRNA – *Small-interfering RNA*

TNBC – Câncer de mama triplo-negativo (*Triple-negative Breast Cancer*)

UNB – Universidade de Brasília – UnB

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	15
1.2	BIOLOGIA DO CÂNCER	16
1.3	CÂNCER DE MAMA	18
1.3.1	Linhagens celulares como modelo experimental de câncer de mama	20
1.4	ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA O CÂNCER DE MAMA E SUAS LIMITAÇÕES	20
1.4.1	Quimioterapia	21
1.4.1.1	Paclitaxel	22
1.5	MICRORNAS	23
1.5.1	MicroRNAs no câncer: miR-34a e miR-7	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1	GERAL	27
2.2	ESPECÍFICOS	27
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1	LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	28
3.2	TRANSFEÇÃO CELULAR COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MICRORNAS (MIMCS)	29
3.3	TRATAMENTO COM O QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL	30
3.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	31
3.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	33
3.5.1	Extração e Quantificação	33
3.5.2	RT-qPCR	33
3.6	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	35
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1	EXPRESSÃO GÊNICA BASAL DE MIR-34A E MIR-7 EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA	37
4.2	CURVA DOSE-RESPOSTA DO QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL	38
4.3	EXPRESSÃO GÊNICA DE MIR-34A E MIR-7 APÓS TRATAMENTO COM PACLITAXEL	39

4.4	EFEITO DO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-34A, ISOLADO OU ASSOCIADO AO PACLITAXEL, SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA.....	41
4.5	COMPARAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DA TRANSFEÇÃO COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MIR-34A E MIR-7 .....	43
4.6	CURVA DOSE-RESPOSTA DO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-7.....	44
4.7	EFEITO DO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-7, ISOLADO OU ASSOCIADO AO PACLITAXEL, SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA .....	45
4.8	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS PELO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-7, ISOLADO OU ASSOCIADO AO PACLITAXEL. ....	48
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE MIR-7 APÓS A TRANSFEÇÃO COM IMITADOR SINTÉTICO.....</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Atualmente, as doenças neoplásicas são responsáveis por um em cada seis óbitos em todo o mundo, mais do que a mortalidade decorrente de HIV / AIDS, tuberculose e malária, somadas (1). Até 2040, a estimativa global é de 27,5 milhões de novos casos e 16,3 milhões de mortes por câncer. Entretanto, supõe-se que estes números sejam ainda superiores, devido à adoção crescente pela população de comportamentos alimentares e estilos de vida pouco saudáveis, além de mudanças nos padrões reprodutivos, como gravidez tardia, principalmente em países em desenvolvimento (1-3).

Para o Brasil, são estimados 600 mil casos novos de câncer, para cada ano do biênio 2018-2019. À exceção do câncer de pele não melanoma, o tipo de câncer mais incidente em homens será o de próstata (31,7%), seguido por pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, o tipo com maior incidência prevista é o câncer de mama (29,5%), seguido por intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%). A incidência de câncer de mama entre mulheres é crescente e progressiva a partir dos 40 anos, bem como a mortalidade decorrente dessa neoplasia (4) (Figura 1).

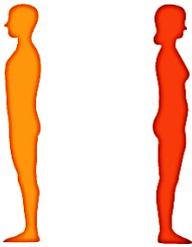
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2018, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10. (Adaptado de Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2018) (4).

Em termos globais, excluindo-se os cânceres de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais frequente, com mais de 2 milhões de novos casos diagnosticados em 2018, representando 25% de todos os novos casos de câncer em mulheres, com previsão de cerca de 626.700 mortes para o mesmo ano (1). Para o Brasil, estimam-se 59.700 novos casos, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (4).

## 1.2 BIOLOGIA DO CÂNCER

Câncer é o termo utilizado para designar um grupo de doenças genéticas, altamente heterogêneas, caracterizadas pela proliferação desordenada de células que perderam a capacidade de formar tecidos com organização e função normais (2, 5).

O processo de formação de tumores em seres humanos, conhecido como carcinogênese, apresenta várias etapas e pode se estender por décadas, devido à sua complexidade (5, 6). No início do processo, as células com fenótipo e organização normais começam a apresentar comportamento proliferativo acelerado, denominado de hiperplasia. Estas células hiperplásicas podem evoluir para displasias que, além da proliferação exacerbada, apresentam anomalias citológicas, como alterações no tamanho e forma do núcleo e aumento da atividade mitótica. Nesta etapa já é recomendado o monitoramento e/ou tratamento, uma vez que a displasia é a etapa transitória até a formação das neoplasias. As neoplasias podem ser classificadas como benignas ou malignas, sendo as neoplasias malignas denominadas efetivamente de câncer (5, 7) (Figura 2).

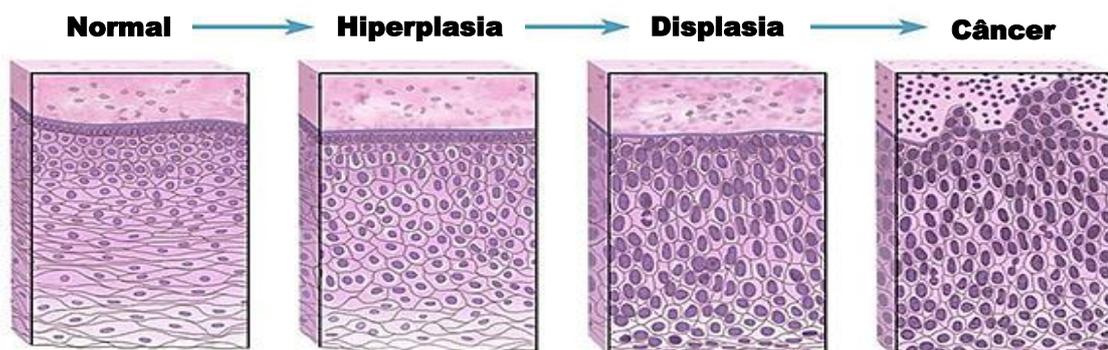


Figura 2. Processo carcinogênico. (Adaptado de National Cancer Institute - NCI) (7).

Muitos elementos podem interferir na promoção ou progresso da carcinogênese, de forma isolada ou simultaneamente. Existem alguns fatores de risco considerados não modificáveis como idade, mutações genéticas hereditárias ou condições imunológicas; porém, outros fatores podem ser combatidos, como o excesso de peso corporal, sedentarismo, má nutrição e a exposição a agentes potencialmente mutagênicos, como tabaco e álcool (2, 8).

Durante as múltiplas etapas do processo carcinogênico, as células adquirem características que as diferenciam das células normais e que irão determinar o sucesso da progressão tumoral. Conforme revisado por Hanahan e Weinberg, 2011 (9), estas características incluem a capacidade de sustentação da sinalização proliferativa, a evasão dos supressores de crescimento, estratégias de fuga do sistema imunológico, imortalidade replicativa, mecanismos de promoção da inflamação, capacidade de invasão e metástase, indução da angiogênese, características de instabilidade do genoma e mutações, resistência à morte celular e reprogramação do metabolismo energético (Figura 3).



Figura 3. Características adquiridas pelas células tumorais (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011) (9).

As neoplasias podem ser classificadas em duas categorias gerais, de acordo com o grau de agressividade de seu crescimento. Os tumores benignos apresentam crescimento localizado, geralmente lento e sem invasão a tecidos adjacentes. Já os

demais tumores, que alcançam a membrana basal e invadem o tecido subjacente são ditos malignos (5, 10). Além do prejuízo causado pelos tumores primários, as células cancerosas podem desenvolver habilidades de migração para regiões adjacentes do corpo, por meio da corrente sanguínea ou do sistema linfático, atingindo órgãos anatomicamente distantes, processo denominado de metástase. Cerca de 90% da mortalidade relacionada ao câncer é causada por tumores metastáticos (5, 6).

A sucessão de eventos biológicos necessários para a formação de metástases é denominada de “cascata de invasão-metástase”. As etapas básicas para o sucesso do processo metastático em tumores sólidos consistem no intravasamento das células cancerosas para os vasos sanguíneos ou linfáticos, a sobrevivência durante o percurso até o extravasamento e aderência a outros órgãos distantes do tumor primário, com conseqüente adaptação ao novo microambiente, e finalmente o reinício do processo proliferativo, gerando novas neoplasias detectáveis clinicamente (11).

Cerca de 80% dos tumores em humanos desenvolvem-se a partir de células epiteliais que revestem os órgãos e tecidos, sendo denominados de carcinomas. Dentre os principais exemplos de carcinoma estão os tumores de pele, fígado, ovário, bexiga e mama (5).

### 1.3 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama apresenta fatores etiológicos específicos, que se somam aos elementos de desenvolvimento canceroso descritos acima. Entre os fatores de risco atribuídos, em mulheres, estão a menarca precoce (antes dos 12 anos) e a menopausa tardia (após os 55 anos), nuliparidade, primeira gravidez após os 30 anos, uso de alguns anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal, bem como a predisposição genética, como as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, associadas a neoplasias de mama em idade jovem (4).

A maioria dos carcinomas de mama tem origem no epitélio lobular ou ductal da glândula mamária (Figura 4). De acordo com sua característica infiltrativa, os tumores podem ser classificados como *in situ*, quando não acometem os tecidos adjacentes, e invasivos, quando atingem o tecido mamário circundante. Em torno de 85% a 90% dos carcinomas invasivos são de origem ductal (12-15).

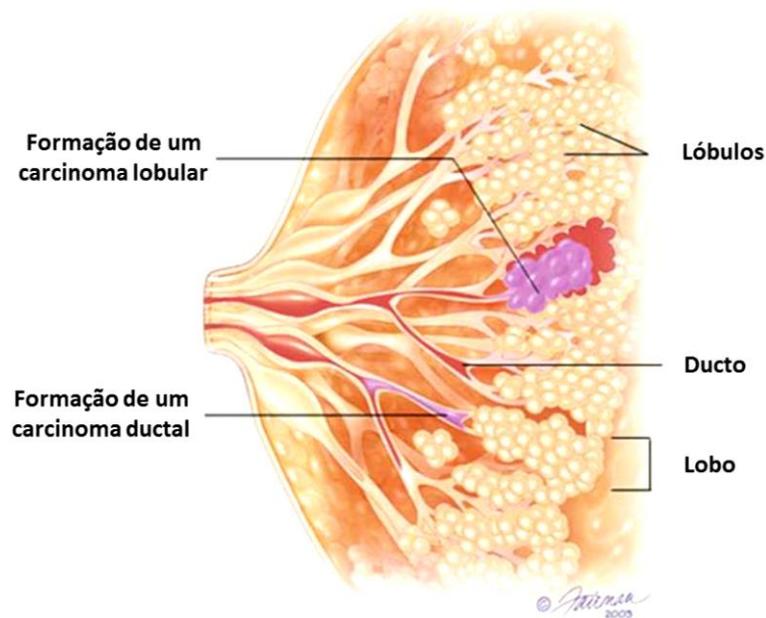


Figura 4. Estrutura da glândula mamária feminina e locais de formação dos carcinomas. (16)

A progressão da doença poderá transcorrer do tumor primário localmente situado no interior da mama (estágio 1) propagando-se para os tecidos e linfonodos próximos (estágios 2 e 3) e para órgãos distantes (metástase à distância / estágio 4). Pulmões, ossos, fígado e cérebro são órgãos frequentemente acometidos por metástases de câncer de mama (15).

O câncer de mama é uma doença complexa que apresenta alto grau de heterogeneidade, tanto inter quanto intratumoral. Por esta razão, a classificação dos tumores mamários em subtipos auxilia no diagnóstico, prognóstico e na escolha da terapia mais adequada para cada paciente (17, 18). As metodologias atualmente empregadas na classificação tumoral compreendem análises histológicas, clínicas e patológicas do tumor primário, bem como a presença ou ausência de doença metastática detectável e a expressão de marcadores moleculares (13).

Biomarcadores moleculares acurados, já disponíveis no mercado, oferecem valioso apoio ao diagnóstico clínico, haja visto que tumores morfológicamente semelhantes podem apresentar prognósticos e respostas terapêuticas muito diversas (19). Com base na classificação molecular, podemos dividir os tumores de mama em três grupos principais: positivos para receptores hormonais, estrógeno (ER+) e/ou progesterona (PR+); positivos para o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) e negativos para os três marcadores anteriores, denominados triplo-negativos (*Triple-negative breast cancer* – TNBC) (17, 20).

O subtipo triplo-negativo representa cerca de 15% de todos os casos de câncer de mama e, em sua maioria, são classificados como carcinomas ductais invasivos. Estes carcinomas acometem com maior frequência mulheres jovens e apresentam pior prognóstico, pela falta de uma terapia direcionada e eficácia limitada das abordagens terapêuticas disponíveis, sendo a quimioterapia a principal opção de tratamento (20-22).

### **1.3.1 Linhagens celulares como modelo experimental de câncer de mama**

Linhagens celulares são amplamente utilizadas como modelos para o estudo do câncer, pois fornecem ferramentas essenciais para a elucidação de perguntas biológicas mais complexas. Nos modelos *in vitro* de câncer de mama, as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 são comumente empregadas, sendo ambas originadas de efusão pleural e pertencentes a subtipos de carcinoma lobular metastático (23, 24).

A linhagem celular MCF-7 é utilizada como modelo de câncer de mama hormônio-dependente, uma vez que apresenta *status* positivo para o receptor de estrogênio (ER+). Possui morfologia epitelial, padrão de crescimento em colônias e apresenta baixa capacidade invasiva (23-26). Já a linhagem MDA-MB-231 apresenta *status* negativo para os receptores hormonais (ER- / PR-) e não superexpressa o gene HER2 (HER2-); tal linhagem celular é assim utilizada como modelo de câncer de mama triplo-negativo. Além disso, células MDA-MB-231 apresentam alta expressão de vimentina, um marcador do fenótipo mesenquimal, e possuem alta capacidade invasiva (23, 24, 26).

