



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAQUEL BESTER LISZBINSKI

**ESTUDO DE NOVAS ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE
MAMA TRIPLO-NEGATIVO: NANOTECNOLOGIA, METABOLISMO E
MICROAMBIENTE TUMORAL**

Campinas, SP
2024

RAQUEL BESTER LISZBINSKI

**ESTUDO DE NOVAS ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE
MAMA TRIPLO-NEGATIVO: NANOTECNOLOGIA, METABOLISMO E
MICROAMBIENTE TUMORAL**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Co-orientador: Dr. Douglas Adamoski Meira

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA RAQUEL BESTER LISZBINSKI E
ORIENTADA PELA DRA. SANDRA MARTHA
GOMES DIAS.

Campinas, SP

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L699e Liszbinski, Raquel Bester, 1992-
Estudo de novas alternativas para tratamento do câncer de mama triplo-negativo : nanotecnologia, metabolismo e microambiente tumoral / Raquel Bester Liszbinski. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Sandra Martha Gomes Dias.
Coorientador(es): Douglas Adamoski Meira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Mamas - Câncer . 2. Nanopartículas. 3. Edição de genes. 4. Glutaminase. 5. Microambiente tumoral. I. Dias, Sandra Martha Gomes, 1975-. II. Adamóski, Douglas, 1990-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Study of new alternatives for triple-negative breast cancer treatment : nanotechnology, metabolism, and tumor microenvironment

Palavras-chave em inglês:

Breast - Cancer

Nanoparticles

Gene editing

Glutaminase

Tumor microenvironment

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Sandra Martha Gomes Dias [Orientador]

Luciana Maria Fontanari Krause

Simone Ramos de Castro

Juliana Helena Costa Smetana

Marcio Chaim Bajgelman

Data de defesa: 31-10-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7094-8775>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/2643254848309259>

Campinas, 31 de outubro de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Profa. Dra. Luciana Maria Fontanari Krause

Prof. Dra. Simone Ramos de Castro

Prof. Dr. Juliana Helena Costa Smetana

Prof. Dr. Marcio Chaim Bajgelman

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade do Instituto de Biologia.

Dedico esse trabalho aos meus amados pais Mauro e Marli, minha irmã Rita e as minhas avós Methilde e Amalia. Também em memória de meus avôs Luis e Zica que encerraram sua passagem terrena antes da conclusão deste trabalho. Agradeço por estarem ao meu lado, apoiando minha jornada e acima de tudo, pelo exemplo de vida e dedicação que são para mim.

*“O período de maior ganho em conhecimento e experiência
é o período mais difícil da vida de alguém.”*

- Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a toda corrente espiritual que me acompanha pela oportunidade de trilhar os caminhos que me trouxeram até aqui, pela força e coragem de seguir em frente apesar das adversidades da vida.

A meus pais Mauro e Marli, agricultores do interior gaúcho, que nunca mediram esforços para me proporcionar este sonho. Por abrirem mão de seus próprios objetivos para incentivar os meus, por nunca deixarem desistir do caminho da ciência. Amo muito vocês! Viva o agronegócio brasileiro!

À minha irmã Rita, tantos desafios nesse período... e também tantos aprendizados.

Você é luz e amor. Obrigada por ter me escolhido como tua irmã. Te amo!

Ao meu avô Luis Bester (*in memoriam*). Segui o valioso conselho que me deste aos 5 ou 6 anos de idade. Obrigada por tuas sábias palavras de incentivo aos estudos e também a minha avó, Methilde Bester, exemplo de força e dedicação.

Ao meu avô Zica Liszbinski (*in memoriam*), homem trabalhador que amava sua enxada e pescaria. A cada despedida na ponte aérea Ijuí-RS – Campinas, SP era uma emoção e o sentimento de que poderia ser a última vez e foi. Obrigada por sempre demonstrar orgulho da neta “dotôra” e a minha avó Amalia Liszbinski por todo o carinho e orações. Aos meus filhos de quatro patas, Rebecca e Salem. Bequinha chegou num momento de tristeza profunda, afastou a solidão, encheu a cama de pelos, o meu coração de amor e me fez criar um amor “gatológico”. Cuidamos e cuidaremos uma da outra até o fim.

Salem, você foi a realização do sonho dessa “bruxinha” de ter um gato preto, sua sapequice chegou para completar meu coração.

À minha orientadora Sandra Dias, agradeço a oportunidade que me deste. Por tua paciência e compreensão nos momentos difíceis, por ser inspiração de trabalho, comprometimento, força e competência. Você é uma mulher forte e cientista admirável.

Obrigada!

Ao meu co-orientador Douglas Adamoski, por todo o suporte no desenvolvimento da tese, discussões científicas e conversas até altas horas da noite pelas bancadas do CNPEM. Você é um cientista brilhante. Obrigada!

Ao prof. Marcelo Bispo de Jesus por permitir o uso das nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas em seu laboratório, por todo apoio científico e psicológico frente as adversidades pessoais que enfrentei durante o primeiro ano do desenvolvimento da tese e pandemia. Obrigada!

À Bianca, miga sem você definitivamente não conseguiria chegar até aqui. Obrigada por todo o apoio emocional, psicológico e espiritual. Amo você!

À Yessica, minha amiga colombiana. Você me ensinou a ser forte. Obrigada por cada momento compartilhado. Amo você!

À família Hyslop, Stephen, Genita, Kevin e Kelly, por todo o suporte e amizade, apoio nos momentos mais difíceis, por serem minha “família emprestada”. Obrigada por todo apoio espiritual, sabedoria e paciência.

Ao Diego e dona Ana Barros, por todo o carinho e amizade.

À Alessandra Girassole, meu girassol, obrigada por todo o carinho, toda a ajuda, por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins, especialmente na reta final tão conturbada e que junto com a Renata Tavares, me incentivaram a não desanimar, sempre prontas a ouvir e cuidar de mim. Obrigada gatas garotas.

Ao grupo biologia do câncer, liderado pela Dra. Sandra, por todo o suporte científico e intelectual, em especial: Bianca Silva, Alessandra Girassole, Renata Tavares, Cyro Negrão, Amauri Justo, Guilherme Tamarindo, Douglas Adamoski, Ellen Lima, Marília Dias, Gabriela Vieira, Kaliandra Gonçalves, Larissa Damasceno, Saul Lima, Raquel Arminda, Renna Costa, Ana Mafra. Obrigada minhas bergamotinhas, pela boa convivência, experimentos e boas risadas.

À Dra. Ana Carolina Pascoalini Mafra, que gerou os dados prévios que deram origem ao terceiro capítulo desse trabalho.

À direção do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), agradeço pela infraestrutura e organização impecáveis que permitiu a execução desse projeto.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano, CNPEM) pela *facility* e apoio técnico na execução da proposta TEM-28107F.

Um agradecimento especial aos funcionários do LNBio: a recepcionista Ana Cláudia, ao Wanderley e todo grupo OPR pela manutenção dos equipamentos e dos laboratórios, Lucimar pela limpeza e autoclavagem dos materiais, Larissa Damaceno pelo zelo com a sala de cultivo celular, Valber Florencio, Sami Yokoo pelo auxílio e treinamento nos equipamentos, a equipe de limpeza, de segurança, técnicos, especialistas e pesquisadores, que de uma forma ou outra contribuíram para o andamento desse trabalho.

A prof. Dra. Letícia Ignácio de Souza Zimmermann, líder do laboratório de distúrbios do metabolismo (LABDIME) alocado na Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp campus de Limeira, por gentilmente fornecer o anticorpo anti-PSMD2.

Ao meu querido amigo e colega Célio Junior da Costa Fernandes, por fazer a ponte com a equipe do LABDIME, pelas boas risadas e conhecimentos compartilhados.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, sem vocês, realmente eu
não teria chegado até aqui.

A todos os agricultores e agropecuaristas, por produzirem o alimento em nossas mesas.

A todos os amigos que de uma forma ou outra, contribuíram de alguma forma nessa
etapa.

Às minhas terapeutas Juliana Mattoso e Amanda Althmann. Sem vocês eu teria pirado
(mais).

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
na concessão da bolsa de estudos nº 141870/2019-2, usufruída no período de vigência
de 01/05/2019 a 31/08/2019.

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) pelo financiamento do projeto 2019/06023-9, usufruída no período de
vigência de 01/09/2019 a 30/06/2023.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À banca examinadora deste trabalho, prof. Juliana Smetana, Prof. Luciana Krause, Prof.
Simone Castro, Prof. Marcio Chaim, agradeço pelas críticas, discussões e contribuições
excelentes para este trabalho.

RESUMO

O câncer de mama ocupa a segunda posição em incidência e mortalidade entre a população feminina e segundo órgãos nacionais e internacionais esse número tem aumentado nos últimos anos. Embora o câncer de mama triplo negativo, comparado a outros subtipos, seja o menos incidente, ele é o mais agressivo, com menor taxa de sobrevida e, importante, com abordagens terapêuticas ainda bastante limitadas. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é crucial para a melhoria do prognóstico destes pacientes oncológicos. O presente estudo é dividido em duas partes: Na primeira, avaliamos a entrega de material genético para *knockout* de *transforming growth-interacting fator 1* (TGIF1) pelo sistema de edição CRISPR/Cas9, utilizando nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), buscando entender a viabilidade de tal sistema para edição gênica. Na segunda parte, buscamos entender o impacto da enzima glutaminase 2 (GLS2) na modulação do microambiente tumoral (*tumor microenvironment*, TME). A modulação do TME pode induzir mecanismos de evasão imune e apresentação de antígenos deficiente, impactando diretamente no tipo de resposta imunológica e na evolução da doença. Em especial, nos perguntamos se o aumento dos níveis de GLS2 estaria relacionado com a modulação na exposição de moléculas de MHC I na superfície de células tumorais. SLN foram complexadas com sistema de edição gênica CRISPR/Cas9 contendo sgRNA para direcionamento e *knockout* de TGIF1. Os resultados apontam que células MCF-7 tratadas com SLN com o vetor, além de não mostrarem uma alta taxa de eficiência na transfecção dos plasmídeos, mostraram uma resposta proliferativa mais acentuada, destacando a inviabilidade do sistema para o fim pretendido. Com relação a segunda parte desta tese, mostramos que a modulação da expressão de GLS2 em células murinas de câncer de mama EO771 demonstraram uma correlação proporcional aos níveis de exposição de MHC I, construindo um elo entre o metabolismo energético com a regulação da imunidade tumoral. Esses achados abrem portas para compreender e investigar possíveis alvos terapêuticos para o combate ao câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama, nanopartículas, edição gênica, glutaminase, microambiente tumoral

