

SOUZA, F. C. Avaliação funcional de microRNAs na transição epitélio - mesenquimal e eventos metastáticos no câncer de mama triplo negativo. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O câncer de mama triplo negativo (TNBC), em especial o subtipo *Mesenchymal Stem-like* (MSL), é considerado um dos mais agressivo dentre os subtipos categorizados molecularmente, uma vez que apresenta limitações ao tratamento, altas taxas de recorrência e baixo grau de sobrevida dos pacientes. O potencial de migração destas células e invasão a outros sítios pode variar, contudo, conforme a expressão diferencial de marcadores mesenquimais e epiteliais, sendo ambos associados ao processo de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) com perda de adesão celular. Vistos como alternativa promissora às terapias atualmente disponíveis, os microRNAs (miRNAs/miRs) agem pós-transcricionalmente sobre a expressão de RNAs mensageiros alvos, muitos dos quais fundamentais à EMT, sendo importantes reguladores da progressão e metástases tumorais. Em vista do exposto, análises *in silico* foram usadas para identificação de miRNAs *down* regulados entre subtipos mais agressivos cujos genes preditos na assinatura de EMT estivessem hiper expressos em dados de amostras obtidas junto ao TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). A identificação de miRNAs com potencial de regulação sobre estágios de migração e invasão celular em diferentes linhagens e amostras PDX proporcionou a realização de ensaios funcionais, como *wound healing* e *boyden chamber assays*, além de formação de esferoides e invasão à matriz, com miméticos e inibidores destes miRs, e consequentes avaliações de modulação fenotípica e morfométrica, por intermédio de imunofluorescência (IF) e *High Content Analysis* (HCA). Adicionalmente, genes diferencialmente expressos foram quantificados por qPCR, assim como níveis de microRNAs para diferentes subtipos celulares. Como consequência das transfecções com mimético ou inibidores dos miRNAs, enquanto com mimético do miR-30b houve aumento de EMT, foram observadas reduções significativas de atividade migratória e progressão tumoral de MDA-MB-231 quando acrescidas de miméticos dos miR-1, miR-30a, miR-34a e miR-200c, além dos inibidores dos miR-199a e miR-214. Resultados morfométricos oriundos de IF quantitativa automatizada revelaram que células mais dissociadas e transfectadas com miméticos ou inibidores dos miRNAs estudados, apesar de reportarem aumento da intensidade de marcadores

mesenquimais (Vimentin) e redução na expressão de marcadores epiteliais (E-Cadherin), apresentaram menor potencial migratório ao reprimirem, entre outros alvos, a expressão de ZEB1. De outro modo, a regulação mediada pelo miR-34a induziu células TNBC MSL à modulação do perfil fenotípico mesenquimal e morfologia estelar, a se rearranjarem em agrupamentos celulares com conformação acinar e polaridade baso-apical semelhante a células de mama normais. Como um todo, o presente estudo pode vir a contribuir com alternativas terapêuticas para o TNBC uma vez que a entrega direcionada de moléculas miméticas ou inibidores de microRNAs às células tumorais poderiam, eventualmente, inibir as metástases.

**Palavras-chaves:** Câncer de Mama Triplo Negativo; microRNAs; Transição Epitélio – Mesenquimal; *High Content Analysis*