## **1.4 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA O CÂNCER DE MAMA E SUAS LIMITAÇÕES**

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos na área de cancerologia nos últimos anos, com o desenvolvimento de ferramentas para diagnósticos mais

acurados e novas abordagens terapêuticas, o tumor de mama ainda representa a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo todo (4).

As alternativas terapêuticas para o câncer de mama compreendem os tratamentos locais e as terapias sistêmicas. Localmente, as opções incluem cirurgia conservadora com remoção apenas do tumor ou mastectomia, onde ocorre a retirada total da mama, e a radioterapia. Já os tratamentos sistêmicos compreendem a hormonioterapia, para o tratamento de subtipos positivos para os receptores hormonais (RE+ e RP+); a imunoterapia, com anticorpos monoclonais que estimulam o sistema imune; as chamadas terapias alvo, como as direcionadas para tumores HER2+ ou com mutação no gene BRCA, e a quimioterapia, amplamente utilizada para vários tipos tumorais. Os tratamentos acima podem ser realizados isoladamente, como monoterapia, ou associados, principalmente no tratamento de tumores metastáticos, que apresentam alta resistência aos agentes terapêuticos (11, 13, 27).

#### **1.4.1 Quimioterapia**

Em decorrência dos avanços na compreensão da biologia tumoral e da utilização de biomarcadores para o desenvolvimento de terapias personalizadas, os últimos anos trouxeram grande melhoria na relação risco-benefício dos tratamentos quimioterápicos, com efeitos benéficos na sobrevida dos pacientes, além de identificar e resguardar os pacientes que não se beneficiam desta modalidade terapêutica (28). Entretanto, por sua natureza sistêmica e altamente tóxica, os agentes quimioterápicos ainda apresentam reduzida especificidade e efeitos adversos frequentes, uma vez que agem tanto em células cancerosas quanto em células saudáveis (29).

Os efeitos colaterais mais comuns decorrentes da quimioterapia incluem algumas reações moderadas como perda de cabelo, surgimento de aftas, fadiga, perda de apetite ou alterações de peso, náusea, vômito e diarreia, além de efeitos mais graves como infecções, hemorragias, infertilidade, comprometimento da memória e danos cardíacos, que podem aparecer meses ou até anos após o término do tratamento (27, 29).

A quimioterapia pode ser realizada como terapia única ou em conjunto com outros tratamentos locais ou sistêmicos. Em associação a um procedimento cirúrgico

pode ser empregada antes (quimioterapia neoadjuvante) ou após a cirurgia (quimioterapia adjuvante). Sua administração pode ocorrer por via oral ou intravenosa, sendo as drogas mais utilizadas as antraciclinas, como doxorrubicina e epirubicina, os taxanos, como paclitaxel e docetaxel e os agentes de platina, como cisplatina e carboplatina (27).

Quimioterapias baseadas em taxanos são opções terapêuticas de primeira linha para o tratamento de diversos tumores de mama, especialmente dos tumores triplo-negativos, tanto em esquema adjuvante quanto neoadjuvante. Associações entre taxanos e outros quimioterápicos, como paclitaxel + carboplatina, são muito utilizadas no tratamento do câncer de mama metastático (22).

#### 1.4.1.1 Paclitaxel

Paclitaxel (PTX) é um agente quimioterápico da classe dos taxanos que apresenta a fórmula química  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  e peso molecular de 853.918 g/mol (Figura 5) (30). Seu mecanismo de ação principal é a inibição da dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos, pela aglomeração dos dímeros de tubulina, promovendo a parada do ciclo celular na fase G2/M e consequente indução da apoptose (31-33).

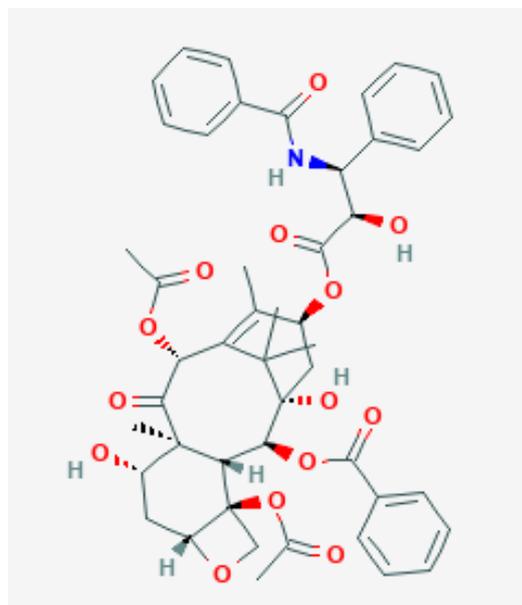


Figura 5. Representação da estrutura química do Paclitaxel (30)

Foi isolado e identificado pela primeira vez em 1967 a partir da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) durante um programa de triagem de extratos derivados de plantas com potencial atividade antitumoral, desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer do Estados Unidos. Em 1994 o paclitaxel foi aprovado pela agência federal americana FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do câncer de mama, e vem sendo amplamente utilizado como agente terapêutico de uma variedade de tumores humanos nas últimas décadas (22, 33).

Um dos problemas encontrados no emprego do paclitaxel na prática clínica é sua limitada solubilidade em água, sendo necessária a utilização de veículo contendo óleo de rícino polioxetilado (Cremophor EL) e etanol, substâncias que causam efeitos colaterais indesejáveis, exigindo o uso de pré-medicação com corticosteróides e anti-histamínicos (31, 32, 34, 35). Entre os principais efeitos colaterais atribuídos ao tratamento com paclitaxel, incluindo reações de hipersensibilidade aos solventes, estão a neutropenia, fadiga e neuropatia periférica (mãos e pés), com sintomas relacionados à dormência, dor, sensação de queimação ou formigamento e hipersensibilidade ao frio ou ao calor (27).

Diante do exposto, se faz urgente a busca de estratégias terapêuticas alternativas com a finalidade de aumentar a eficiência das drogas convencionais, com diminuição da dose empregada e conseqüente redução dos efeitos colaterais que comprometem a continuidade do tratamento, gerando impacto na progressão da doença.

## 1.5 MICRORNAS

Em decorrência do desenvolvimento de ferramentas avançadas em biologia molecular e da compreensão crescente sobre o padrão de mutações em doenças genéticas complexas, como o câncer, pesquisas para o estabelecimento de biomarcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e na seleção da melhor abordagem terapêutica vem ganhando destaque (36-39).

MicroRNAs, ou miRNAs, são RNAs curtos, de cadeia dupla, não codificadores de proteínas, que regulam a expressão de vários genes pelo processo de RNA de interferência (RNAi) (40, 41). Em animais, são transcritos pela RNA polimerase II

(Pol II), formando um microRNA primário em forma de grampo, denominado de pri-miRNA. Estes são processados no núcleo da célula pelas enzimas Drosha e DGCR8, originando microRNAs precursores, os pré-miRNAs, que serão transportados ao citoplasma pela proteína Exportina-5. No citoplasma irá ocorrer um novo processamento, executado pela enzima Dicer acoplada à TRBP e PACT, resultando em um miRNA duplex com cerca de 18 a 25 nucleotídeos. A fita passageira (*sense*) é então retirada e a fita guia (*antisense*), representando o microRNA maduro, é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA – complexo RISC (*Induced Silencing Complex*), contendo proteínas argonautas, que irão auxiliar na condução do complexo RISC até RNAs mensageiros (mRNAs) alvos que apresentem sequências parcialmente complementares na região 3'-UTR (*untranslated region*), resultando no silenciamento gênico por redução da tradução ou perda de estabilidade do mRNA) (41-44) (Figura 6).

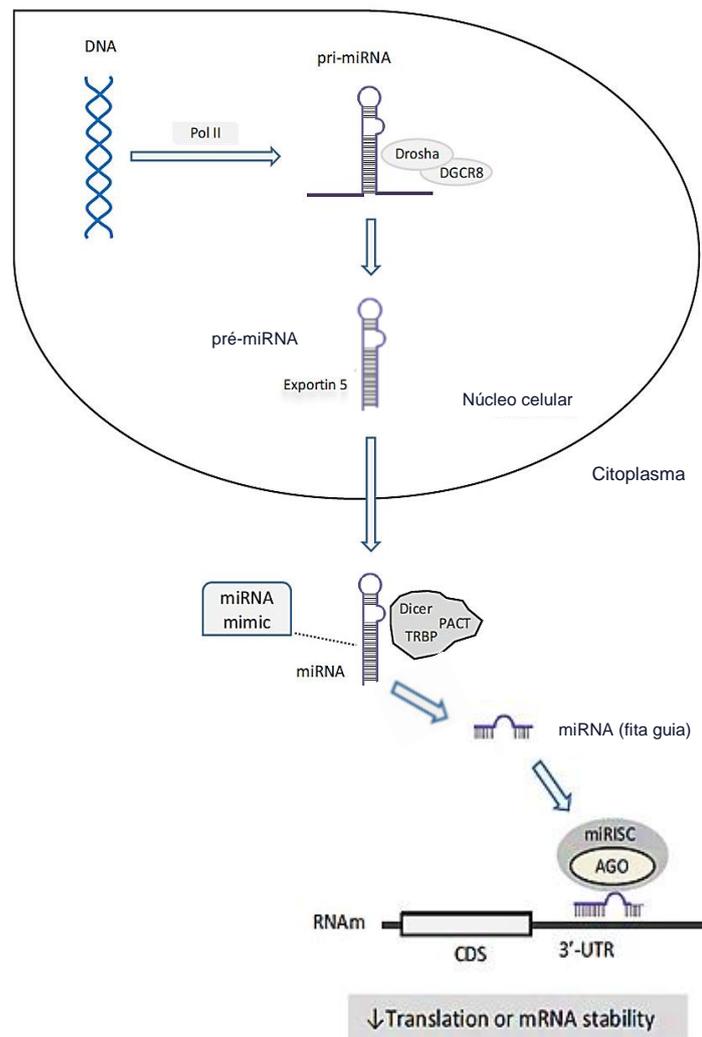


Figura 6. Biogênese dos microRNAs e mecanismo de regulação de mRNA por imitadores sintéticos – miRNAs mimics (Adaptado de Titze-de-Ameida e Titze-de-Almeida, 2018) (41).

Terapias baseadas em RNAi direcionadas para o tratamento do câncer compreendem o uso de RNAs curtos de interferência - siRNAs (*Small-interfering RNA*) e microRNAs. Em relação aos microRNAs, seu conteúdo pode ser regulado para baixo ou para cima, com a utilização de inibidores de miRNAs (antimiRs) ou imitadores sintéticos (miRNA mimics) (39, 45).

Os imitadores sintéticos de microRNAs, ou miRNAs *mimics*, são moléculas sintéticas semelhantes aos microRNAs endógenos, que irão mimetizar o papel celular dos mesmos. As moléculas exógenas inseridas nas células irão se ligar ao complexo RISC, atuando de maneira semelhante aos microRNAs celulares, restabelecendo, desta maneira o equilíbrio orgânico da célula (38, 42). A possibilidade de modulação da expressão de microRNAs por meio de moléculas sintéticas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, oferece não só ferramentas para melhor compreensão dos mecanismos moleculares regulados por estas moléculas, mas também revela uma promissora utilização terapêutica (46) (Figura 7).

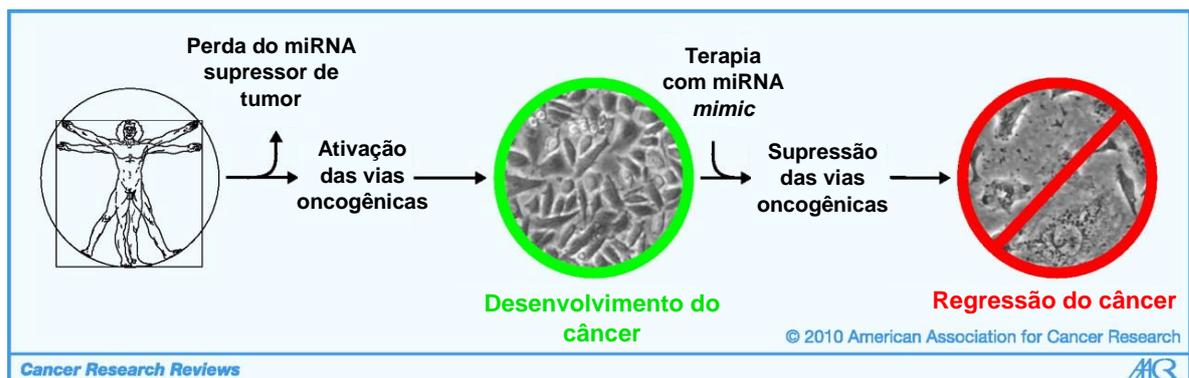


Figura 7. Terapia de reposição de microRNAs direcionada para oncologia. A perda do miRNA supressor de tumor leva a hiperativação de vias oncogênicas. A reposição destes miRNAs restabelece a função do miRNA supressor de tumor ausente, suprime as vias oncogênicas e o crescimento de células cancerosas (Adaptado de Bader e Winkler, 2010) (38).

### 1.5.1 MicroRNAs no câncer: miR-34a e miR-7

A expressão aberrante de microRNAs tem sido relacionada a vários processos biológicos no câncer, incluindo carcinogênese, progressão tumoral, morte celular e resistência a drogas, modulando tanto vias oncogênicas quanto vias supressoras de tumor, representando não apenas alvos terapêuticos, mas também promissores biomarcadores para diagnóstico e prognóstico (38, 44, 46-48).

O miR-34a pertence à família miR-34, que é composta também pelos microRNAs miR-34b e miR-34c, foi originalmente caracterizado em 2007 e vem ganhando destaque desde então pelo seu importante papel como supressor de tumor, tendo sua expressão epigeneticamente silenciada em vários tipos de câncer (47, 49, 50).