ABSTRACT

Breast cancer ranks second in incidence and mortality among the female population, and according to national and international organizations, this number has been increasing in recent years. Although triple-negative breast cancer (TNBC) is the least prevalent subtype compared to others, it is the most aggressive, with lower survival rates and, importantly, highly limited therapeutic approaches. Thus, the development of new therapeutic strategies is crucial to improving the prognosis of these cancer patients. The present study is divided into two parts: In the first part, we evaluated the delivery of genetic material for the knockout of transforming growth-interacting factor 1 (TGIF1) using the CRISPR/Cas9 gene-editing system, encapsulated in solid lipid nanoparticles (SLNs), to assess the feasibility of this system for gene editing. In the second part, we investigated the impact of the enzyme glutaminase 2 (GLS2) on the modulation of the tumor microenvironment (TME). TME modulation can induce immune evasion mechanisms and deficient antigen presentation, directly affecting the type of immune response and disease progression. Specifically, we questioned whether increased levels of GLS2 might be associated with modulation in the exposure of MHC I molecules on the surface of tumor cells. SLNs were complexed with the CRISPR/Cas9 gene-editing system containing a single-guide RNA (sgRNA) for targeting and knocking out TGIF1. The results showed that MCF-7 cells treated with SLNs carrying the vector not only exhibited low transfection efficiency for plasmids but also displayed a more pronounced proliferative response, highlighting the system's inadequacy for the intended purpose. Regarding the second part of this thesis, we demonstrated that modulation of GLS2 expression in murine EO771 breast cancer cells correlated proportionally with the exposure levels of MHC I molecules, establishing a link between energy metabolism and the regulation of tumor immunity. These findings pave the way for understanding and investigating potential therapeutic targets to combat breast cancer.

Keywords: Breast cancer, nanoparticles, gene editing, glutaminase, tumor microenvironment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Os tumores são classificados de acordo com o perfil de infiltrados imunes.	23
Figura 2: A transição epitélio mesenquimal remodela o citoesqueleto celular.	28
Figura 3. Composição química estrutural de SLN e interação com ácidos nucleicos.	30
Figura 4. Mecanismos de captação e internalização de nanopartículas.	32
Figura 5. O tráfego intracelular de vesículas captadas pela via endocítica.	33
Figura 6. TGIF1 sequestra Axin e impede a montagem do complexo de destruição de β -catenina.	36
Figura 7. Esquematização da biologia de adaptação, biogênese e interferência de CRISPR/Cas9.	39
Figura 8. Caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas.	55
Figura 9. Imagens representativas da distribuição das medidas das SLN, pDNA e SLNplexos.	56
Figura 10. Retardo da migração de DNA para avaliação do carregamento de pDNA por SLN.	57
Figura 11. Ensaio de proteção de SLNplex da degradação enzimática por DNaseI.	58
Figura 12. Eficácia de entrega de pDNA por SLN em células de câncer de próstata PC-3.	60
Figura 13. Eficácia de entrega de pDNA por SLN em células de câncer de mama MCF-7.	61
Figura 14. Contagem de núcleos marcados com DAPI+ para avaliação de citotoxicidade.	62
Figura 15. Avaliação da migração em células tratadas com SLN por <i>scratch assay</i> .	63
Figura 16. Níveis de expressão de TGIF1 em células HEK293T editadas por CRISPR/Cas9.	65
Figura 17. Análise dos níveis de expressão de TGIF1 em linhagens celulares TNBC.	66
Figura 18. Formação de esferoides derivados da linhagem de câncer de mama MCF-7.	67

Figura 19. Ilustração das isoformas das enzimas glutaminases KGA, GAC, GAB e LGA.	71
Figura 20. O TME e a regulação metabólica orquestram o crescimento ou o combate ao tumor.....	75
Figura 21. Representação esquemática do processo de ubiquitinação de proteínas.	76
Figura 22. Representação molecular e estrutural do proteassomo 26S de mamíferos.	78
Figura 23. O destino dos peptídeos degradados pelo proteassomo é a apresentação de antígenos.	79
Figura 24. Os mecanismos de evasão tumoral frente ao sistema imunológico.....	81
Figura 25. Análise interações de proteínas obtidos por co-imunoprecipitação de GLS2	84
Figura 26. Mapa dos plasmídeos contendo sequências de shRNA para <i>knockdown</i> de GAB murina	88
Figura 27. Fluxograma de isolamento de proteassomo 26S por centrifugação diferencial.	92
Figura 28. Titulação das partículas virais dos vetores de silenciamento de GAB. ...	98
Figura 29. Análise dos níveis de expressão de GAB após silenciamento gênico. .	100
Figura 30. Tentativa de isolamento de proteassomos utilizando centrifugação diferencial.	102
Figura 31. Imunoprecipitação de GAB utilizando a tag V5 conjugada com pérolas de agarose A/G.....	103
Figura 32. Proliferação de células EO771 GAB ^{high} e GAB ^{low} ao longo do tempo. ..	104
Figura 33. Proliferação celular na privação de cistina sobre as células MCS, GAB.wt e GAB.S219A.....	106
Figura 34. Investigação da expressão de MHC I na superfície de células EO771 GAB ^{high} e GAB ^{low}	108
Figura 35. Análise do consumo de oxigênio e acidificação do meio de EO771 GAB ^{high} e GAB ^{low}	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Subtipos moleculares das neoplasias de mama: biomarcadores, prognóstico e tratamentos	25
Tabela 2. Sequências dos sgRNAs sintetizados para construção plasmidial	44
Tabela 3. Concentrações molares para o ensaio de carregamento e proteção.....	48
Tabela 4. Concentrações molares utilizadas para o ensaio de transfecção	50
Tabela 5. Análise <i>in silico</i> de proteínas que interagiram com GAB	83
Tabela 6. Nomenclatura para identificação das linhagens GAB ^{high} e GAB ^{low}	86
Tabela 7. Sequências dos shRNAs sintetizados para construção plasmidial	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR: *3' Untranslated Region*
AAV: Adenovírus
AKT: Serina treonina quinase
APC: *Adenomatous Polyposis Coli gene*
ATCC: *American Type Culture Collection*
ATP: Adenosina trifosfato
Axin: *Axis inhibitor protein 1*
BRCA1: Proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1
CAF: *Cancer-associated fibroblasts*
CALR: *Calreticulin*
Cas9: *CRISPR-associated protein 9*
CCL: *Chemokine (C-C motif) ligand*
CDH1: Caderina 1
CDKN2A: Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CDS2: *Coding Sequence 2*
CK: *Citokine*
CK-1: *Casein kinase 1*
CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
crRNA: *CRISPR RNA*
CTL: *Cytotoxic T cell*
CTLA4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) ligand*
DAMP: *Damage-associated molecular patterns*
DC: Células dendríticas
DOTAP: *1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*
E1: *Ubiquitin-activating enzyme E1*
E2: *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*
E3: *Ubiquitin-ligase enzyme E3*
ECAR: *Extracellular acidification rate*
ECM: *Extracellular matrix*
EGFR: Receptor de fator de crescimento epidérmico
EMT: *Epithelial-to-mesenchymal transition*
ER: Receptor de estrógeno
ERAP1: *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*
ESR1: Receptor de estrogênio 1
Fago: Bacteriófago
FDA: Food and Drug Administration
FGFR: Receptor de crescimento de fibroblastos
FLAG: *Tag FLAG - aminoácidos DYKDDDDK.*
fow: foward
GAB: isoforma de glutaminase B
GAB^{high}: Células que superexpressam GAB
GAB^{low}: Células com silenciamento de GAB
GAC: Isoforma glutaminase C
GATA-3: *GATA binding protein 3*
GLOBOCAN: *Global Cancer Observatory*
GLS: Glutaminase

GLS2: Glutaminase 2
gRNA: *Guide RNA*
GSH: Glutathione
GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase-3 Beta*
HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*
HNF-3 α : fator nuclear de hepatócito 3-alfa
IL: Interleucina
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IRES: *Internal Ribosome Entry Site*
ISO: *International Organization for Standardization*
KGA: Isoforma *kidney type glutaminase*
Ki-67: Proteína nuclear *Kiel 67*
KRAS: Gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato *Kirsten*
LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*
LGA: Isoforma *liver type glutaminase*
MAP2K4: Proteína quinase 4 ativada por mitógeno de dupla especificidade
MAP3K1: Proteína quinase ativada por mitógeno 1
MCS: *Multiple Cloning Site*
MDSC: *Myeloid-derived suppressor cells*
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
mGAB: GAB murina
MHC I: Major histocompatibility complex class I
miR: microRNA
MOI: *Multiplicity of Infection*
mRNA: RNA mensageiro
MYB: Protooncogene de mieloblastose
MYC: Myelocytomatosis oncogene
NK: Células *natural killers*
NP: Nanopartícula
OCR: *Oxygen consumption rate*
PAM: *Protospacer adjacent motif*
PARP: Poli (ADP-ribose) polimerase
PCR: Reação em cadeia de polimerase
PD-1: *Programmed Cell Death 1*
PDI: *Polydispersity index*
PDIA3: *Protein disulfide-isomerase A3*
pDNA: DNA plasmidial
Potencial ζ : Potencial zeta
PR: Receptor de progesterona
PSMA: *Proteasome subunit alpha*
PSMB: *Proteasome subunit beta*
PSMC: *Proteasome 26S Subunit, ATPase*
PSMD: *Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase*
PSMD2: *Proteasome 26S Subunit Ubiquitin Receptor, Non-ATPase 2*
PSME1: *Proteasome Activator Subunit 1*
RB1: Proteína do retinoblastoma 1
RE: Retículo endoplasmático
rev: *reverse*
ROS: *Reactive oxygen species*
SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

sgRNA: *Single guide RNA*
shRNA: *Short hairpin RNA*
SLN: *Solid lipid nanoparticles*
SLNplex: Complexo formado pela ligação de SLN com pDNA
Smad: Família de proteínas transdutoras de sinal para TGF- β
SP110: *Nuclear body protein SP110*
STAT1: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
Tumor stem cell: Células tronco tumorais
TAEC: *Tumor-associated endothelial cells*
TALE: *Three-amino-acid-loop-extension*
TAM: *Tumor-associated macrophages*
TAP: *Transporter associated with antigen processing*
TCA: *Tricarboxylic acid cycle*
TGF- β : *Transforming growth factor-beta*
TGIF1: *Transforming growth factor beta-induced*
TME: *Tumor microenvironment*
TNBC: *Triple-negative breast cancer*
TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*
TP53: Proteína P53
tracrRNA: *Trans-activating CRISPR RNA*
TRC: *The RNAi Consortium*
Treg: Células T regulatórias
Twist1: *Twist Family BHLH Transcription Factor 1*
Ub: Ubiquitina
V5: *Tag V5 – aminoácidos GKPIPNNLLGLDST*
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular
XBP1: Proteína de ligação X-box 1
ZEB1: *Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1*
 α -KG: *Alpha-ketoglutarate*
 β 2m: *Beta-2-microglobulin*
 β TrCP: *Beta-Transducin repeat-containing protein*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	21
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Panorama geral sobre o câncer: da biologia básica às implicações clínicas	21
1.2 Aspectos celulares e moleculares do câncer de mama	23
CAPÍTULO II.....	27
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Bases biológicas para a agressividade do câncer de mama triplo-negativo.....	27
1.2 As bases da nanomedicina para aplicações no contexto oncológico	28
1.3 Avanços no uso de terapias gênicas no combate ao câncer	34
1.4 A transição epitélio mesenquimal como um alvo terapêutico	35
1.5 Biologia da edição gênica dirigida por CRISPR/Cas9	38
2. OBJETIVO.....	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Cultura de células em monocamada.....	41
3.2 Preparo das nanopartículas e complexação com DNA plasmidial	42
3.3 Medidas de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão.....	42
3.4 Microscopia eletrônica de transmissão	43
3.5 Desenho do <i>single guide</i> RNA (sgRNA)	44
3.6 Clonagem de vetor plasmidial com co-expressão de Cas-9 e sgRNA.....	45
3.6.1 Transformação bacteriana	46
3.6.2 PCR de colônias	46
3.6.3 Sequenciamento.....	47
3.7 Ensaio de carregamento de partículas.....	48
3.8 Ensaio de proteção de DNA plasmidial.....	49
3.9 Transfecções em monocamada.....	49
3.10 <i>Western blot</i>	50
3.11 <i>Scratch assay</i>	51
3.12 Preparo de placas e cultivo celular de modelos esferoides.....	52
3.13 Descarte de amostras contendo SLN e possíveis impactos ambientais	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1 Caracterização físico-química e potencial de carregamento de SLN	54

4.2 As nanopartículas são capazes ligar o DNA e proteger da degradação enzimática	56
4.3 Propriedades funcionais de SLN para entrega de ácidos nucleicos para cultura de células.....	59
5. CONCLUSÕES	68
CAPÍTULO III.....	69
1. INTRODUÇÃO	69
1.1 O papel das Glutaminases no microambiente tumoral	69
1.2 A diversidade celular do microambiente tumoral.....	72
1.3 O Sistema ubiquitina-proteassomo e a apresentação de antígenos tumorais	75
1.4 Resultados prévios	81
1.5 Análises <i>in silico</i> da espectrometria de massas para identificação de possíveis mecanismos envolvidos no crescimento de tumores GAB ^{high}	82
2. OBJETIVOS	85
2.1 Objetivo geral	85
2.2 Objetivos específicos	85
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
3.1 Cultura de células	86
3.2 Construção do <i>short hairpin</i> RNA (shRNA) para silenciamento de GAB	87
3.2.1 Estratégia de clonagem de shRNA para silenciamento de GAB	87
3.2.2 Triagem de colônias positivas.....	89
3.2.3 Sequenciamento.....	90
3.3 Geração de células com <i>knockdown</i> de GAB por shRNA	90
3.3.1 Produção lentiviral	90
3.3.2 Titulação viral	91
3.3.3 Transdução viral para silenciamento de GLS2.....	91
3.4 Isolamento de proteasomos por centrifugação diferencial em EO771	92
3.5 Análise da taxa de proliferação celular em resposta a modulação da expressão de GAB em células EO771	93
3.6 Ensaio de privação de cistina para avaliação do impacto de GAB sobre o crescimento de células EO771.....	93
3.7 Avaliação de GAB ^{high} e GAB ^{low} na expressão de MHC I por citometria de fluxo .	94
3.8 Análise de interações proteicas de GAB por co-imunoprecipitação	95
3.9 Preparo de amostras de cultivo para análise de proteínas.....	96

3.10	<i>Western blot</i>	96
3.11	Avaliação da função mitocondrial e metabolismo celular por <i>Seahorse</i>	97
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
4.1	Construção das linhagens EO771 contendo <i>knockdown</i> de GAB	98
4.2	Isolamento de proteassomos a partir de células EO771	100
4.3	Imunoprecipitação de GAB	102
4.4	A modulação da expressão de GAB impacta na proliferação celular	103
4.5	A privação de cistina influencia na viabilidade de células com baixa expressão de GAB	105
4.6	A modulação de GAB impacta a expressão de MHC I em células de câncer de mama murino	106
4.7	Consumo de oxigênio e acidificação extracelular por células GAB ^{high}	109
5.	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	111
	ANEXOS.....	150

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como uma doença multifatorial, marcado pelo crescimento descontrolado e desordenado de células que adquirem a capacidade de invadir tecidos próximos. Essas células também apresentam habilidade para modificar sua estrutura e migrar para tecidos distantes ao seu local de origem, formando as metástases. O estabelecimento de um microambiente propício para sua sustentação é essencial para a progressão. Esse comportamento anormal ocorre devido a alterações genéticas e epigenéticas que afetam os mecanismos que regulam o ciclo celular, a apoptose, a reparação do DNA e a comunicação celular, além de alterações na bioenergéticas e o alto consumo de nutrientes (HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

1.1 Panorama geral sobre o câncer: da biologia básica às implicações clínicas

A divisão celular é um processo natural do desenvolvimento fisiológico, entretanto, alterações moleculares nesse processo resultam na imortalização, desordem celular e tecidual, culminando no surgimento das neoplasias. Só em 2020, aproximadamente 19,3 milhões de pessoas tiveram algum tipo de câncer e quase 10 milhões morreram (SIEGEL *et al.*, 2023; SUNG *et al.*, 2021). A pesquisa de novos tratamentos oncológicos foi intensificada nas últimas décadas devido ao aumento da incidência e mortalidade atrelada a esta patologia (PUCCI; MARTINELLI; CIOFANI, 2019). Segundo levantamentos da GLOBOCAN, para 2023 foram estimados 20 milhões de casos e 9,7 milhões de mortes (SIEGEL *et al.*, 2023). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) espera 704 mil casos por ano no triênio 2023-25, isso representa um aumento de aproximadamente 5,4% em relação ao período anterior (SANTOS *et al.*, 2023).

O câncer é uma doença multifatorial e que envolve inúmeros processos biológicos para o seu desenvolvimento e progressão. Em sua essência, as características do câncer envolvem vias de sinalização que sustentam a proliferação, evasão de sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular programada, apresenta capacidade replicativa ilimitada, promove a indução de angiogênese e envolve a ativação de mecanismos de invasão tecidual e promoção de metástases. Além disso, a reprogramação do metabolismo celular energético contribui para

sustentar o crescimento celular exacerbado, bem como mecanismos de evasão do sistema imune são induzidos para favorecer o escape do reconhecimento tumoral pela vigilância imunológica. Dois facilitadores para o desenvolvimento da doença são o acúmulo de mutações, que aumenta a probabilidade de alterações genéticas e culminando na formação de diferentes subtipos tumorais e a inflamação crônica no microambiente tumoral (TME) que promove o desenvolvimento e a progressão tumoral, todas essas são características citadas foram denominadas de *hallmarks* do câncer (HANAHAHAN, 2022; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Considerando os recentes avanços no papel do sistema imune do TME, observou-se que o prognóstico de alguns tipos de câncer era melhor e foi constatado há uma diferença no perfil de infiltração imune que impacta na sobrevida dos pacientes. Tumores tipo “*hot*” são definidos por apresentam um TME altamente infiltrado por células imunes efetoras como linfócitos T citotóxicos (CD8+) e auxiliares (CD4+), células dendríticas (DC), células *natural killers* (NK) e macrófagos do tipo M1, resultando em uma resposta pró-inflamatória e consequente indutora de apoptose das células tumorais. Por outro lado, os tumores tipo “*cold*” possuem baixa infiltração de células imunológicas ou podem atrair células supressoras tumorais como células T regulatórias (Treg), células supressoras derivadas de mieloides (MDSC), e macrófagos do tipo M2, a fim de criar um ambiente anti-inflamatório e suprimir a resposta efetora, permitindo o crescimento, invasão e migração tumoral (SHEEHAN; SCHALPER, 2021; TIAN; QUEK, 2024; ZOU *et al.*, 2023), como ilustra a figura 1.

O conhecimento da biologia tumoral é de grande importância para estabelecer o prognóstico e os melhores cuidados aos pacientes. Os tratamentos oncológicos dependem de vários fatores, incluindo o tipo tumoral e estágio em que se encontra, bem como as características moleculares e a condição de saúde do paciente (MAO *et al.*, 2022). Esses tratamentos envolvem a ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e mais recentemente a combinação de tratamentos convencionais com imunoterapia têm sido a grande protagonista do tratamento (KWOK *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2021). Além disso, terapias gênicas começaram a ser testadas em ensaios clínicos e são a nova aposta da indústria farmacêutica para a produção de terapias personalizadas à base de RNA mensageiro (mRNA) (WEBER *et al.*, 2024).