A expressão de miR-34a em tecidos tumorais de mama é comparativamente mais elevada nos carcinomas de mama não metastáticos, intermediária nos tecidos adjacentes e praticamente ausente nas metástases ósseas, demonstrando sua associação com vias de invasão e metástase (51). É, também, regulado negativamente sob condições de hipóxia, influenciando o microambiente tumoral, contribuindo para o processo metastático (52). O aumento do conteúdo com miR-34a exógeno contribuiu para a inibição da proliferação celular, indução da apoptose, e supressão da transição epitelial-mesenquimal em células cancerosas (47, 52).

Outro microRNA que desempenha papel significativo como supressor tumoral é o microRNA-7 (miR-7). Semelhante ao miR-34a, o miR-7 também atua na indução da apoptose e na inibição da proliferação e da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de câncer de mama (53). Foi identificado pela primeira vez por Lagos-Quintana e Tuschl, em 2001 (54). Em humanos, o miRNA-7 é codificado por três genes distintos: miR-7-1, miR-7-2 e miR-7-3. Os alelos miR-7-1 e miR-7-3 são codificados em introns dos genes HNRNPK e PGSF1a, respectivamente, já o alelo miR-7-2 está situado em uma região intergênica do cromossomo 15. Apesar de certa variabilidade entre os precursores de miR-7, todas as três sequências compartilham a mesma fita guia madura (41, 55).

O miR-7 também vem sendo estudado como biomarcador prognóstico, podendo auxiliar na definição da melhor abordagem terapêutica no câncer de mama, com base no seu perfil de expressão intratumoral (56) e por estar negativamente correlacionada com o estágio, grau e sobrevida dos pacientes com este tipo de câncer (57).

A motivação do presente estudo foi a hipótese de que seria viável uma terapêutica conjunta baseada na tecnologia de RNAi com imitadores de microRNAs associados ao paclitaxel, um quimioterápico já consolidado, visando aumento da eficiência no combate às células cancerosas e diminuição da dose do medicamento, obtendo assim melhores resultados e redução dos efeitos colaterais decorrentes da quimioterapia (29, 32).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar se imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 sensibilizam células de tumor mamário para os efeitos do quimioterápico paclitaxel.

### 2.2 ESPECÍFICOS

a) Determinar a expressão basal de miR-34a e miR-7 nas linhagens de tumor mamário MCF-7 e MDA-MB-231;

b) Avaliar a expressão de miR-34a e miR-7 nas linhagens celulares expostas ao quimioterápico paclitaxel;

c) Examinar os efeitos de oligonucleotídeos sintéticos de miR-34a e miR-7, em uso isolado ou em associação ao paclitaxel, sobre a viabilidade das células em estudo;

d) Identificar as possíveis alterações morfológicas em células expostas aos microRNAs, isoladamente ou em associação ao quimioterápico paclitaxel.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas duas linhagens de adenocarcinoma mamário humano, MCF-7 (ATCC® HTB-22™) e MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Sônia Nair Bão, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília – UnB (Figura 8).

A linhagem MCF-7 foi cultivada em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com HEPES (10 mM); D-glicose (2,5 g/L); Bicarbonato de Sódio (2 g/L); Piruvato de Sódio (1 mM); 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), mantida em estufa com atmosfera úmida a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio L-15 (Leibovitz) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), mantida em estufa com atmosfera úmida a 37° C, na ausência de CO<sub>2</sub>.

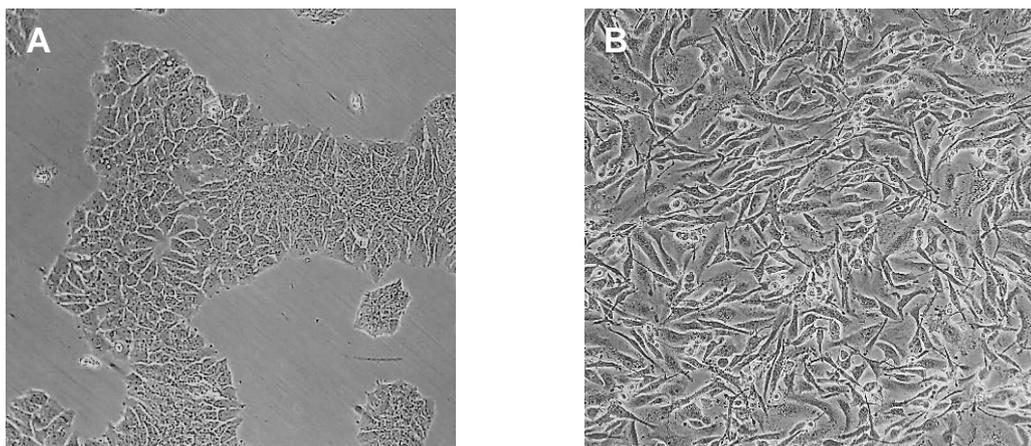


Figura 8. Micrografias das linhagens celulares utilizadas no estudo. A) MCF-7; B) MDA-MB231. Imagens capturadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100), com aumento de 20X.

As células foram previamente cultivadas em frascos para cultivo celular (25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>) até a confluência de 70-90%, lavadas duas vezes com tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) (Laborclin Ltda.), desaderidas com o auxílio de Tripsina/EDTA

0,25% (Gibco) por 3 minutos a 37°C, seguido de adição de meio de cultura contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) para inativação da tripsina. As células foram então transferidas para tubo de polipropileno, centrifugadas a 1500 RPM por 3 minutos, ressuspensas em PBS e contadas na Câmara de Neubauer. O número de células viáveis orientou o cálculo da quantidade de células utilizada nos ensaios deste estudo.

### 3.2 TRANSFEÇÃO CELULAR COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MICRORNAS (*MIMICS*)

A transfeção foi realizada 24 horas após o plaqueamento das células, em confluência de 30-50%, conforme recomendações do fabricante do reagente de transfeção INTERFERin (Polyplus-transfection®). Trata-se de um polímero catiônico em solução hidroalcoólica, desenvolvido para oferecer alta eficiência de transfeção com baixas concentrações de miRNA.

Os oligonucleotídeos utilizados foram: miR-34a *mimic* (miRCURY LNA miRNA mimic hsa-miR-34a-5p, Exiqon), miR-7 *mimic* (CONmiR mimic mmu-miR-7a-5p, Riboxx e mirVana miRNA mimic api-miR-7, Ambion) e *mimic* Controle Negativo - *Scramble* (Negative Control miRCURY LNA miRNA mimic, Qiagen) (Tabela 1). Os produtos liofilizados foram dissolvidos em água *nuclease-free* e aliquotados na concentração estoque de 10 µM.

Tabela 1 – Imitadores sintéticos de miRNAs utilizados no estudo

<b>Imitador sintético</b>	<b>Sequência nucleotídica da fita guia (<i>guide strand</i>)</b>	<b>Fabricante</b>
<b>mmu-miR-7a-5p*</b>	5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG <u>CCCC</u> -3'**	Riboxx
<b>api-miR-7</b>	5'-UGGAAGACUGAUUUUGUUGUU-3'	Ambion
<b>hsa-miR-34a-5p</b>	5'-UGGCAGUGUCUUAGCAGCUGGUUGU-3'	Exiqon
<b><i>Scramble</i></b>	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'	Qiagen

\* A sequência de miR-7a-5p é idêntica em camundongos (mmu) e em seres humanos.

\*\* Sublinhados os quatro nucleotídeos de citosina adicionados como parte da tecnologia do *mimic*.

Para os ensaios de viabilidade celular em placas de 96 poços os microRNAs *mimics* foram diluídos em 50 µL de meio Opti-MEM (Gibco) e acrescidos 0,5 µL de

INTERFERin para a formação do complexo de transfecção. Para reduzir a variabilidade intra-ensaio, preparou-se uma mesma mistura para todos os poços. Este complexo de transfecção foi homogeneizado em vórtex por 10 segundos e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Durante a incubação, o conteúdo dos poços foi substituído por 100  $\mu$ L de meio de cultura pré-aquecido a 37°C, onde foram acrescentados posteriormente 50  $\mu$ L do complexo de transfecção aos grupos com reposição de miRNAs ou 50  $\mu$ L de Opti-MEM aos poços dos grupos não transfectados, totalizando um volume final de 150  $\mu$ L por poço.

Quanto aos ensaios de expressão gênica e análise morfológica, realizados em placas de 06 poços, foi seguido o mesmo protocolo descrito acima, ajustando-se os volumes para 200  $\mu$ L de Opti-MEM e 7  $\mu$ L de INTERFERin por poço. O conteúdo dos poços foi substituído por 1,8 mL de meio pré-aquecido a 37°C e acrescentados posteriormente 200  $\mu$ L do complexo de transfecção ou apenas Opti-MEM nos grupos controle, resultando em um volume final de 2 mL por poço.

### 3.3 TRATAMENTO COM O QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL

O medicamento paclitaxel (PTX) utilizado no presente estudo (Accord Farmacêutica Ltda.) foi cedido pela farmácia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Apresentado na forma farmacêutica de solução injetável, cada mL contém 6 mg de paclitaxel, óleo de rícino polioxietilado purificado, 49,7% (v/v) de álcool desidratado e metabissulfito de sódio (31).

A partir da solução original a 7 mM foram feitas duas diluições seriadas no momento da utilização (1:100 e 1:10), em meio Opti-MEM (Gibco), resultando em uma solução de trabalho na concentração de 7  $\mu$ M. Por fim, a solução de trabalho foi diluída, em meio de cultura específico para cada linhagem, de maneira que a concentração final em cada poço fosse de 25, 50, 100 ou 200 nM nos ensaios de dose-resposta, ou de 100 nM nos demais ensaios. Experimentos em placas de 96 poços foram executados com volume final de 200  $\mu$ L enquanto aqueles realizados em placas de 06 poços com volume final de 3 mL. Volumes idênticos de meio de cultura foram adicionados aos poços dos grupos que não receberam o tratamento com PTX.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), com base na habilidade das células metabolicamente ativas de reduzirem os sais de tetrazolium (amarelo) ao produto formazan (púrpura), pela ação de desidrogenases mitocondriais (58).

Para determinação dos efeitos da transfecção com miRNAs sobre a viabilidade celular, avaliados isoladamente ou associados ao quimioterápico paclitaxel, foram seguidas as condições experimentais detalhadas nas tabelas 2 e 3 e desenho experimental descrito na figura 9.

Tabela 2 – Grupos e condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular com transfecção de miR-34a

Grupo	Sigla	Condições experimentais
I	CN	Controle Negativo. Células apenas com meio de cultura
II	RTF	Meio de cultura + reagente de transfecção
III	miR-34a	Transfecção com miR-34a <i>mimic</i> (30 nM)
IV	miR-34a + PTX	Transfecção com miR-34a <i>mimic</i> (30 nM) + Tratamento com paclitaxel (100 nM)
V	SCRB	Transfecção com <i>mimic</i> controle negativo - <i>scramble</i> (30 nM)
VI	SCRB + PTX	Transfecção com <i>mimic scramble</i> (30 nM) + Tratamento com paclitaxel (100nM)
VII	PTX	Tratamento com paclitaxel (100 nM)

Tabela 3 – Grupos e condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular com transfecção de miR-7.

Grupo	Sigla	Condições experimentais
I	CN	Controle Negativo. Células apenas com meio de cultura
II	RTF	Meio de cultura + reagente de transfecção
III	miR-7	Transfecção com miR-7 <i>mimic</i> (10 nM)
IV	miR-7 + PTX	Transfecção com miR-7 <i>mimic</i> (10 nM) + Tratamento com paclitaxel (100 nM)
V	SCRB	Transfecção com <i>mimic</i> controle negativo - <i>scramble</i> (10 nM)
VI	SCRB + PTX	Transfecção com <i>mimic scramble</i> (10 nM) + Tratamento com paclitaxel (100 nM)
VII	PTX	Tratamento com paclitaxel (100 nM)

Para execução dos ensaios nos grupos experimentais acima foram semeadas  $3 \times 10^3$  células por poço, em placas de poliestireno de 96 poços, mantendo-se as condições de cultivo por 24 horas para aderência das células. Foram realizadas as transfecções com *mimics* de miR-34a, miR-7 ou *Scramble* e 24 horas após a transfecção realizou-se o tratamento com paclitaxel a 100 nM. Transcorridas 48 horas do tratamento, o conteúdo dos poços foi substituído por 150  $\mu\text{L}$  de solução de meio de cultura contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após incubação por 3 horas em estufa umidificada (37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ ), os cristais de formazan foram solubilizados em 150  $\mu\text{L}$  de Dimetilsulfóxido (DMSO). Adicionou-se também 150  $\mu\text{L}$  de DMSO a poços sem células utilizados como “brancos” para posterior normalização dos resultados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Microplate Photometer, ThermoScientific), utilizando o comprimento de onda de 595 nm.

Os valores de absorbância dos grupos experimentais II a VII foram convertidos em porcentagem de viabilidade em relação ao valor obtido no grupo I (CN). A média dos valores obtidos somente com o reagente de transfecção (grupo II) foi utilizada para normalizar os resultados obtidos nos grupos transfectados (III a VI). Portanto, os dados do grupo II não foram expressos graficamente.