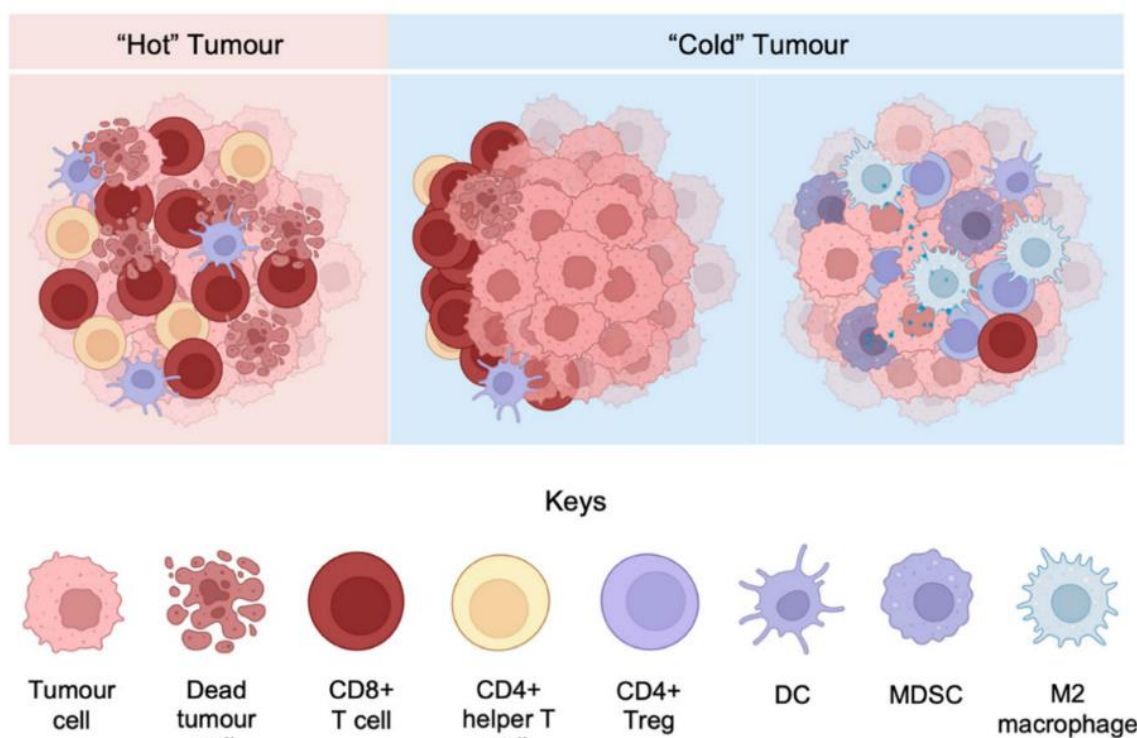


Figura 1: Os tumores são classificados de acordo com o perfil de infiltrados imunes.

Tumores do tipo “hot” são mais imunologicamente infiltrados, enquanto os tumores do tipo “cold” têm baixa infiltração imune ou recrutam células supressoras de tumor. Reproduzido de (TIAN; QUEK, 2024).

1.2 Aspectos celulares e moleculares do câncer de mama

Observando os tipos tumorais mais prevalentes, destacam-se as neoplasias mamárias que apresentam a maior incidência na população feminina mundial. O parecer de agências globais é de que sejam diagnosticados cerca de 2,3 milhões de casos (SIEGEL *et al.*, 2023), já na população brasileira são esperados 73 mil casos por ano (SANTOS *et al.*, 2023), traduzindo para números mais palpáveis, é provável que uma a cada oito mulheres desenvolva algum subtipo dessa neoplasia, o que caracteriza um grande problema de saúde pública (SANTOS *et al.*, 2023; SIEGEL *et al.*, 2023).

As neoplasias mamárias são heterogêneas e apresentam diferenças moleculares e morfológicas que implicam no tratamento clínico, como a superexpressão de receptores hormonais de estrógeno (ER) e progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), marcador de proliferação celular Ki-67 e mutações em genes supressores tumorais como a proteína de susceptibilidade tumoral ao câncer de mama (BRCA1) e proteína tumoral p53. Histologicamente, o câncer de mama é dividido em quatro subtipos principais: luminal

A, luminal B, HER2+ e triplo negativo (do inglês, *triple negative breast cancer* -TNBC) (JOHNSON, Karen S.; CONANT; SOO, 2021; SØRLIE *et al.*, 2001).

O subtipo luminal A tem melhor prognóstico pois geralmente sensível à terapia hormonal, visto que expressa ER e PR além da baixa expressão de Ki-67 (ABUBAKAR *et al.*, 2019), por outro lado, o luminal B mostra prognóstico pior que o Luminal A, mas responde a terapia hormonal, esse subtipo pode ou não expressar HER2, o que contribui para o uso de imunoterapia (ABUBAKAR *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016). Tumores do subtipo HER2+ têm um comportamento mais agressivo pois a superexpressão desse receptor aumenta a ativação de vias intracelulares relacionadas ao crescimento tumoral, todavia é tratável com imunoterapia (CAPUOZZO *et al.*, 2024; XU *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2020). O quarto subtipo tumoral é considerando o mais agressivo e com terapias bastante limitadas pois não apresenta expressão de ER, PR ou HER2, por essa razão é chamado de TNBC. Esse subtipo reúne um conjunto de características biológicas que incluem alta taxa proliferativa, instabilidades genômicas, alta taxa metastática devido à sua histologia apresentar células com características mesenquimais, ou seja, menos diferenciada, além disso, é um subtipo heterogêneo graças as suas características moleculares, dificultando a escolha do tratamento, isso tudo aliado com o fato de adquirir resistência à quimioterapia, conferem o pior prognóstico dentre os subtipos mamários (CAPUOZZO *et al.*, 2024; XU *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2020). As diferenças moleculares de cada subtipo são explanadas com mais detalhes na Tabela 1.

Tabela 1. Subtipos moleculares das neoplasias de mama: biomarcadores, prognóstico e tratamentos

Subtipo molecular		Biomarcadores		Frequência (%)	Grau	Prognóstico	Terapias
Luminal A		ER+ HER2+ PR+ Ki-67 ^{low} ESR1+ GATA3+ XBP1+ HNF-3α + MYB+ MAP3K1+ MAP2K4+ Citoqueratina luminal+ adesão célula-célula +		40-50	Grau I	Bom	Endócrina
Luminal B	HER2+	ER+ HER2+ PR+/- Ki-67 ^{low/high} FGFR1+ Citoqueratina luminal + adesão célula-célula+		20-30	Grau II	Intermediário	Endócrina Quimioterapia Imunoterapia
	HER2-	ER+ HER2- PR- Ki-67 ^{high} FGFR1+ Citoqueratina luminal+ adesão célula-célula					Endócrina quimioterapia
HER2 +		ER- HER2+ PR- Ki-67 ^{high} Tp53+		15-20	Grau III	Ruim	Quimioterapia Imunoterapia
TNBC	Basal-like		ER- HER2- PR- Ki-67 ^{high} EGFR+ TP53+ CK5/6+ BRCA1+ CDKN2A ^{high} RB1 ^{low} FGFR2+ adesão célula-célula ^{low}	10-20	Grau III	Ruim	Quimioterapia Inibidor PARP Experimental
	N ã o b a s a l	Claudin low	ER- HER2- PR- Claudin – Ki-67 ^{high} Stem cell+ EMT+ GATA+ CDH1+ adesão célula-célula ^{low}			Ruim	
		Metaplástico (MBC)	ER- HER2- PR- EMT+ Tumor stem cell+ PI3CA- KRAS- AKT-			Ruim	
		Interferon high	ER- HER2- PR- genes reguladores de Interferon+ STAT1+ SP110 ^{high}			Intermediário	

ER= Receptor de estrogênio (BEŇAČKA *et al.*, 2022; DONEPUDI *et al.*, 2014; SEALE; TKACZUK, 2022; THAKUR *et al.*, 2022); PR= receptor de progesterona (BEŇAČKA *et al.*, 2022; DONEPUDI *et al.*, 2014; SEALE; TKACZUK, 2022; THAKUR *et al.*, 2022); HER2= receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (SCHETTINI; PRAT, 2021); FGFR= Receptor de crescimento de fibroblastos (DE LUCA *et al.*, 2020); Ki-67= Kiel 67 (DAVEY *et al.*, 2021); *Tumor stem cell* (LIU *et al.*, 2014); ESR1= Receptor de estrogênio 1 (GUTTERY *et al.*, 2015); GATA3= fator de transcrição de ação "trans" específico de células T (ODA *et al.*,

2023); HNF-3 α = fator nuclear de hepatócito 3-alfa (LACROIX; LECLERCQ, 2004); XBP1= proteína de ligação X-box 1 (BARUA; GUPTA; GUPTA, 2020); MYB= protooncogene de mieloblastose (CICIRÒ; SALA, 2021); MAP3K1= proteína quinase ativada por mitógeno 1 (CHEUKFAI *et al.*, 2022); MAP2K4= proteína quinase 4 ativada por mitógeno de dupla especificidade (LIU *et al.*, 2019); TP53= Proteína P53 (DUFFY; SYNNOTT; CROWN, 2018); EGFR= Receptor de fator de crescimento epidérmico (SONG; LIU; YU, 2020); CK= citocina (CHEN; QIN; LIU, 2018); BRCA1= Proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1 (FU *et al.*, 2022); CDKN2A= inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (HAN *et al.*, 2022); RB1= proteína do retinoblastoma 1 (WU *et al.*, 2020); EMT= Transição epitélio-mesenquimal (XU *et al.*, 2018); CDH1= Caderina 1 (BÜCKER; LEHMANN, 2022); KRAS= gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten (ZHU *et al.*, 2022); AKT= Serina treonina quinase (ZHU *et al.*, 2022); STAT1= transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (PALAKURTHI *et al.*, 2023); SP110= *nuclear body protein* SP110 (LEU *et al.*, 2018); PARP= poli (ADP-ribose) polimerase (PANTELIDOU *et al.*, 2019). Grau I= Bem diferenciado; Grau II= moderadamente diferenciado; Grau III= pouco diferenciado.

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bases biológicas para a agressividade do câncer de mama triplo-negativo

O TNBC frequentemente afeta mulheres jovens, ao redor dos 35 anos e apresenta uma maior taxa de recidiva e metástases à distância. Por ser bastante heterogêneo, a biologia tumoral é descrita como dependente da regulação de diversas vias, por exemplo, regulação da via Wnt/ β -catenina por microRNA (miR) 121/122 (LIU et al., 2018), células tronco cancerígenas podem ser sustentadas pela via do TGF- β (fator de crescimento transformador beta) (WALCHER et al., 2020; XU et al., 2018) ambas com repercussão na transição epitélio-mesenquimal (do inglês *epithelial-mesenchymal transition* - EMT), além da regulação do metabolismo tumoral através via glutaminolítica indutor de TME protumorigênico (BUCZKOWSKA; SZELIGA, 2023; DIAS et al., 2020) que atuam em conjunto com diversos outros genes promotores de tumor, o que torna difícil o combate a essa doença.

Alterações genéticas relevantes são relacionadas a EMT, a figura 2 ilustra esse processo biológico que pode ser reversível e engloba a remodelação do citoesqueleto celular através de modificações bioquímicas e moleculares que conferem características de células indiferenciadas e no câncer, essa mudança conformacional leva aos fenômenos de invasão, migração e resistência a apoptose, condições essas de extrema importância para a formação de metástases (BAKIR et al., 2020; CELIÀ-TERRASSA; KANG, 2024). Além disso, genes de proliferação, resposta imune aos tumores, resistência a morte celular, desregulação do metabolismo energético da célula, também são significativos e afetam a progressão da neoplasia (BAKIR et al., 2020; PARIDA et al., 2022).

Apesar de conhecermos marcadores importantes, há grande dificuldade em desenvolver terapias oncológicas e isso se deve ao fato das incontáveis alterações que ocorrem no TME. Para aumentar a sobrevida dos pacientes, foram elaboradas terapias cujo princípio é bloquear a proliferação celular, o que consequentemente engloba todas as células ou também erradicá-las através de radiação (LIU et al., 2024). Os efeitos adversos que os tratamentos convencionais causam são extremamente desagradáveis e tornam os pacientes susceptíveis a outras doenças (ALEIXO et al., 2020; LV et al., 2023). Recentemente vacinas de mRNA carregados por nanopartículas (NP) têm sido testadas para melanoma (CARLINO et al., 2023),

abrindo caminhos para aplicações mais modernas e inovadoras. Assim, a investigação de novas terapias se faz necessária e atualmente é um campo de grande interesse.

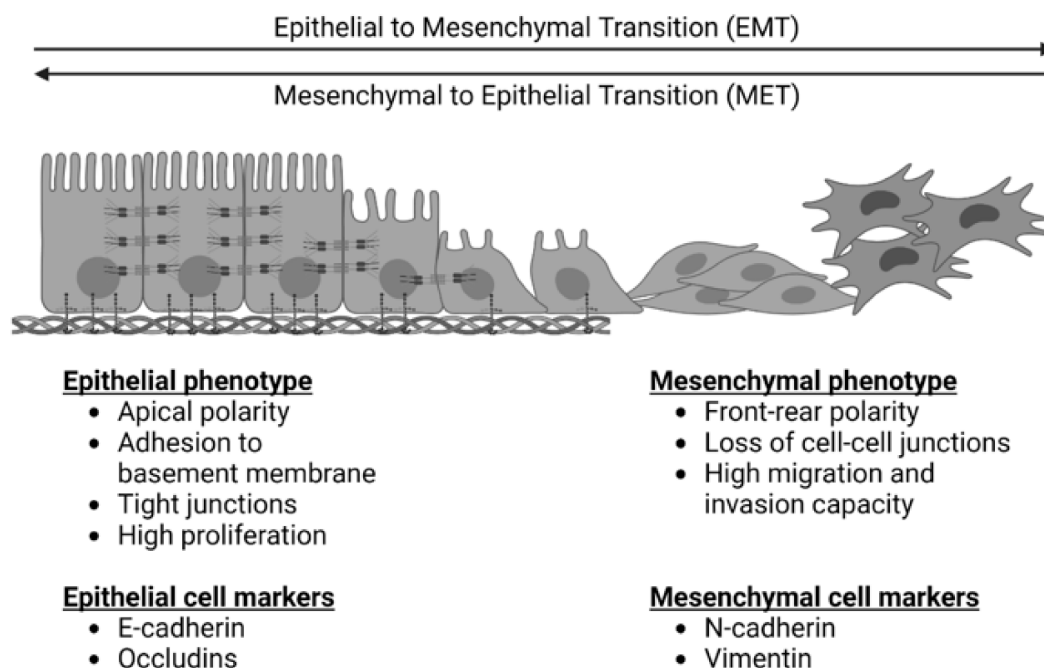


Figura 2: A transição epitélio mesenquimal remodela o citoesqueleto celular.

A perda de junções celulares promove um fenótipo de desdiferenciação que em células tumorais, leva a um maior potencial de migração e invasão de tecidos subjacentes. Reproduzido de: (HINTON *et al.*, 2023).

Uma das opções mais inovadoras, é engenharia de partículas nanotecnológicas aplicadas à saúde humana, também chamada de nanomedicina. Esse campo da ciência visa estudar terapias-alvo, que consistem principalmente nos sistemas de entrega e liberação de biomoléculas para atingir pontos específicos do organismo, tornando-as mais eficazes nas modulações celulares. Terapias-alvo envolvendo o carregamento de ácidos nucleicos por nanopartículas começaram a ser testadas para modular a expressão de genes, especialmente os envolvidos na carcinogênese (ABBASI KAJANI *et al.*, 2021; GATOO *et al.*, 2014).

1.2 As bases da nanomedicina para aplicações no contexto oncológico

Muitas terapias em potencial podem sofrer danos antes mesmo de chegar ao destino final pois são passíveis de degradação. Para contornar esse problema, foram criados invólucros protetores e que também apresentam a função de carreador

(BASSI *et al.*, 2013; WEBER *et al.*, 2024). Um exemplo disso, são as terapias gênicas, pois os ácidos nucleicos não conseguem atravessar a membrana plasmática das células passivamente, assim o uso de vetores para internalização dessas moléculas é considerado essencial (BOORJIAN *et al.*, 2021; DIZAJ; JAFARI; KHOSROUSHAHI, 2014).

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar que envolve a pesquisa de novos materiais e tem sido utilizada em diversos campos como a indústria, eletrônica, mecânica, química, alimentícia e farmacêutica, sendo regulamentada pela ISO/TR 13014:2012 como a ciência que estuda estruturas em escala de 1 a 100 nanômetros (nm) em uma de suas dimensões (MISHRA *et al.*, 2022; MORE *et al.*, 2021), cujas propriedades físico-químicas e toxicológicas ainda não são totalmente conhecidas (MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2018). Nesta ciência, são estudados diversos tipos de nanomateriais, como: nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas ou óxidos metálicos, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas, entre outros tipos de materiais (AFTAB *et al.*, 2018).

O uso de nanotecnologia já conta com estudos clínicos de diferentes fases e tem obtido boas respostas no tratamento de pacientes oncológicos. Algumas terapias a base de nanopartículas estão em teste, inclusive no Brasil e, como todos os protocolos oncológicos, as terapias são combinadas com terapias mais usuais. Alguns exemplos são NP à base de platina por meio de injeções intratumorais combinadas com quimiorradiação (LE TOURNEAU *et al.*, 2022) e NP ligadas por albumina e paclitaxel (nab-paclitaxel) por via endovenosa (BIGANZOLI *et al.*, 2020). A primeira droga nanoestruturada foi aprovada em 1995 e consiste na formulação lipossomal de doxorubicina, o Doxil®, (BARENHOLZ, 2012). Esses exemplos ilustram o grande potencial do uso da nanotecnologia para a saúde humana.

Dentre os sistemas nanoestruturados, destacam-se aquelas baseadas em lipídios, como as nanopartículas lipídicas sólidas (do inglês *solid lipid nanoparticles* - SLN), investigadas por suas aplicabilidades em estudos de terapias alvo. As SLN possuem propriedades físico-químicas que permitem a funcionalização com diversas moléculas como fármacos (CHIRIO *et al.*, 2014; TUPAL *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2018), ácidos nucleicos (RADAIC; DE JESUS, 2018; RADAIC; DE PAULA; DE JESUS, 2015; RASSU *et al.*, 2017; RUIZ DE GARIBAY *et al.*, 2015; SUÑÉ-POU *et al.*, 2018), anticorpos (KUO; KO, 2013; KUO; WANG, 2016),

Aliado ao lipídio sólido, os lipídios catiônicos (Figura 3B), como o DOTAP (*1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*), possuem duas cadeias de ácidos graxos insaturados que conferem fluidez à molécula e a mantêm no estado líquido à temperatura ambiente. A cabeça polar do DOTAP é positiva devido ao grupo amônio, o que permite interação eletrostática com moléculas carregadas negativamente, como os ácidos nucleicos, sendo amplamente usado em sistemas de *gene delivery* (MIATMOKO *et al.*, 2023; MIHAILESCU *et al.*, 2023). Por fim, os surfactantes desempenham um papel fundamental devido à capacidade de alterar as propriedades da interface entre diferentes fases e isso só é possível graças à sua estrutura molecular. O Pluronic F68 (Figura 3C) pertence à família dos poloxâmeros, compostos por blocos copolímeros de óxido de etileno (hidrofílicos) e óxido de propileno (hidrofóbicos), permitindo a estabilização sem interferir na carga de superfície das SLN (DI SPIRITO *et al.*, 2024; KHALIQ *et al.*, 2023). As SLN aqui produzidas possuem formato semelhante a anéis de cebola (*onion-like*, Figura 3D) (DE JESUS, *et al.*, 2013) e seu apresenta diversas vantagens, especialmente devido à sua composição, que garante excelente estabilidade físico-química e proteção de moléculas sensíveis à degradação enzimática, como os ácidos nucleicos (Figura 3E) (FERHAN *et al.*, 2022; RADAIC; DE PAULA; DE JESUS, 2015).