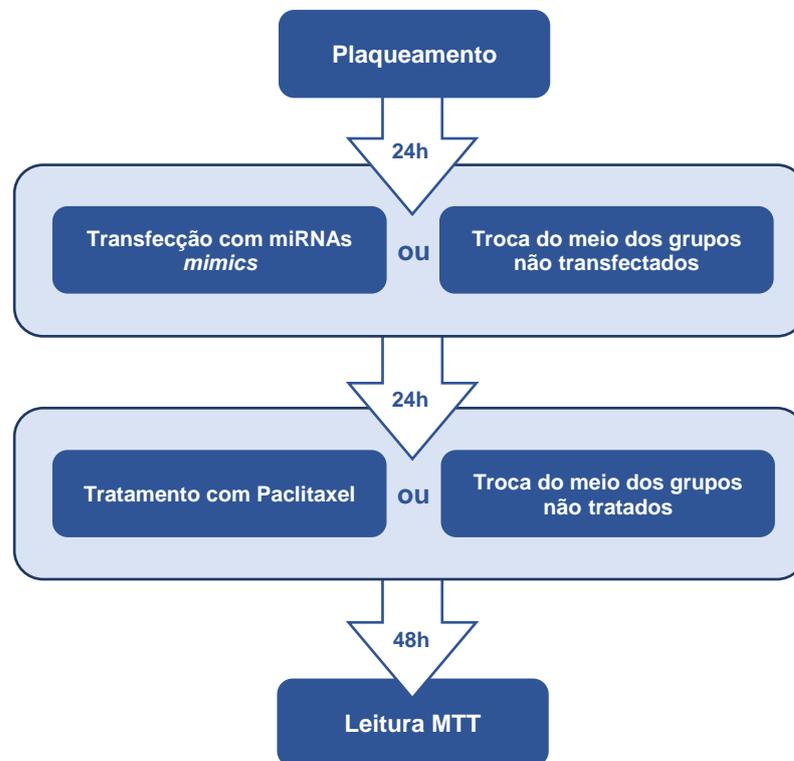


Figura 9. Diagrama esquemático do desenho experimental utilizado nos ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT.

### 3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A avaliação da expressão gênica seguiu as mesmas condições experimentais dos ensaios de MTT, permitindo-se elucidar o conteúdo de miR-7 e miR-34 de acordo com a respectiva viabilidade das células.

Foram semeadas  $12 \times 10^4$  células por poço, em placas de poliestireno de 06 poços, utilizando-se 2 poços para perfazer um “n” experimental. Decorridos os tempos de cada ensaio, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS, tripsinizadas e centrifugadas. Os pellets foram ressuspensos em tampão PBS, centrifugados e, após o descarte do sobrenadante, armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração dos miRNAs.

#### 3.5.1 Extração e Quantificação

Os miRNAs foram extraídos e purificados dos pellets de células de tumor mamário por meio do kit comercial *mirVana miRNA Isolation Kit* (Applied Biosystems), seguindo instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram mantidas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da utilização.

A quantificação dos miRNAs foi realizada pelo método fluorométrico utilizando o reagente Qubit microRNA Assay Kit (Invitrogen), em tubos translúcidos específicos para este fim (Qubit assay tubes, Invitrogen) e leitura no equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

#### 3.5.2 RT-qPCR

Para análise da expressão gênica utilizou-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR) precedida da síntese do cDNA por meio da transcrição reversa (RT), ambas realizadas no mesmo dia.

As amostras foram previamente diluídas em água *RNase-free* na concentração

de 2 ng/ $\mu$ L, para padronizar os ensaios e garantir a quantidade máxima de material requerida pelo kit de transcrição reversa (10 ng em 5  $\mu$ L).

A síntese de cDNA foi realizada mediante o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) juntamente com iniciadores específicos (*primers*) dos microRNAs alvos e RNAs curtos nucleares, conforme descrito na tabela 4. Inicialmente foi preparada uma única solução para todas as reações, com as seguintes quantidades por reação: 0,15  $\mu$ L de dNTP (100 mM); 1  $\mu$ L de enzima Multiscribe RT (50 U/ $\mu$ L); 1,5  $\mu$ L de 10x RT buffer; 0,19  $\mu$ L de RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ L) e 4,16  $\mu$ L de água RNase-free. Foram transferidos 7  $\mu$ L da solução descrita acima para microtubos de 0,2  $\mu$ L, onde foram adicionados 5  $\mu$ L de miRNA (2 ng/ $\mu$ L) e 3  $\mu$ L do RT Primer (5x) de interesse. Após 5 minutos no gelo, as reações foram levadas ao termociclador (MyCycler, Bio-Rad), sendo submetidas aos seguintes tempos e temperaturas: 30 minutos a 16°C; 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA foi armazenado a - 20°C para posterior uso no ensaio de qPCR.

Tabela 4 – Alvos utilizados nos ensaios de expressão gênica

Alvo amplificado	Sigla	Sequência
microRNA 7 humano	miR-7	5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU-3'
microRNA 34a humano	miR-34a	5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3'
U24 small nucleolar RNA	RNU24	5'-ATTTGCTATCTGAGAGATGGTGATGACATTTTA AACCACCAAGATCGCTGATGCA-3'
6B small nuclear RNA	RNU6B	5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTC CATATTTTT-3'

Para a realização da qPCR foram preparadas soluções independentes para cada gene alvo, contendo os seguintes reagentes e quantidades (por reação): 10  $\mu$ L TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 7  $\mu$ L de água *nuclease-free* e 1  $\mu$ L do *primer* (20x) de interesse, correspondente ao *primer* utilizado na RT. Foram transferidos 18  $\mu$ L desta solução para placa de 96 poços (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL, Applied Biosystems) e adicionados 2  $\mu$ L de cDNA, totalizando 20  $\mu$ L por reação. As placas foram seladas com filme adesivo (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems), centrifugadas (Mini Plate Spinner, Labnet) e levadas ao termociclador (QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR

System, Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação adotados foram: 2 minutos a 50°C; 20 segundos a 95°C e 40 ciclos de 03 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C.

Cada ensaio foi realizado com amostras em triplicata técnica, incluindo-se um RNA de referência (endógeno) para normalização dos resultados e um controle negativo NTC (*no-template control*) contendo os demais reagentes, porém com água *nuclease-free* em substituição ao cDNA (59). O gene de referência foi escolhido com base em ensaios prévios, onde o critério de escolha foi a expressão gênica mais estável entre os grupos controle e os grupos submetidos à transfecções e/ou tratamentos.

Os resultados foram avaliados com base na média dos valores dos ciclos de quantificação de cada amostra (Cq ou Ct) e a expressão gênica relativa calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (59, 60). Os dados foram inicialmente normalizados pela variação do Ct do miRNA alvo em relação ao Ct do RNA de referência, obtendo-se o  $\Delta Ct$ . O valor de  $\Delta Ct$  de cada grupo experimental foi posteriormente comparado com o  $\Delta Ct$  do grupo controle negativo não tratado (CN), obtendo-se o  $\Delta\Delta Ct$ . Este valor de  $\Delta\Delta Ct$  foi utilizado para cálculo da expressão relativa, mediante a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que contempla a expressão logarítmica por duplicação do cDNA a cada ciclo de amplificação, e o sinal negativo que ajusta a relação inversa entre o valor de Ct e o conteúdo de miRNA na amostra em teste.

### 3.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Para a avaliação das alterações morfológicas nas linhagens celulares, foram semeadas  $12 \times 10^4$  células por poço, em placas de poliestireno de 06 poços, as quais foram submetidas às condições experimentais descritas anteriormente (tabelas 2 e 3). As células foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico (Axiovert, Zeiss), operado em contraste de fase, e os dados analisados qualitativamente.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente avaliados quanto a sua distribuição utilizando o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. Dados distribuídos normalmente foram analisados pelos testes paramétricos *t* de *Student* não pareado ou por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelos testes não paramétricos de Mann Whitney. Dados paramétricos foram expressos como média e erro padrão e os não paramétricos utilizando-se mediana e intervalo interquartil. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 6.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPRESSÃO GÊNICA BASAL DE MIR-34A E MIR-7 EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Inicialmente procurou-se examinar o perfil de expressão dos miRNAs de interesse no presente estudo, miR-34a e miR-7, nas linhagens de tumor mamário selecionadas e se havia diferença na expressão entre o subtipo positivo para receptores hormonais (MCF-7) e o subtipo triplo-negativo (MDA-MB-231).

Observou-se que ambas as linhagens expressam constitutivamente os miRNAs de interesse em níveis detectáveis pela metodologia de qPCR e que há uma diferença significativa de expressão entre as linhagens, para os dois miRNAs avaliados.

Na expressão de miR-34a foi observada uma diminuição de 0,11 vezes na linhagem MDA-MB-231 em relação à linhagem MCF-7 (Figura 10A). Já miR-7 se mostrou 0,02 vezes menos expresso na linhagem MDA-MB-231, em comparação à expressão na linhagem MCF-7 (Figura 10B).

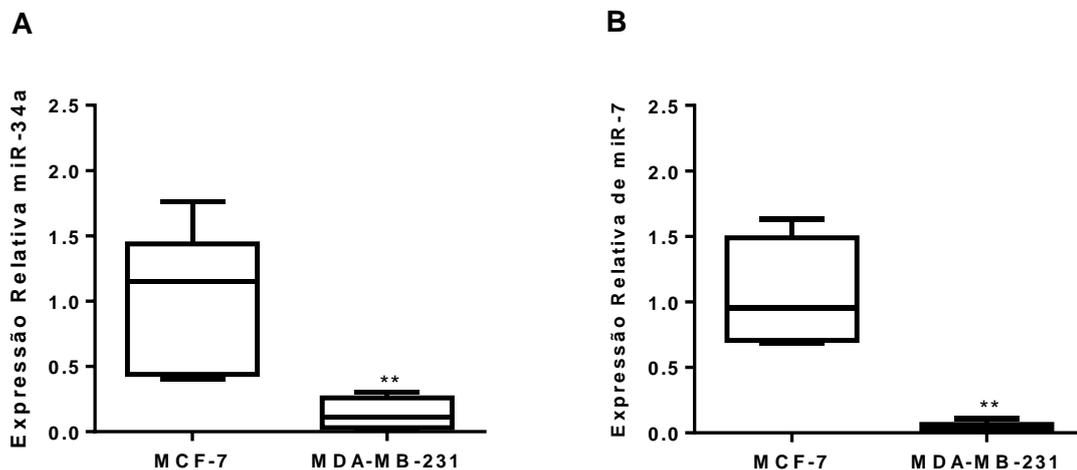


Figura 10. Expressão basal de miRNAs nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. (A) miR-34a se mostrou 0,11 vezes menos expresso na linhagem MDA-MB-231, em relação à linhagem MCF-7. (B) Na expressão de miR-7 foi observada diminuição de 0,02 vezes na linhagem MDA-MB-231, em relação à MCF-7. n=6. Ensaio de RT-qPCR normalizados pelo gene de referência RNU24. Expressão relativa calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e analisada pelo teste de Mann-Whitney (\*\*p<0,01).

## 4.2 CURVA DOSE-RESPOSTA DO QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL

Foram realizados ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT para avaliar o efeito do paclitaxel (PTX) sobre a viabilidade das células tumorais MCF-7 e MDA-MB231. As concentrações selecionadas para este ensaio, com base em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, foram de 25 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM.

Os resultados obtidos demonstraram que o quimioterápico paclitaxel promoveu redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle negativo (CN), em todas as concentrações testadas, em ambas as linhagens, mostrando-se assim uma preparação experimental viável para os testes de hipótese do presente estudo.

Observou-se também uma tendência na produção de efeitos superiores sobre a viabilidade celular com o aumento das concentrações do quimioterápico, em ambas as linhagens, porém não houve significância estatística entre as concentrações.

Na linhagem MCF-7 a menor concentração de paclitaxel (25 nM) promoveu a redução da viabilidade celular para 76,8%, seguida de 75,5% com 50 nM, 75,2% com 100 nM e 72,3% com 200 nM (Figura 11A).

Os resultados observados na linhagem MDA-MB-231 seguiram a mesma tendência da linhagem MCF-7, porém, com reduções na viabilidade ligeiramente mais discretas. Na concentração de 25 nM a viabilidade celular foi reduzida para 83,4%, seguida de 83,0% com 50 nM, 80,2% com 100 nM e 76,8% com 200 nM (Figura 11B).

Notou-se que a concentração intermediária entre 25 nM e 200 nM, ou seja, 100 nM, foi capaz de causar efeito significativo sobre ambas as linhagens em teste, sendo assim selecionada para os ensaios seguintes deste projeto.

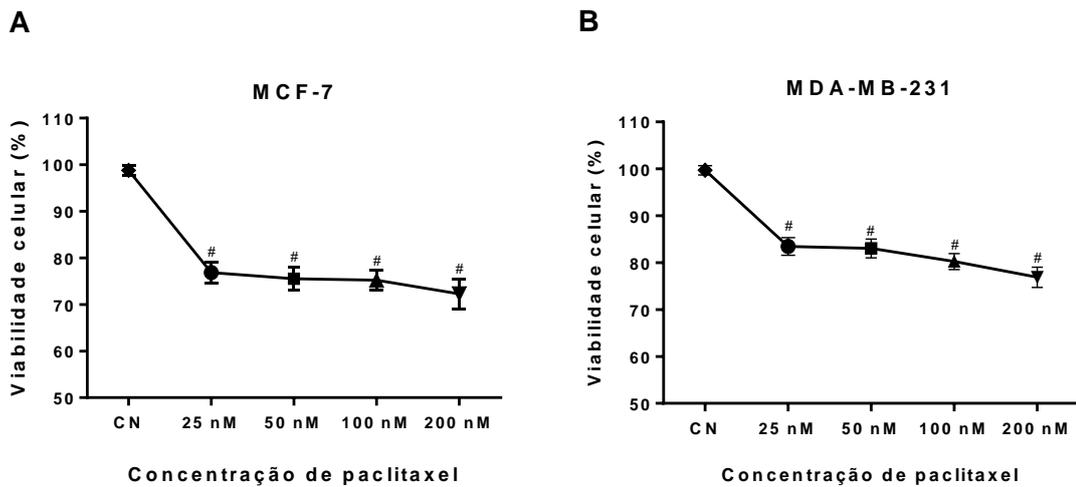


Figura 11. Efeito do paclitaxel sobre a viabilidade de células de tumor mamário, avaliada pelo método de MTT. (A) Linhagem MCF-7; (B) Linhagem MDA-MB-231. Houve redução significativa da viabilidade nas concentrações avaliadas em relação ao controle negativo (CN), porém não houve significância entre elas. Cinco ensaios independentes, com replicatas variando entre seis e oito. Dados convertidos em porcentagem de viabilidade, expressos como média  $\pm$  SEM e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao CN ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE MIR-34A E MIR-7 APÓS TRATAMENTO COM PACLITAXEL

No passo experimental em curso, procurou-se avaliar se o quimioterápico paclitaxel, na concentração de 100 nM, causaria mudança na expressão de miR-34a e miR-7 nas linhagens tumorais em estudo.

Células MCF-7 mostraram aumento de 3,0 vezes na expressão de miR-34a em resposta ao paclitaxel, comparativamente com a expressão nas células não tratadas (CN) (Figura 12A). Na linhagem MDA-MB-231 o tratamento com paclitaxel ocasionou aumento de 5,6 vezes na expressão de miR-34a, em relação às células que não receberam o tratamento (Figura 12B).

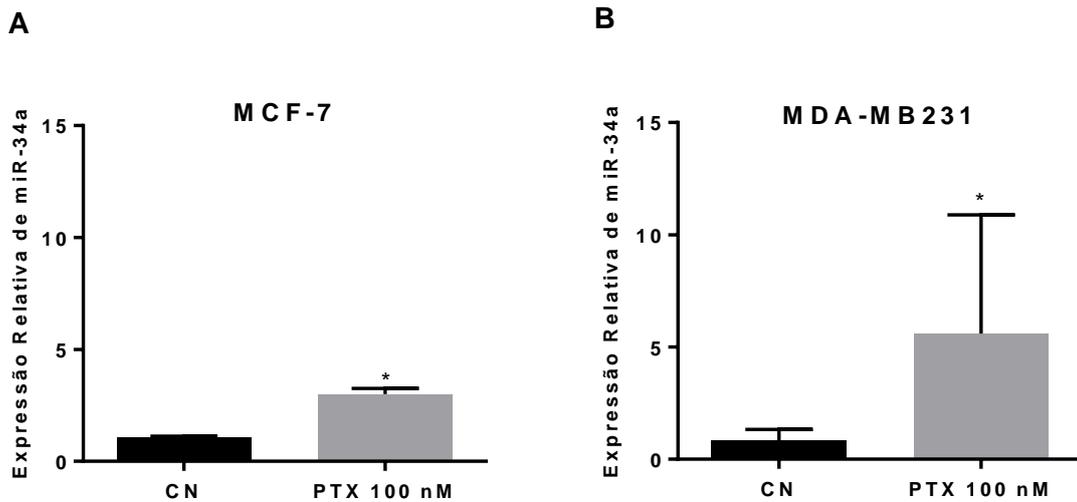


Figura 12. Expressão relativa de miR-34a após tratamento com paclitaxel 100 nM. (A) Células MCF-7 expostas ao PTX mostraram aumento de 3,0 vezes na expressão de miR-34a; (B) Na linhagem MDA-MB-231 observou-se aumento de 5,6 vezes na expressão deste miRNA após o tratamento. Ensaio de RT-qPCR normalizados pelo gene de referência RNU6B. Expressão relativa calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e analisada pelo teste de Mann-Whitney. N=5. (\* $p < 0,05$ ).

Na avaliação da expressão relativa de miR-7 observou-se que o tratamento de células da linhagem MCF-7 com paclitaxel diminuiu em 0,39 vezes a expressão deste microRNA, em relação às células que não receberam o tratamento (CN) (Figura 13A). Quanto à linhagem MDA-MB-231, o tratamento com paclitaxel causou aumento de 1,92 vezes na expressão relativa de miR-7, em comparação às células não tratadas (Figura 13B).

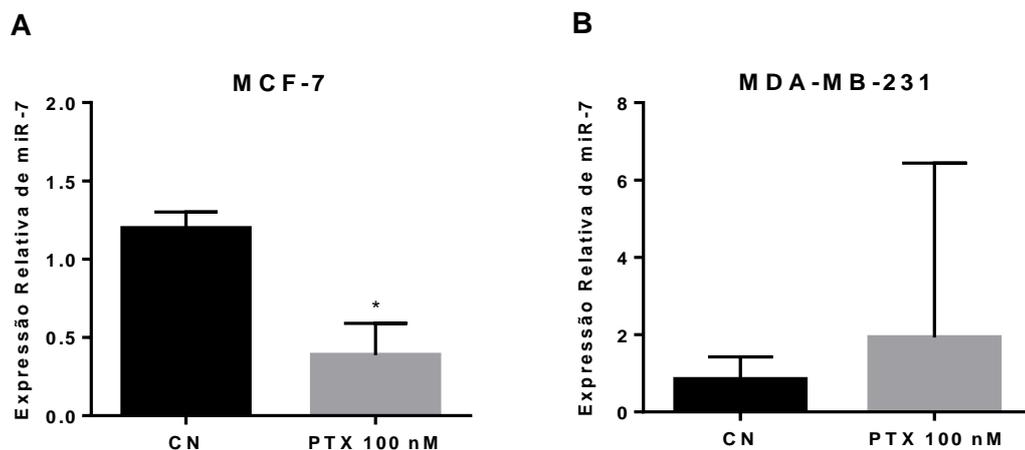


Figura 13. Expressão relativa de miR-7 após tratamento com paclitaxel 100 nM. (A) Na linhagem MCF-7 o tratamento com PTX diminuiu em 0,39 vezes a expressão de miR-7; (B) Na linhagem MDA-MB-231 houve aumento de 1,92 vezes na expressão após o tratamento. Ensaio de RT-qPCR normalizados pelo gene de referência RNU6B. Expressão relativa calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e analisada pelo teste de Mann-Whitney. N=6. (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.4 EFEITO DO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-34A, ISOLADO OU ASSOCIADO AO PACLITAXEL, SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Com base nos resultados anteriores, decidiu-se investigar se o aumento artificial do conteúdo de microRNAs seria capaz de afetar a viabilidade celular nas linhagens tumorais selecionadas e se a proposição de uma terapia combinada com imitadores sintéticos e o quimioterápico paclitaxel (PTX) promoveria melhores resultados do que a utilização isoladas de ambos. Após a realização de ensaios prévios de viabilidade celular (dados não apresentados), foi determinada a concentração de 30 nM do imitador sintéticos de miR-34a como a mais adequada para este estudo, em ambas as linhagens.

Na linhagem MCF-7 foi observado que a transfecção com 30 nM de miR-34a, isoladamente, promoveu a redução da viabilidade celular para 84,2%, resultado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle negativo (CN) e ao grupo transfectado com uma sequência aleatória - *mimic scramble* (92,5%), demonstrando que o efeito foi alvo-dependente. A associação entre miR-34a e paclitaxel reduziu a viabilidade para 77,6%, sendo este efeito maior e significativo quando comparado ao grupo apenas com miR-34a. Apesar de haver uma tendência de redução na viabilidade celular no grupo com a terapia combinada (miR-34a+PTX), em comparação com o grupo tratado apenas com paclitaxel, onde a viabilidade ficou em 81,0%, a diferença observada não foi significativa. A transfecção com miR-34a de forma isolada também não demonstrou maior efetividade quando comparada ao grupo tratado apenas com paclitaxel. A associação entre *mimic scramble* (SCRB) e paclitaxel (PTX) reduziu a viabilidade para 83,0%, não apresentando, entretanto, diferença significativa quando comparada aos resultados encontrados nos grupos SCRIB e PTX (Figura 14).

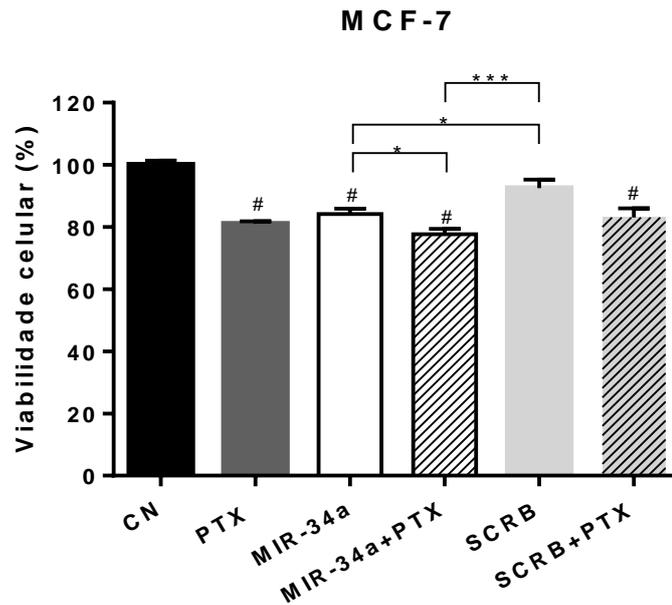


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MCF-7 após transfecção com miR-34a mimic (30 nM). O tratamento único com miR-34a reduziu a viabilidade celular em relação ao grupo CN. A associação deste miR-34a e PTX foi mais efetiva na redução da viabilidade que o uso isolado do microRNA. O mesmo não foi observado no grupo transfectado com scramble. Não houve diferença significativa entre o grupo PTX e os demais grupos. Cinco ensaios independentes, com replicatas variando entre quatro e seis. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Quanto à linhagem MDA-MB-231, o grupo transfectado apenas com 30nM de miR-34a *mimic* apresentou redução de viabilidade celular para 85,2%. A associação entre miR-34a e paclitaxel promoveu efeitos maiores e significativos, reduzindo a viabilidade celular para 74,7%. A terapia associada também produziu efeito superior ao paclitaxel isolado, que promoveu a redução da viabilidade para 83,5%. miR-34a *mimic* mostrou eficácia semelhante à do paclitaxel, ou seja, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Foi observada diferença significativa entre os grupos SCR B e SCR B+PTX, 93,5% e 81,2% de viabilidade, respectivamente, possivelmente em decorrência dos efeitos do paclitaxel, uma vez que não houve significância estatística entre os grupos tratados com a associação e somente com paclitaxel (Figura 15). Ressalte-se que para ambas as linhagens, MCF-7 e MDA-MB-231, a transfecção com *mimic* controle negativo (SCR B) não apresentou efeito significativo na redução da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle negativo (CN).

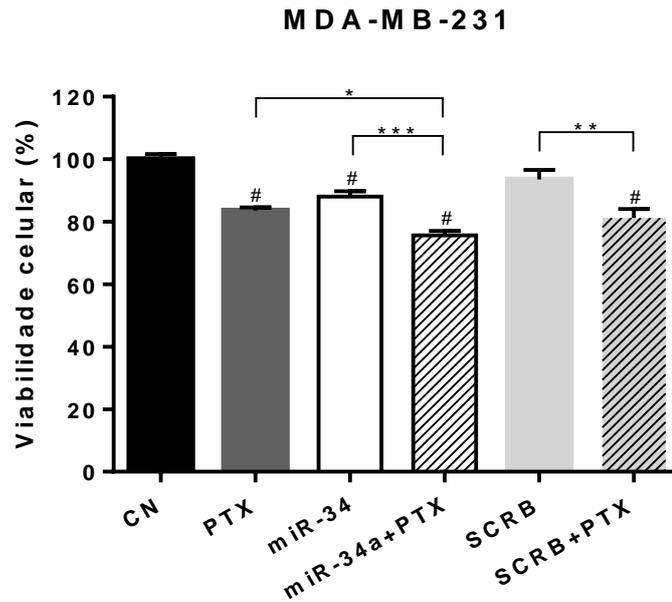


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após transfecção com miR-34a mimic (30 nM). A transfecção apenas com miR-34a foi efetiva na redução da viabilidade celular em relação ao grupo CN. A associação entre miR-34a+PTX foi mais efetiva na redução da viabilidade tanto em relação ao grupo apenas com miR-34a quanto apenas com PTX. Quatro ensaios independentes, com replicatas variando entre quatro e seis. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.5 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DA TRANSFECÇÃO COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MIR-34A E MIR-7

Com o objetivo de comparar os efeitos da transfecção com imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 sobre as linhagens tumorais em estudo, foram realizados ensaios de viabilidade celular (MTT). Os resultados observados revelaram diferença significativa na magnitude da resposta a cada imitador de microRNA, em ambas as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, quando avaliados simultaneamente, na mesma concentração (30 nM) e condições experimentais.

Na linhagem MCF-7 a transfecção com o miR-7 *mimic* causou uma diminuição expressiva da viabilidade celular para 37,9%, enquanto que miR-34a *mimic* reduziu a viabilidade para 74,0%. Ambos imitadores causaram redução significativa de viabilidade em relação ao grupo controle negativo (CN) (Figura 16A).

Na linhagem MDA-MB-231 também foi observada maior eficácia de miR-7 *mimic* na redução da viabilidade celular, ficando em 74,7%, quando comparado ao

grupo transfectado com miR-34a *mimic* (88,8%). No comparativo com o grupo CN, ambos imitadores sintéticos causaram efeito significativo na redução da viabilidade celular de forma significativa (Figura 16B).

Destaque-se que miR-7 *mimic* foi mais eficaz que miR-34a *mimic* em ambas as linhagens testadas, mostrando-se assim um alvo mais promissor para a continuidade deste projeto científico-tecnológico.