O sucesso de terapias gênicas a base de NP depende da captação e internalização da nanoestrutura e isso depende de múltiplos fatores, dentre eles destacam-se o diâmetro, a carga superficial, revestimento e formato, bem como a afinidade da célula receptora. A principal forma de captação de NP é a endocitose, um mecanismo celular para a internalização de componentes externos a célula por meio de vesículas. A endocitose é mediada pela interação com receptores presentes na membrana celular, regiões ricas em clatrina capturam partículas até 200 nm, (Figura 4a), já as partículas menores que 100 nm são endocitadas por receptores caveolina (Figura 4b). Além disso, pode ocorrer a internalização por vias independentes de clatrina/caveolina (Figura 4c). Vias menos seletivas, como a macropinocitose, captam partículas grande quantidade (Figura 4d) e podem ser mais ativas em células tumorais. Partículas grandes de até 10 µm são captadas por células imunes fagocitárias (Figura 4e), além da entrada direta de partículas através da membrana (Figura 4 f, g, h, i) (FOROOZANDEH; AZIZ, 2018; RIBOVSKI *et al.*, 2023; TOSCANO; TORRES-ARIAS, 2023).

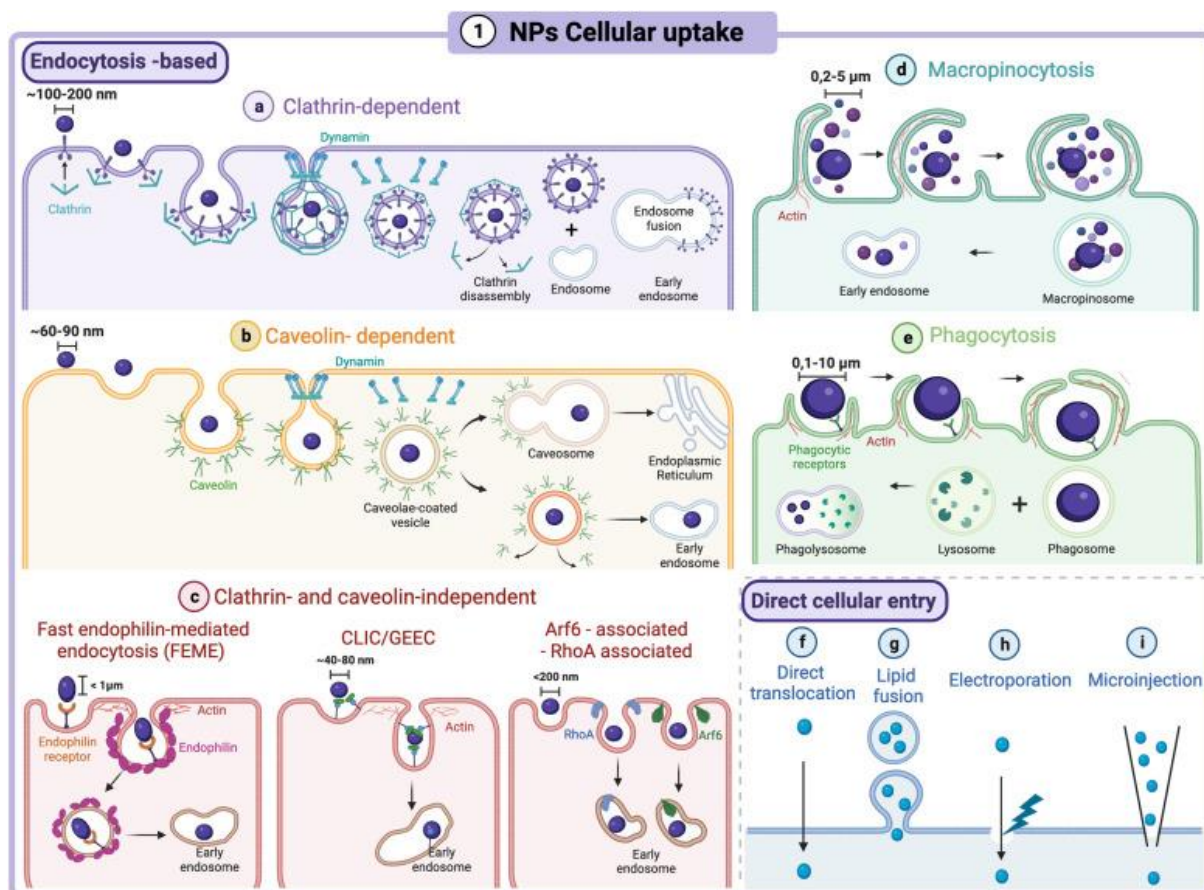


Figura 4. Mecanismos de captação e internalização de nanopartículas.

As nanopartículas podem ser internalizadas pelas células por diferentes vias, dependendo de suas propriedades físico-químicas, como tamanho, carga e composição. As principais vias incluem a) endocitose mediada por clatrina, em que as nanopartículas são internalizadas por vesículas revestidas com clatrina, b) endocitose mediada por caveolina, associada a invaginações de membrana denominadas caveolas. Além disso, podem ocorrer c) processos independentes de clatrina e caveolina e d) macropinocitose, caracterizada pela formação de vesículas maiores, além de f) fagocitose, predominante em células imunológicas, como macrófagos, envolvendo a captura ativa de partículas maiores, além da entrada direta através da membrana celular: f) translocação; g) fusão lipídica; h) eletroporação; i) microinjeção. Nessa conjuntura, a via de internalização é dependente do tipo celular e das características das nanopartículas, o que influencia diretamente sua distribuição intracelular e eficácia terapêutica Reproduzido de: (TOSCANO; TORRES-ARIAS, 2023).

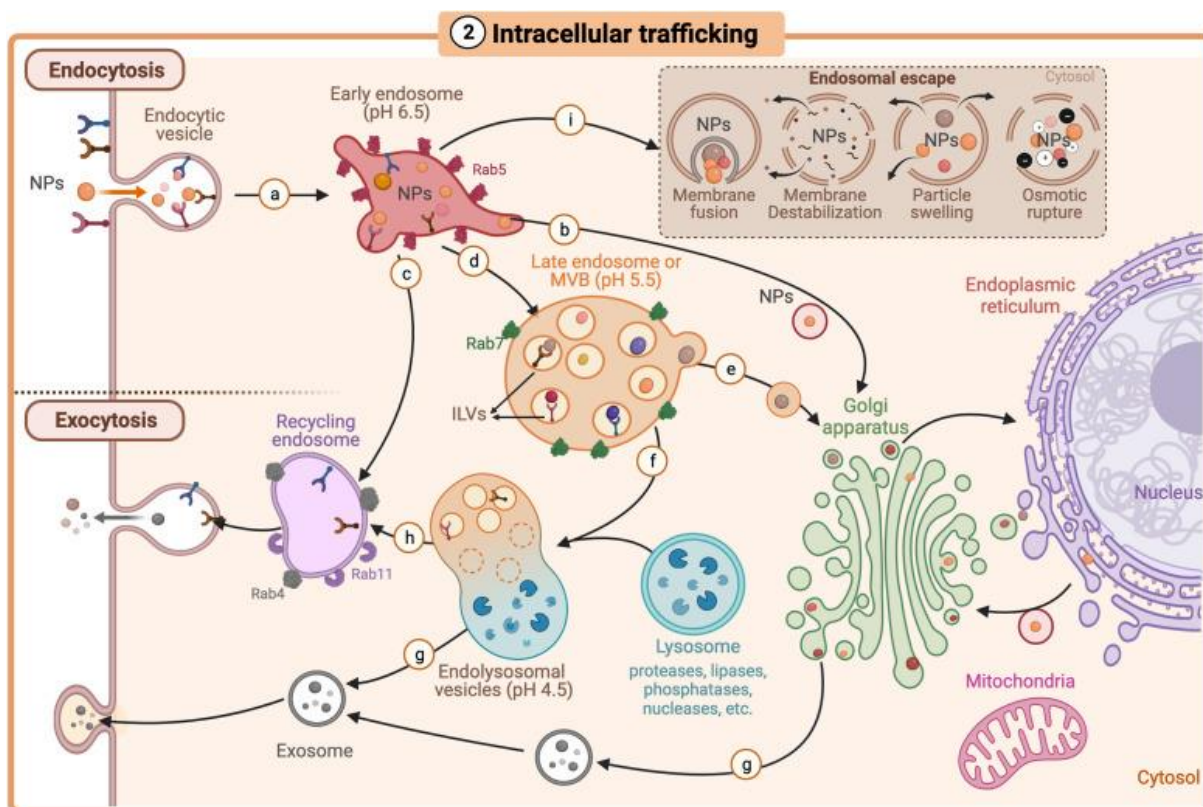


Figura 5. O tráfego intracelular de vesículas captadas pela via endocítica.

As nanopartículas endocitadas percorrem o citoplasma celular envolvidas por vesículas, iniciando pela formação do endossomo precoce (a). A partir dessa etapa, elas podem ser transportadas para o aparato de Golgi (b) ou direcionadas diretamente para a reciclagem do endossomo (c). O endossomo precoce (a) sofre maturação, originando o endossomo tardio (d), cujas partículas também podem ser enviadas ao aparato de Golgi (e). Além disso, o endossomo tardio (d) pode se fundir com o lisossomo, formando o endolisossomo (f). Nesse processo, os exossomos (g) formados a partir do endolisossomo, ou do complexo de Golgi, participam do transporte de moléculas bioativas para comunicação celular. Por fim, as partículas processadas no endolisossomo podem ser recicladas e exocitadas (h). Reproduzido de: (TOSCANO; TORRES-ARIAS, 2023).

Na via endocítica, a membrana celular é remodelada para formar uma invaginação que engloba as partículas. Essa invaginação se fecha, originando uma vesícula que se desprende no interior da célula onde é transportada. Essas vesículas dão origem ao endossomo precoce (pH 6,5; Figura 5a), que desempenha um papel essencial na mobilização intracelular, como mostrado na Figura 5. Os endossomos podem seguir diferentes destinos, um deles é o transporte ao complexo de Golgi, onde o conteúdo é processado e redistribuído para outras organelas (Figura 5b), possibilitando a liberação gradual de fármacos ou ácidos nucleicos no citoplasma. Outra rota é a reciclagem, na qual o endossomo retorna à membrana celular para

liberar seu conteúdo no meio extracelular (Figura 5c, h). Além disso, o endossomo pode sofrer maturação, diminuindo o pH progressivamente, isso facilita a liberação de moléculas ativas no citoplasma (Figura 5d). Quando ocorre fusão do endossomo com o lisossomo, forma-se a vesícula endolisossomal, onde o pH cai ainda mais (pH 4,5), levando à degradação do conteúdo interno (Figura 5f). Os produtos dessa degradação podem ser eliminados por meio de exossomos (Figura 5g). Esses processos destacam a complexidade da via endocítica, que desempenha um papel central na regulação do transporte intracelular, na liberação de moléculas terapêuticas e na manutenção da homeostase celular (FOROOZANDEH; AZIZ, 2018; SAKAI-KATO; YOSHIDA; IZUTSU, 2019; TOSCANO; TORRES-ARIAS, 2023).