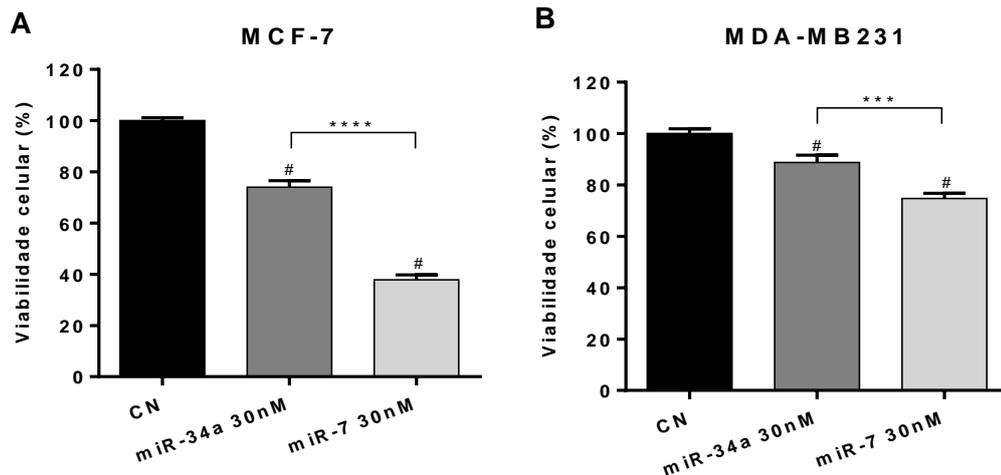


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular após transfecção com imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 (30 nM). (A) Linhagem MCF-7 (B) Linhagem MDA-MB-231. MiR-7 *mimic* foi mais eficaz na redução da viabilidade celular nas duas linhagens avaliadas, quando comparado ao miR-34a *mimic*. Realizados 3 ensaios independentes, com 4 replicatas cada. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (\*\*\*) $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*) $p < 0,0001$ .

#### 4.6 CURVA DOSE-RESPOSTA DO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-7

Os resultados acima apresentados demonstram a superioridade de miR-7 em relação a miR-34a como potencial alvo, em ambas as linhagens de tumor mamário. Na presente etapa experimental procurou-se refinar a tecnologia em desenvolvimento, estabelecendo a menor dose eficaz de miR-7 *mimic*, no intervalo entre 5 e 50 nM, com base em ensaios de viabilidade celular (MTT).

Na linhagem MCF-7 todas as concentrações avaliadas apresentaram diferença significativa na redução da viabilidade celular em relação ao controle negativo (CN), diferença observada também quando as concentrações foram comparadas entre si, o que mostra uma clara curva dose-resposta. A transfecção com miR-7 *mimic* na concentração de 5 nM promoveu a redução da viabilidade celular para 66,1%, seguido de 51,0% com 10 nM, 40,3% com 25 nM e 34,7% com 50 nM (Figura 17A).

Na linhagem MDA-MB-231, observou-se uma redução da viabilidade para 93,2% com 5 nM de miR-7 *mimic*, não apresentando diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). A partir de 10 nM (86,9%) todas as concentrações foram efetivas na redução da viabilidade celular em relação ao grupo CN. Não foi observada diferença significativa entre as maiores concentrações utilizadas para esta linhagem, 25 nM (74,3%) e 50 nM (72,8%) (Figura 17B).

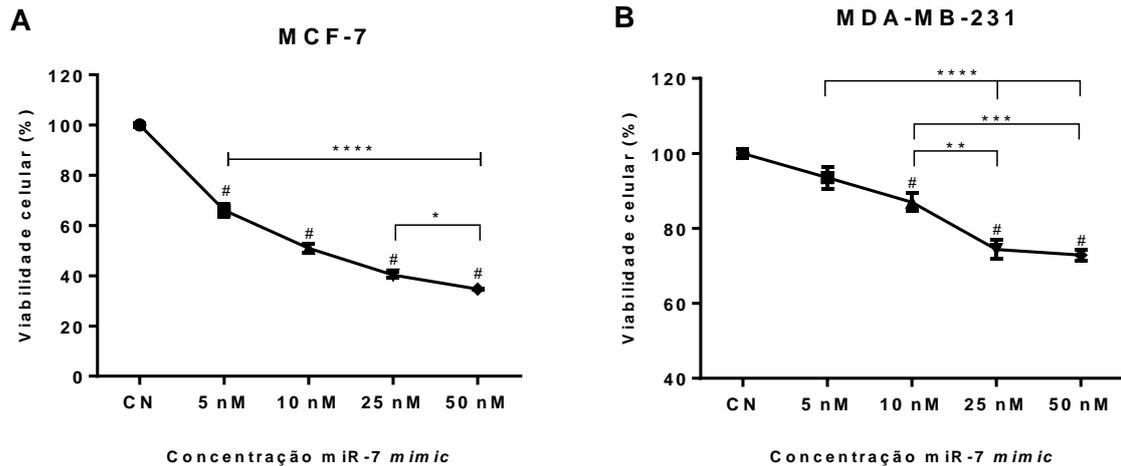


Figura 17. Avaliação da viabilidade celular após transfecção com miR-7 *mimic*. (A) Na linhagem MCF-7 todas as concentrações apresentaram diferença significativa em relação ao CN e quando comparadas entre si (B) Na linhagem MDA-MB-231 houve eficiência na redução de viabilidade a partir de 10 nM. Três ensaios independentes, com 4 replicatas cada. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Com base nos resultados acima, optou-se pelo prosseguimento dos ensaios com a concentração de 10 nM, que demonstrou ser a menor concentração de miR-7 *mimic* com eficiência significativa na redução da viabilidade celular, para ambas as linhagens testadas.

#### 4.7 EFEITO DO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-7, ISOLADO OU ASSOCIADO AO PACLITAXEL, SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Após escolha da concentração de 10 nM foram realizados ensaios de viabilidade celular (MTT) para avaliar o potencial terapêutico da associação entre o imitador sintético de miR-7 e o quimioterápico paclitaxel, nas linhagens em estudo.

Na linhagem MCF-7 a transfecção somente com o imitador sintético de miR-7 a 10 nM reduziu a viabilidade celular para 59,2%, resultado significativo se comparado ao grupo tratado somente com paclitaxel (PTX), que apresentou redução de viabilidade para 77,2%. Já a associação entre miR-7 *mimic* e paclitaxel (miR-7+PTX) reduziu a viabilidade para 44,6%, demonstrando que esta associação é mais efetiva na redução da viabilidade celular, tanto em relação ao grupo tratado apenas com o quimioterápico quanto em relação ao grupo transfectado apenas com miR-7 *mimic*. Apesar da diferença significativa entre o grupo transfectado com *mimic* controle negativo (SCRB) e o grupo com associação entre SCRB e PTX, 97,7% e 80,4% de viabilidade respectivamente, este último não diferiu de forma significativa do grupo tratado apenas com PTX, o que demonstra a especificidade do miR-7 em sensibilizar as células para os efeitos do paclitaxel sobre a viabilidade celular (Figura 18).

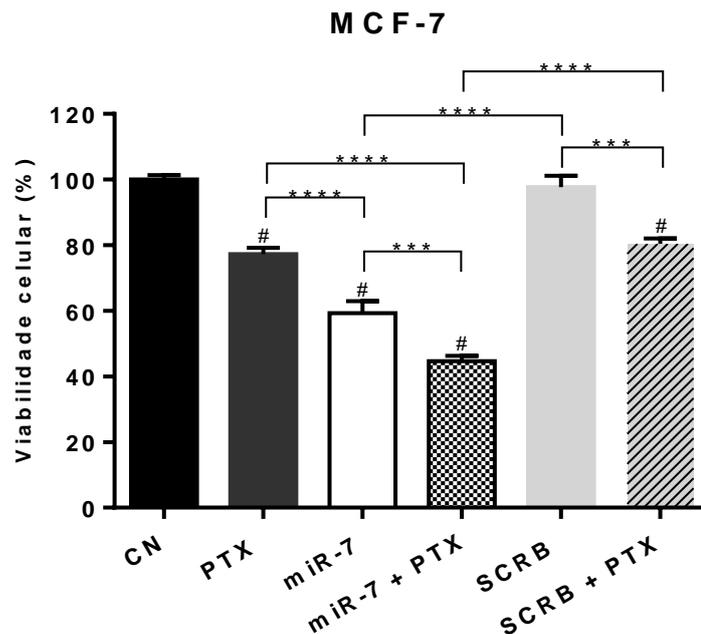


Figura 18. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MCF-7 após transfecção com miR-7 *mimic*. A transfecção com miR-7 foi efetiva na redução da viabilidade celular, em relação aos grupos CN e PTX, porém a associação entre miR-7+PTX foi mais efetiva do que ambos isoladamente. Três ensaios independentes, com 4 replicatas cada. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (\*\*\*) $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*) $p < 0,0001$ .

Na linhagem MDA-MB-231 a transfecção apenas com o imitador sintético de miR-7 a 10nM reduziu a viabilidade celular para 85,4%, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com paclitaxel (PTX), que promoveu a redução da viabilidade para 85,6%. Porém, a associação entre miR-7 *mimic* e

paclitaxel (miR-7+PTX) reduziu a viabilidade celular para 73,3%, sendo significativo tanto em relação ao grupo tratado apenas com o quimioterápico quanto em relação ao grupo somente com a transfecção de miR-7 *mimic*, demonstrando que a associação é mais efetiva na redução da viabilidade também na linhagem MDA-MB-231. Por outro lado, a associação entre *mimic scramble* e PTX não apresentou efeito significativo sobre a viabilidade quando comparada aos grupos SCRB e PTX tratados separadamente, o que demonstra que os efeitos observados são alvo-dependentes (Figura 19).

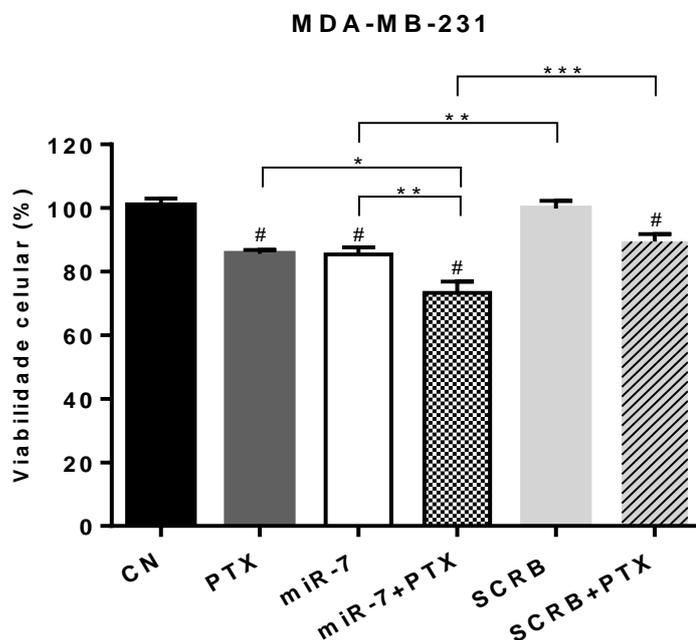


Figura 19. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231, após transfecção com miR-7 *mimic*. A transfecção com miR-7 reduziu de forma significativa a viabilidade em relação ao grupo CN. Porém, a associação entre miR-7+PTX mostrou-se mais efetiva na diminuição da viabilidade celular quando comparada aos grupos com PTX e miR-7 em uso isolado. Quatro ensaios independentes, com replicatas variando entre quatro e seis. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Com exceção do grupo transfectado apenas com *mimic scramble* (SCRB), os demais grupos avaliados apresentaram redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo (CN), nas duas linhagens estudadas.

#### 4.8 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS PELO IMITADOR SINTÉTICO DE MIR-7, ISOLADO OU ASSOCIADO AO PACLITAXEL.

Em decorrência dos resultados obtidos no ensaio anterior, foram realizadas análises para identificar possíveis alterações morfológicas nas células expostas ao miR-7 *mimic*, isoladamente ou em associação ao quimioterápico paclitaxel.

Na linhagem MCF-7, as células do grupo controle negativo (CN) apresentaram morfologia característica de células epiteliais, com formato poligonal e crescimento com formação de colônias. Tanto nas células transfectadas com o imitador sintético de miR-7 na concentração de 10 nM (miR-7 *mimic*), quanto nas células tratadas com 100 nM de paclitaxel (PTX), notou-se alterações na morfologia compatíveis com eventos de toxicidade celular, tais como arredondamento celular, rompimento da membrana de algumas células e maior granulosidade. Nas células tratadas com a associação entre miR-7 *mimic* e paclitaxel (miR-7 + PTX) estas alterações morfológicas foram acentuadas, com notável quantidade de fragmentos celulares dispersos no meio de cultura, demonstrando, novamente, que a associação promove efeitos superiores aos observados nos tratamentos isolados. Efeitos bem mais brandos foram observados no grupo transfectado com *mimic* controle negativo de forma isolada (SCRB), onde o padrão morfológico se manteve similar ao do controle negativo. Já na sua associação com paclitaxel (SCRB+PTX) foram observadas algumas alterações, como arredondamento celular, provavelmente decorrentes do quimioterápico (Figura 20).

Na linhagem MDA-MB-231, as células do grupo controle negativo (CN) apresentaram morfologia característica da linhagem, com formato fusiforme. A transfecção com imitador sintético de miR-7 (miR-7 *mimic*) promoveu arredondamento celular e rompimento da membrana, alterações morfológicas compatíveis com eventos de toxicidade celular. O paclitaxel promoveu alterações mais proeminentes na morfologia, com rompimento da membrana celular e perda quase completa da morfologia fusiforme, tanto de forma isolada (grupo PTX), quanto associado aos imitadores sintéticos (grupos miR-7 + PTX e SCRB + PTX). No grupo transfectado apenas com o *mimic* controle negativo (SCRB) as alterações morfológicas observadas foram sutis, mantendo-se o padrão morfológico similar ao do controle negativo (CN) (Figura 21).

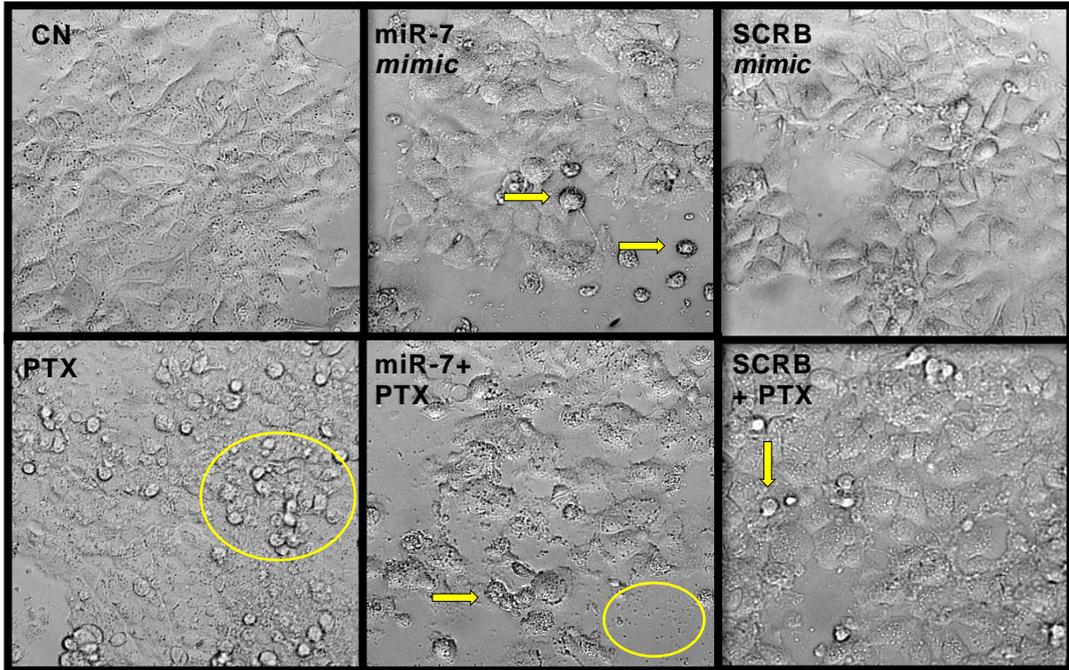


Figura 20. Alterações morfológicas em linhagem MCF-7 induzidas por imitadores sintéticos de miRNAs isolados (10 nM) ou associados ao paclitaxel (100 nM). Células do grupo controle negativo (CN) apresentam morfologia poligonal característica da linhagem. Tanto a transfecção com miR-7 mimic quanto o tratamento com paclitaxel promoveram, isoladamente, alterações morfológicas nas células MCF-7, porém, a associação entre eles promoveu efeitos superiores. Efeitos mais discretos foram observados nos grupos transfectados com mimic controle negativo (SCRb e SCRb+PTX). Micrografias feitas em Microscópio óptico em contraste de fase. Aumento de 20X.

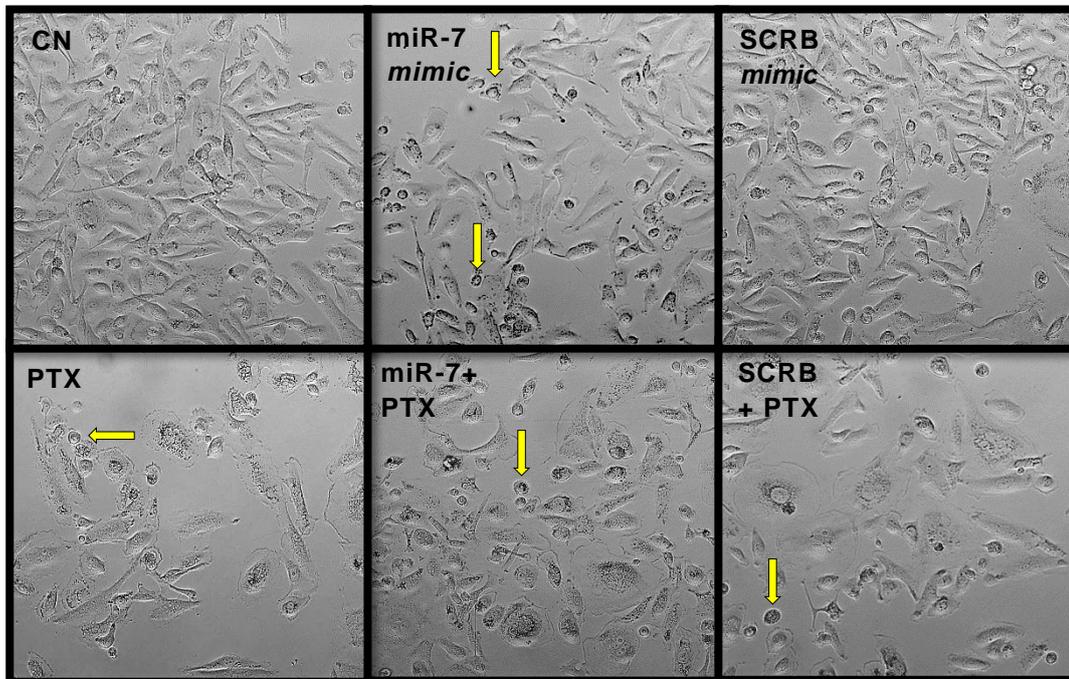


Figura 21. Alterações morfológicas em linhagem MDA-MB-231 induzidas por imitadores sintéticos de miRNAs isolados (10 nM) ou associados ao paclitaxel (100 nM). Células do grupo controle negativo (CN) apresentam morfologia fusiforme característica da linhagem. A transfecção com imitador sintético de miR-7 (miR-7 mimic) promoveu alterações morfológicas compatíveis com eventos de toxicidade celular. O tratamento com paclitaxel promoveu alterações proeminentes na morfologia em todos os grupos (grupos miR-7 + PTX e SCRb + PTX). Micrografias feitas em Microscópio óptico em contraste de fase. Aumento de 20X.

## 5 DISCUSSÃO

A terapia gênica baseada em RNA de interferência (RNAi) vem sendo alvo de estudos e desenvolvimento tecnológico como alternativa para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer (37, 48, 61, 62). O desenvolvimento de oligonucleotídeos mais específicos e estáveis somado aos avanços nanotecnológicos para diminuição da toxicidade e melhoria da eficiência na entrega deste material tem incentivado as indústrias farmacêuticas a investirem cada vez mais nesta área de pesquisa (39, 63, 64).

Por ser um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama (22, 32, 34, 56, 65), o paclitaxel aparece em diversos trabalhos como controle positivo de ensaios ou na terapia associada à novas tecnologias, como é o caso do presente estudo (66, 67). As concentrações utilizadas do fármaco são as mais variadas, definidas de acordo com o tipo de câncer, modelos experimentais (*in vitro* ou *in vivo*), objetivos do estudo e metodologias empregadas (33). No presente trabalho identificamos que a linhagem MCF-7 apresentou maior sensibilidade ao quimioterápico paclitaxel, quando comparada à linhagem MDA-MB-231, o que vai de encontro ao racional de que tumores triplo-negativos são mais resistentes à monoquimioterapia. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos comparativos utilizando as mesmas linhagens tumorais (57, 68). O paclitaxel, ao contrário de outros quimioterápicos, não interage diretamente com os componentes nucleares, tendo ação principal durante a fase mitótica, promovendo a polimerização das proteínas tubulinas e bloqueando o ciclo celular (35). Pouco se sabe sobre o mecanismo biológico de ação do paclitaxel sobre a expressão de miR-34a e miR-7. Porém, os microtúbulos apresentam várias funções importantes em células eucarióticas, como manutenção da forma celular, motilidade e tráfico intracelular de organelas e macromoléculas (32), o que pode promover uma desregulação direta ou indireta nas vias de expressão gênica, afetando assim o padrão de expressão destes microRNAs, com forma e intensidade variadas, de acordo com a heterogeneidade entre os subtipos tumorais.

Padrões aberrantes de expressão de microRNAs no câncer de mama, incluindo miR-340, let-7a, miR-21, miR-125b, miR-34a e miR-7, estão relacionados a uma maior predisposição ao desenvolvimento de alguns subtipos mais agressivos, pior

prognóstico da doença e diminuição da resposta ao tratamento (23, 46, 69-72). No presente trabalho, identificamos uma diferença clara na expressão dos microRNAs em estudo, miR-34a e miR-7, entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. A linhagem triplo-negativa, MDA-MB-231, com maior capacidade invasiva e de pior prognóstico, apresentou menor expressão de ambos microRNAs, sendo a diferença na expressão de miR-7 entre as linhagens ainda mais expressiva. Outros estudos também reportaram resultados semelhantes na diferença de expressão entre as mesmas linhagens tumorais, tanto em relação ao miR-7 (23, 57) quanto ao mir-34a (70), confirmando a importância de se entender o perfil gênico de cada subtipo tumoral para um diagnóstico mais preciso e estabelecimento da melhor estratégia terapêutica.

miRNA-34a é considerado um microRNA supressor de tumor pertencente à rede de supressão mediada por p53, estando sua expressão reduzida em células e tecidos tumorais de mama (47, 50, 71, 73), o que corrobora com o racional de que a suplementação deste microRNA seria uma estratégia interessante no combate ao câncer de mama. Um estudo clínico de fase 1 (MRX34) foi realizado utilizando imitador sintético de miR-34a encapsulado em nanopartícula lipossômica (diâmetro ~ 110 nm), administrado por via intravenosa, para o tratamento de pacientes com diversos tipos de tumores sólidos. Apesar de resultados prévios promissores em camundongos e primatas não-humanos e evidências preliminares de atividade antitumoral em humanos, o estudo foi interrompido após o final da fase 1 por reações adversas graves, potencialmente atribuídos à partícula lipossomal, segundo os responsáveis pela pesquisa (74). Resultados como este nos encorajam a seguir em busca de novos alvos e de avanços biotecnológicos para o fortalecimento da pesquisa translacional.

Quanto ao miR-7, trata-se de microRNA que desempenha importante papel como supressor tumoral, estando sua expressão basal diminuída em células cancerosas e em tecidos tumorais (23, 68, 69, 75, 76), fato que justifica sua escolha para o desenvolvimento do presente estudo e a estratégia proposta de reposição do seu conteúdo nas linhagens tumorais selecionadas. Devido à capacidade inerente aos microRNAs de regular a expressão de vários genes, diversos estudos tem por objetivo a busca de potenciais alvos regulados por miR-7 que possam estar associados ao processo tumorigênico. Um destes estudos demonstrou que o aumento artificial do conteúdo de miR-7 em células de câncer de mama foi capaz de regular negativamente a expressão da quinases de adesão focal (FAK), uma tirosina quinase citoplasmática amplamente expressa que apresenta importante papel na proliferação

e migração celular (69). Esta associação entre miR-7 e FAK pode justificar o fato da linhagem mais invasiva (MDA-MB-231) apresentar menor expressão de miR-7, e conseqüentemente maior expressão de FAK, o que favoreceria o processo de invasão e metástase. Outro estudo realizado com câncer de ovário em modelos animais demonstrou que o aumento do conteúdo de miR-7 regulou negativamente o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que está relacionado ao desenvolvimento e sobrevivência celular (67). A suplementação exógena de miR-7 também foi capaz de atenuar as habilidades de invasão e auto renovação de células-tronco cancerosas, suprimindo significativamente sua capacidade de desenvolvimento de metástases cerebrais (68). Outra abordagem em estudo é sobre o potencial de miR-7 como biomarcador preditivo em tumores de mama. A baixa expressão de miR-7 intratumoral avaliada antes da quimioterapia poderia auxiliar na indicação de pacientes que provavelmente se beneficiariam de opções alternativas de tratamento, demonstrando que este microRNA apresenta poder informativo não só em cultivo celular, como também em tecidos tumorais (56).

Poucos estudos publicados até o momento exploraram a associação entre imitadores sintéticos de miR-7 e o quimioterápico paclitaxel, entretanto, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, relacionados à redução da viabilidade celular e alterações morfológicas nas linhagens tumorais, consideramos esta associação promissora para o tratamento do câncer de mama e merecedora de atenção e investimento em estudos futuros. Alguns resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados em linhagens de carcinoma de pulmão de células não pequenas (*non-small cell lung cancer* – NSCLC) onde a regulação positiva de miR-7 aumentou a sensibilidade das células ao paclitaxel, suprimindo a proliferação celular e promovendo a apoptose (66). Outros resultados promissores foram obtidos também em estudo com nanopartículas contendo a associação entre miR-7 e paclitaxel no tratamento de câncer de ovário em modelos animais (67).