O escape endossomal (Figura 5i) é um passo crítico no uso de NP para a entrega eficiente de moléculas terapêuticas, como ácidos nucleicos. Após a endocitose, as NP enfrentam o desafio de atravessar a membrana do endossomo antes da maturação para endolisossomos, composto por um pH bastante ácido e enzimas de degradação que podem comprometer a função terapêutica. Componentes catiônicos, como o DOTAP, podem desestabilizar a membrana do endossomo, permitindo a passagem para fora da vesícula e permitindo assim a liberação do conteúdo no citoplasma. O sucesso desse processo é fundamental para garantir a funcionalidade das moléculas entregues, especialmente no caso de sistemas de edição gênica. Assim, compreender e controlar os mecanismos de escape endossomal é um ponto primordial no desenvolvimento de sistemas de entrega baseados em NP (GILLERON *et al.*, 2013; RIBOVSKI *et al.*, 2023; TOSCANO; TORRES-ARIAS, 2023).

1.3 Avanços no uso de terapias gênicas no combate ao câncer

Nos últimos anos, os avanços da medicina no tratamento de doenças como o câncer tem se destacado pela tecnologia e inovação com bons resultados (LE TOURNEAU *et al.*, 2022; WEBER *et al.*, 2024). A capacidade de carrear genes e promover modulações biológicas em células doentes é uma das descobertas mais significativas do século, possibilitando a aplicação de terapias personalizadas. Entretanto, permanece o desafio da construção de vetores que protejam os ácidos nucleicos com eficiência, além de permitir captação pelas células e promover o escape endossomal (RIBOVSKI *et al.*, 2023; TORRES-VANEGAS; CRUZ; REYES, 2021).

Sistemas virais já foram aprovados para uso em humanos, à exemplo de terapias baseadas em adenovírus (AAV- *Adeno-associated virus*) para doenças da retina (MAGUIRE *et al.*, 2019) e terapias Casgevy® e Lyfgenia® para entrega do sistema CRISPR/Cas9 para anemia falciforme (LOCATELLI *et al.*, 2022; TRAXLER *et al.*, 2016). Apesar de aprovado em agências regulatórias, o uso de sistemas virais apresenta algumas desvantagens como imunidade preexistente ao vírus e a geração de resposta imune adaptativa, o que pode comprometer o tratamento (GOROVITS *et al.*, 2023).

Com o avanço da nanomedicina, os carreadores não virais, como as NP, são uma aposta promissora e atualmente, sua aprovação regulatória está mais voltada ao carregamento de fármacos como a doxorubicina (BARENHOLZ, 2012) e nab-paclitaxel (BIGANZOLI *et al.*, 2020). Entretanto, o desenvolvimento da Comirnaty®, uma vacina à base de mRNA carregado por nanopartículas lipídicas, contribuiu significativamente para o controle da pandemia de SARS-Cov-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, também chamada de COVID-19), a aplicação da vacina contribuiu substancialmente para a provação do uso de nanotecnologia para a saúde humana (LAMB, 2021). Recentemente, um estudo clínico fase II utiliza tecnologia semelhante à vacina de mRNA, porém, é aplicada no tratamento de melanoma. A terapia baseada em mRNA carregado por nanopartículas lipídicas sólidas (mRNA4157-V940) tem por objetivo construir uma biblioteca de mRNA individual contendo as assinaturas gênicas extraídas do melanoma ressecado do paciente. Isso significa que cada indivíduo receberá uma terapia exclusiva, tornando essa abordagem uma das inovações mais revolucionárias e personalizadas na medicina moderna (WEBER *et al.*, 2024).

1.4 A transição epitélio mesenquimal como um alvo terapêutico

Diversos alvos terapêuticos tem sido investigados como possíveis terapias-alvo, dentre elas, via Wnt/ β -catenina está intimamente relacionada a proliferação celular, diferenciação e migração, sendo crucial para o equilíbrio homeostático dos tecidos e também no câncer. A figura 6 ilustra a sinalização Wnt ativada, inibindo a destruição da proteína β -catenina, responsável pela adesão celular que, sob condições normais, é degradada no citoplasma (XUE *et al.*, 2024; ZHANG, MING ZHU *et al.*, 2015). Esse processo ocorre por meio de um complexo de proteínas chamado

complexo destruidor, que inclui a proteína quinase GSK-3 β (glicogênio sintase quinase-3 beta), gene associado a polipose adenomatosa do cólon (APC), e caseína quinase – 1 (CK1), a ubiquitina ligase β TrCP (proteína contendo repetição de beta-transducina) e uma proteína chave na ativação da Wnt, a Axin. Quando esse complexo é montado, ocorre a destruição de β -catenina (XUE *et al.*, 2024; YU *et al.*, 2021).

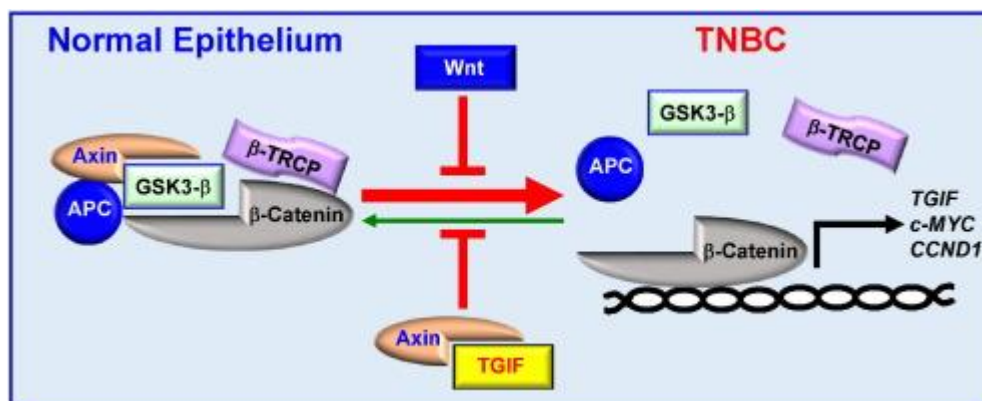


Figura 6. TGIF1 sequestra Axin e impede a montagem do complexo de destruição de β -catenina.

No epitélio normal, ocorre a regulação dos níveis de β -catenina que é destruída através do complexo de destruição mediado por Axin, entretanto foi constatado que em TNBC o fator de transcrição TGIF sequestra Axin e impede que o complexo seja montado. Dessa maneira, a β -catenina é translocada para o núcleo e regula a expressão de genes que promovem a diferenciação celular. Reproduzido de (RAZZAQUE; ATFI, 2016)

Foi observado que Axin pode ser sequestrada por uma proteína repressora de transcrição, chamada TGIF1- fator transformador de interação com o crescimento 1 (do inglês *transforming growth-interacting fator 1*, TGIF1), especialmente em TNBC (RAZZAQUE; ATFI, 2016; ZHANG *et al.*, 2015). No contexto tumoral, o TGIF1 demonstrou a capacidade de sequestrar Axin e impedir a montagem do complexo destruidor de β -catenina, gerando um acúmulo no citoplasma que leva a translocação de β -catenina para o núcleo, induzindo a sinalização para a diferenciação celular (ZHANG *et al.*, 2015). Um dos principais impactos desse fenômeno é a EMT (TANG *et al.*, 2021) que é caracterizada por um processo dinâmico no qual células epiteliais perdem suas características de adesão, polaridade e junções intercelulares, adquirindo um fenótipo mesenquimal típico de migração e invasão bastante marcante da progressão tumoral (JONCKHEERE *et al.*, 2022).

O TGIF1 pertence a superfamília de homeodomínio de extensão de laço de três aminoácidos (do inglês *three-amino acids loop extension* - TALE) e controla

processos que incluem o desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celulares (WOTTON; LO; SWABY; *et al.*, 1999). Além da sua relação com a via Wnt/ β -catenina, possui relação com a via do TGF- β e isso se deve à capacidade de reunir um complexo de fatores de transcrição Smads que estão ligados ao DNA (MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001; WANG *et al.*, 2023). As Smads são uma família de proteínas estruturalmente semelhantes e que possuem papel importante na regulação imune contra o câncer (CHEN *et al.*, 2024). O termo Smad foi criado a partir de genes homólogos encontrados em *Drosophila spp.* e *C. elegans*. Mutações no gene MAD (do inglês "*Mothers Against Decapentaplegic*") levam a supressão do gene decapentaplégico, responsável pela formação das asas de drosófilas (SEKELSKY *et al.*, 1995) e posteriormente genes homólogos chamados SMA (do inglês "*small*"), foram identificados em *C. elegans* esclarecendo que mutações no gene SMA tem papel na regulação do crescimento (SAVAGE *et al.*, 1996). Homólogos desses genes também foram identificados em vertebrados (RIGGINS *et al.*, 1996).

As Smads têm um papel fundamental na sinalização e regulação de TGF- β (DERYNCK; ZHANG, 2003; WANG *et al.*, 2023). Essa sinalização inicia com a ligação de TGF- β ao receptor de TGF- β tipo II, um receptor transmembrana com domínio serina/treonina quinase e após essa ligação ocorre a fosforilação e ativação do receptor de TGF- β tipo I (RTGF- β I). Essa ativação leva a fosforilação de Smads que regulam diversas vias específicas na via do TGF- β e sua regulação ocorre através da fosforilação das Smad 2 e Smad 3. Em seguida, é formado um complexo heterodimérico com Smad 4 e finalmente o complexo é translocado para o núcleo (MILLER; HILL, 2022; MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001; WOTTON; LO; LEE; *et al.*, 1999). O complexo Smad liga a sequências de DNA promotoras e essa associação repercute no recrutamento de TGIF1 para a resposta a TGF- β , reprimindo a sua transcrição (MIYAZAWA *et al.*, 2024; WOTTON; LO; SWABY; *et al.*, 1999). Quando os controles da Smad4 e da Smad2 são perdidos, colaboram para o desenvolvimento do câncer (HUYNH; HIPOLITO; DIJKE, 2019; SEO *et al.*, 2006; WOTTON; LO; SWABY; *et al.*, 1999).