Cabe ressaltar que não há na literatura científica registros de estudos utilizando a associação entre miR-7 *mimic* e paclitaxel no câncer de mama, o que revela o ineditismo desta dissertação de Mestrado, mostrando que esta pesquisa representa potencial biotecnológico promissor. Estudos futuros para validação dos alvos terapêuticos regulados por miR-7 em modelos animais de tumor mamário poderão confirmar o potencial desta terapia e permitir o prosseguimento dos testes em ensaios clínicos de Fase 1.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que:

a) Há diferença significativa na expressão de miR-34a e miR-7 de acordo com o fenótipo tumoral, com redução de ambos microRNAs na linhagem triplo negativa MDA-MB-231, em relação à MCF-7;

b) O uso isolado de imitadores sintéticos de miR-34a e miR-7 promove redução da viabilidade celular e miR-7 promove alterações morfológicas, em ambas a linhagens tumorais;

c) Os imitadores de miR-34a e miR-7 sensibilizam as células para os efeitos do quimioterápico paclitaxel, nas duas linhagens estudadas, sendo que os efeitos de miR-7 são superiores e significativos.

d) O uso de oligonucleotídeos imitadores de miR-7, de maneira isolada ou em associação ao paclitaxel, é uma estratégia biotecnológica promissora para o tratamento do câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

1. American Cancer Society. Global Cancer Fact & Figures. 4th Edition. Atlanta: 2018.
2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. Atlanta: 2019.
3. Ferlay J. GLOBOCAN 2018. Lyon: World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 2018.
4. INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
5. Weinberg RA. A Biologia do Câncer. Porto Alegre: Artmed; 2008. 844 p.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
7. NHI. National Cancer Institute. What is Cancer? 2015 [07/05/2019]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?>
8. Chamas R. Biologia do Câncer: uma breve introdução. In: Hoff PMG, Katz A, Chammas R, Odone-Filho V, Novis YS, editors. Tratado de Oncologia. 1. São Paulo: Editora Atheneu; 2013. p. 3-7.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Câncer: The Next Generation. Cell. 2011;144:646-74.
10. Alves VAF, Mello ES, Longatto Filho A. Noções Básicas de Patologia e Imunoistoquímica. Tratado de Oncologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2013. p. 9-20.
11. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. Cell. 2011;147.
12. American Cancer Society. Types of Breast Cancer 2017 [13/05/2019]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>.
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. National Comprehensive Cancer Network, 2019 March 14. Report No.: 1.2019.
14. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. Journal of advanced pharmaceutical technology & research. 2010;1(2):109-26.
15. Wu D, Si M, Xue HY, Wong HL. Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. International journal of nanomedicine. 2017;12:5879-92.

16. Pires BRB. Avaliação do Papel de NF- $\kappa$ B na Regulação de Fatores de Transcrição Envolvidos com a Transição Epitélio-Mesenquimal em Modelos in vitro de Câncer de Mama [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar; 2014.
17. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(10):3737-803.
18. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends in cancer*. 2017;3(11):753-60.
19. Robbins, Cotran. *Bases Patológicas das doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
20. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*. 2014;465:1-14.
21. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews*. 2016;13:674-90.
22. Mustacchi G, De Laurentiis M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:4303-18.
23. Shi Y, Ye P, Xinghua L. Differential Expression Profiles of the Transcriptome in Breast Cancer Cell Lines Revealed by Next Generation Sequencing. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44:804-8016.
24. American Type Culture Collection [30/04/2019]. Available from: <https://www.atcc.org/>.
25. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Perspectives in Cancer Research*. 1997;57:3071-8.
26. Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1994;31(2-3):325-35.
27. American Cancer Society. *Treating Breast Cancer*. [10/05/2019]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>.
28. Hassan MS, Ansari J, Spooner D, Hussain SA. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology reports*. 2010;24(5):1121-31.
29. Aslam MS, Naveed S, Ahmed A, Abbas Z, Gull I, Athar MA. Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*. 2014;5:817-22.

30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Paclitaxel, CID=36314, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36314> (accessed on Mar. 27, 2019).
31. BULA PARA PROFISSIONAL DA SAÚDE - RDC 47/2009. paclitaxel. Accord Farmacêutica Ltda. Solução injetável, 6mg/mL. 2013.
32. Yang CPH, Horwitz SB. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18.
33. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2014;25.
34. Liang Z, Xi Y. MicroRNAs mediate therapeutic and preventive effects of natural agents in breast cancer. *Chinese journal of natural medicines*. 2016;14(12):881-7.
35. Alves RC, Fernandes RP, O. EJ, Salgado RNS, Chorilli M. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review. *CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*. 2018;48(02):110-8.
36. Brabletz T, Lyden D, Steeg PS, Werb Z. Roadblocks to translational advances on metastasis research. *Nature Medicine*. 2013;19.
37. Xin Y, Huang M, Guo WW, Huang Q, Zhang LZ, Jiang G. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2017;16(134).
38. Bader AG, D. B, Winkler M. The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Research*. 2010;70(18):7027-30.
39. Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharmaceutical Research*. 2017;34(7):1339-63.
40. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
41. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. *Current gene therapy*. 2018;18(3):143-53.
42. Titze de Almeida R. Avanços Biotecnológicos na Obtenção de Medicamentos. In: Spinosa HdS, Górnaiak SL, Bernardi MM, editors. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 6 ed: Guanabara Koogan LTDA.; 2017.
43. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(8):509-24.

44. Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer discovery*. 2016;6(3):235-46.
45. Magalhaes M, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Figueiras A, Santos AC, Veiga F. RNAi-based therapeutics for lung cancer: biomarkers, microRNAs, and nanocarriers. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(10):965-82.
46. Iorio MV, Casalini P, Piovana C, Bracciolla L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *The Breast*. 2011;20.
47. Saito Y, Nakaoka T, Saito H. microRNA-34a as a Therapeutic Agent against Human Cancer. *J Clin Med* 2015;4:1951-9.
48. Takahashi R, Prieto-Vila M, Kohama I, Ochiya T. Development of miRNA-based therapeutic approaches for cancer patients. *Cancer Science*. 2019;110:1140-7.
49. Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Research*. 2009;69(19):7569-76.
50. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014;5(4):872-81.
51. Maroni P, Puglisi R, Mattia G, Care A, Matteucci E, Bendinelli P, et al. In bone metastasis miR-34a-5p absence inversely correlates with Met expression, while Met oncogene is unaffected by miR-34a-5p in non-metastatic and metastatic breast carcinomas. *Carcinogenesis*. 2017;38(5):492-503.
52. Du R, Sun W, Xia L, Zhao A, Yu Y, Zhao L, et al. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e30771.
53. Moazzeni H, Najafi A, Khani M. Identification of direct target genes of miR-7, miR-9, miR-96, and miR-182 in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Molecular and cellular probes*. 2017;34:45-52.
54. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
55. Zhao J, Tao Y, Zhou Y, Qin N, Chen C, Tian D, et al. MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer cell international*. 2015;15:103.
56. Raychaudhuri M, Bronger H, Buchner T, Kiechle M, Weichert W, Avril S. MicroRNAs miR-7 and miR-340 predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017;162:511-21.

57. Cui Y, Bradbury R, Flamini V, Wu B, Jordan N, Jiang W. MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells. *BRITISH JOURNAL OF CANCER*. 2017;117:89-101.
58. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
59. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611-22.
60. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
61. Magalhães M, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Figueiras A, Santos AC, Veiga F. RNAi-based therapeutics for lung cancer: biomarkers, microRNAs and nanocarriers. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2018;15(10):965-82.
62. Singh A, Trivedi P, Jain NK. Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE, AND BIOTECHNOLOGY*. 2018;46(2):274-83.
63. Bobbin ML, Rossi JJ. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2016;56:103-22.
64. Chen X, Mangala LS, Rodriguez-Aguayo C, Kong X, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA Interference-Based Therapy and Its Delivery Systems. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):107-24.
65. Yu K, Sang QA, Lung PY, Tan W, Lively T, Sheffield C, et al. Personalized chemotherapy selection for breast cancer using gene expression profiles. *Scientific reports*. 2017;7:43294.
66. LIU R, LIU X, ZHENG Y, GU J, XIONG S, JIANG P, et al. MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Oncology Letters*. 2014;8.
67. Cui X, Sun Y, Shen M, Song K, Yin X, Di W, et al. Enhanced Chemotherapeutic Efficacy of Paclitaxel Nanoparticles Co-delivered with MicroRNA-7 by Inhibiting Paclitaxel-Induced EGFR/ERK pathway Activation for Ovarian Cancer Therapy. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(9):7821-31.

68. Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.* 2013;73(4):1434-44.
69. Kong X, Li G, Yuan Y, He Y, Wu X, Zhang W, et al. MicroRNA-7 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis of Breast Cancer Cells via Targeting FAK Expression. *PLoS ONE.* 2012;7(8).
70. Adams BD, Wali VB, Cheng CJ, Inukai S, Booth CJ, Agarwal S, et al. miR-34a Silences c-SRC to Attenuate Tumor Growth in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(4):927-39.
71. Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, Baghbani E, Baradaran B. Micro RNA 34a and Let-7a Expression in Human Breast Cancers is Associated with Apoptotic Expression Genes. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2016;14(4):1881-90.
72. Zhang C, Liu K, Li T, Fang J, Ding Y, Sun L, et al. miR-21: A gene of dual regulation in breast cancer. *International journal of oncology.* 2016;48(1):161-72.
73. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Differential Regulation of microRNAs by p53 Revealed by Massively Parallel Sequencing. *Cellular Cycle.* 2007;6(13):1586-93.
74. Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, KangJay Y, Stoudemire J, et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs.* 2017;35(2):180-8.
75. Horsham JL, Kalinowski FC, Epis MR, Ganda C, Brown RA, Leedman PJ. Clinical Potential of microRNA-7 in Cancer. *Journal of clinical medicine.* 2015;4(9):1668-87.
76. Detassis S, Grasso M, Del Vescovo V, Denti MA. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2017;5:86.

## APÊNDICE A – QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE MIR-7 APÓS A TRANSFEÇÃO COM IMITADOR SINTÉTICO

Para avaliar a modulação da expressão de miR-7, nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, foi realizado ensaio de RT-qPCR, comparando a expressão entre o grupo controle negativo (CN), representando a expressão basal deste microRNA, e o grupo transfectado com o imitador sintético de miR-7 a 10 nM (api-miR-7 mirVana miRNA *mimic*, Ambion). O tempo decorrido entre a transfecção e o processamento das amostras (congelamento do pellet) foi de 72 horas, com substituição do conteúdo dos poços por meio de cultura fresco 24 horas após a transfecção.

Na análise dos valores brutos dos ciclos de quantificação (Cq) verificou-se que na linhagem MCF-7 a diferença entre o grupo controle (CN) e o grupo transfectado com o imitador de miR-7 (miR-7 *mimic*) foi de 7,2 ciclos. Na linhagem MDA-MB-231 a diferença observada entre os valores de Cq obtidos no grupo controle e no grupo transfectado foi de 11 ciclos (Figura 22).

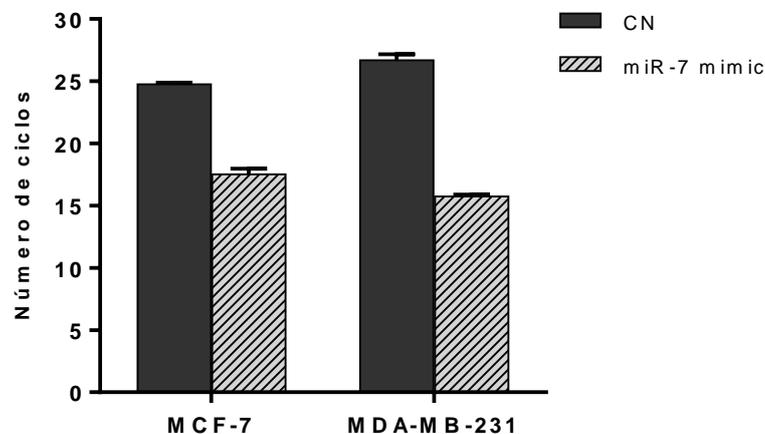


Figura 22. Comparação entre valores dos ciclos de quantificação em cada linhagem, avaliados por qPCR. A linhagem MCF-7 apresentou diferença de 7,2 ciclos entre os grupos controle e transfectado com imitador de miR-7. Na linhagem MDA-MB-231 a diferença entre os grupos foi de 11 ciclos. n=3. Dados expressos em mediana.

Na avaliação da expressão relativa de miR-7, calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , verificou-se que na linhagem MCF-7 houve um aumento de 329,4 vezes na expressão deste microRNA no grupo transfectado com 10 nM de miR-7 *mimic*, em relação ao grupo controle negativo (CN) (Figura 23A). Já na linhagem MDA-MB-231 esse aumento foi de 1.187,1 vezes (Figura 23B).

Os dados obtidos demonstram que a transfecção com imitadores sintéticos de miR-7 foi efetiva e incorporada ao sistema biológico da célula, causando um aumento no conteúdo de miR-7, detectável pela técnica de RT-qPCR.

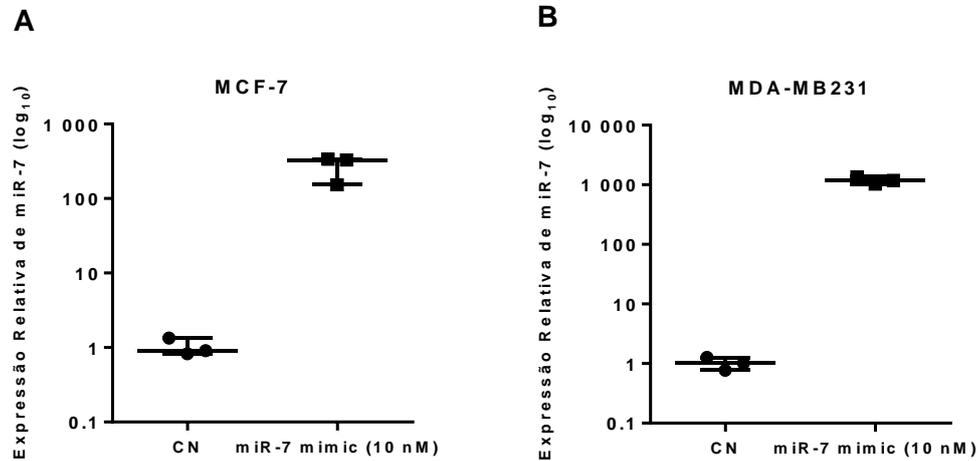


Figura 23. Expressão relativa de miR-7 após transfecção com imitador sintético, avaliada por RT-qPCR. Comparação entre a expressão relativa basal (CN) e 72 horas após a transfecção com miR-7 *mimic* a 10 nM. A) Na linhagem MCF-7 foi observado aumento de 329,4 vezes na expressão de miR-7 após a transfecção; B) Na linhagem MDA-MB-231 o aumento da expressão foi de 1.187,1 vezes no grupo transfectado. n=3. Dados expressos em mediana. Ensaios normalizados pelo controle endógeno RNU6B.