Um papel fundamental nas respostas supressoras de tumores é desencadeado pelo TGF- β , dentre eles estão o efeito citostático, diferenciação e apoptose. As células malignas contornam esse efeito supressor inativando

componentes centrais da via que bloqueiam os receptores de TGF- β ou as propriedades supressoras de tumor, nesse caso, as células tumorais podem controlar as funções reguladoras exercidas pelo TGF- β , adquirindo características de invasão, produção de mitógenos autócrinos e liberação de citocinas pró-metastáticas (MASSAGUE, 2008; ZHANG et al., 2015). O TGIF1 possui a capacidade de restringir a rede supressora do TGF- β possibilitando o desenvolvimento de novas terapias gênicas através do silenciamento desse gene (WANG et al., 2018).

1.5 Biologia da edição gênica dirigida por CRISPR/Cas9

O microambiente tumoral apresenta diversas modulações gênicas que levam a supressão ou a superexpressão de determinadas proteínas, que por sua vez, regulam uma infinidade de processos biológicos (FLISTER; BERGOM, 2018), como TGIF1 e seu papel na destruição da β -catenina (ZHANG et al., 2015). Sistemas de edições gênicas têm sido amplamente investigados para avaliar possíveis efeitos biológicos a fim de desenvolver novas terapias (HSU; LANDER; ZHANG, 2014; SHALEM *et al.*, 2014). Uma das mais promissoras terapias gênicas já aprovadas pela agência reguladora dos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) é o emprego de CRISPR/Cas9 para correções de mutações genéticas (PARUMS, 2024).

O CRISPR, sigla do inglês para *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, em conjunto com Cas (*CRISPR-associated proteins*) formam o sistema defesa adaptativo de procariotos contra vírus bacteriófagos (fagos), como demonstra a Figura 7. A gênese desse sistema ocorre em três etapas: adaptação, biogênese e interferência. A adaptação inicia quando um fago infecta a bactéria, que por sua vez incorpora regiões de DNA viral ao seu genoma. Essa região possui genes trans-ativadores (Tracr) essencial para a formação do RNA guia (gRNA), à jusante encontram-se os genes que codificam a proteína Cas (Figura 7, pentágono laranja, rosa, branca e azul claro) e o *locus* CRISPR, que contém regiões palindrômicas repetitivas, representados na figura 7 por losangos pretos e espaçadas pelas sequências adquiridas pelo contato com vírus, ilustradas por quadrado vermelho, azul e roxo na figura 7, que compreende as sequências de DNA virais integrados ao genoma bacteriano (ARROYO-OLARTE; BRAVO RODRÍGUEZ; MORALES-RÍOS, 2021; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; JINEK *et al.*, 2012).

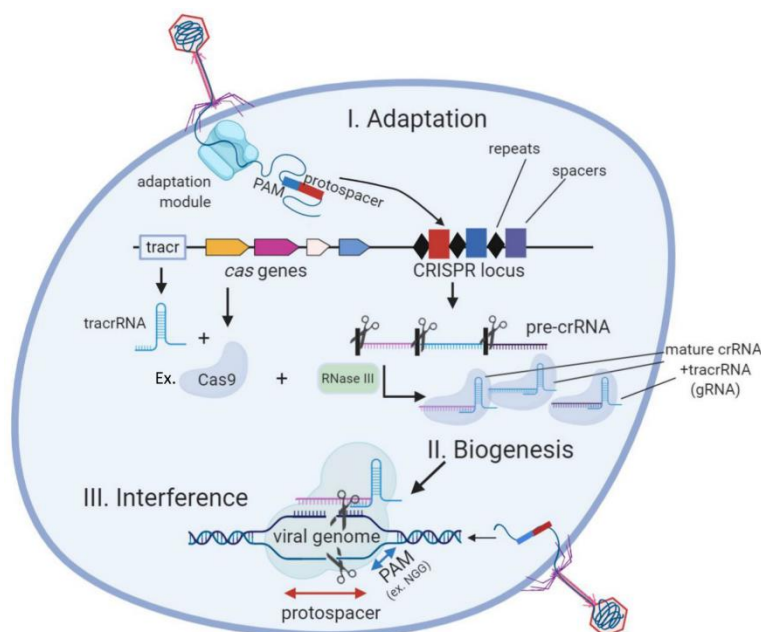


Figura 7. Esquematização da biologia de adaptação, biogênese e interferência de CRISPR/Cas9.

Ao analisar sequências de DNA bacteriano, os pesquisadores encontraram regiões palindrômicas do genoma, seguido de sequências distintas do DNA procarioto, ou seja, um DNA externo, chamado de espaçador. Durante infecções subsequentes, o *locus* CRISPR/Cas é transcrito um RNA longo que é maturado e fragmentado em pequenos gRNA. Assim, a proteínas Cas é guiada até sequências específicas DNA e realiza um corte enzimático no genoma invasor, impedindo a replicação viral. Reproduzido de: (ARROYO-OLARTE; BRAVO RODRÍGUEZ; MORALES-RÍOS, 2021).

Quando um fago entra em contato com a bactéria, que previamente adquiriu parte do DNA viral, inicia-se a biogênese da maquinaria do CRISPR/Cas9 com a transcrição de um RNA longo pre-CRISPR que é maturado e fragmentado, formando o RNA guia (gRNA = crRNA + tracrRNA) e a montagem do sistema. O gRNA leva a proteína Cas9 para a sequência específica do genoma viral na fase de interferência. Para a interação da Cas9 com o DNA é necessário um motivo adjacente protoespaçador (PAM) formado por três bases nitrogenadas. A primeira base pode ser adenina, timina, guanina ou citosina, seguido de duas guaninas (NGG), dessa maneira, a Cas9 que possui atividade endonuclease, ancora e corta a fita de DNA. Finalmente, o mecanismo de reparo do DNA é ativado, gerando deleções ou mutações que impedem a formação de novos vírus. Esse processo biológico deu origem a uma das ferramentas mais inovadoras de edição gênica (ARROYO-OLARTE; BRAVO RODRÍGUEZ; MORALES-RÍOS, 2021; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; JINEK *et al.*, 2012).

A maquinaria CRISPR/Cas foi otimizada e engenheirada para uso em diversos tipos celulares. Um dos maiores desafios da aplicação dessa técnica era a produção de dois plasmídeos distintos atuando simultaneamente para a produção do gRNA. Dessa maneira, houve uma união do crRNA com tracrRNA, dando origem ao *single guide* RNA (sgRNA) (CONG *et al.*, 2013), facilitando a aplicação desse sistema especialmente para ensaios que buscam compreender mecanismos biológicos e desenvolver novos alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças humanas (PANTELIDOU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2023). Atualmente, a maquinaria CRISPR/Cas9 já foi aprovada pelo FDA para algumas terapias como a anemia falciforme e talassemia- β (FRANGOUL *et al.*, 2021) e o câncer (STADTMAUER *et al.*, 2020), além de contar com diversos estudos clínicos em andamento. A edição gênica com CRISPR/Cas9 oferece uma abordagem inovadora para tratar doenças complexas, como o câncer, por meio de intervenções genéticas precisas e eficazes (ZHANG *et al.*, 2023).

Apesar dos avanços no tratamento do câncer de mama, subtipos agressivos, como o TNBC, as pacientes ainda apresentam baixa sobrevida e faltam opções terapêuticas eficientes (CAPUOZZO *et al.*, 2024). As terapias gênicas são a grande aposta para o tratamento desse subgrupo tumoral e aliadas a estratégias utilizando nanotecnologia trazem um potencial bastante inovador para a indústria (FARHEEN *et al.*, 2022). Embora as SLN sejam promissoras para a entrega de ácidos nucleicos, ainda há uma carência de estudos que avaliem sua eficácia na aplicação de edição gênica como o CRISPR/Cas9. Compreender o papel da eficiência de entrega de editores gênicos em alvos moleculares chave de mecanismos envolvidos na progressão tumoral pode abrir portas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e personalizadas para pacientes oncológicos. Por meio da aplicação de SLN para a entrega de editor gênico, este estudo propõe explorar abordagens inovadoras para o tratamento do câncer de mama.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar a eficiência de entrega do editor gênico CRISPR/Cas9 para edição do gene TGIF1 utilizando nanopartículas lipídicas sólidas, em culturas no formato esferoide geradas a partir de linhagens celulares de adenocarcinoma de mama triplo negativo.

2.2 Objetivos específicos

- a. Produzir e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas para o carregamento de ácidos nucleicos;
- b. Construir o vetor plasmidial para edição gênica por CRISPR/Cas9;
- c. Avaliar o potencial de carregamento e proteção de ácidos nucleicos, especialmente de plasmídeos contendo mais de nove mil pares de base em culturas de células em monocamada;
- d. Analisar a eficiência de nanopartículas lipídicas sólidas em transfectar plasmídeos elaborados para codificar a maquinaria CRISPR/Cas9 para cultivo celular em monocamada;
- e. Avaliar possíveis impactos das nanopartículas lipídicas sólidas sobre cultivos celulares em monocamada;
- f. Produzir modelo esferoide gerado a partir de linhagens celulares de câncer de mama para avaliar a eficiência de transfecção das nanopartículas lipídicas sólidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células em monocamada

As linhagens celulares de adenocarcinoma de mama triplo negativo MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), adenocarcinoma de mama MCF-7 (ATCC® HTB-22™), adenocarcinoma de próstata PC-3 (ATCC® CRL-1435™) e células epiteliais de rim humano HEK293T (ATCC® CRL-3216™) foram mantidas em meio de cultura completo: meio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium* - *Thermo Fisher Scientific, US*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - *Thermo Fisher Scientific, US*). As culturas foram mantidas a 37°C e sob atmosfera de 5% CO₂ em

incubadora (*Panasonic Healthcare, US*), em placas de 60 ou 100 mm até atingir 80% de confluência da monocamada.

Proteínas totais extraídas de células tumorais foram gentilmente doados pela Dra. Marília Meira Dias, para análise dos níveis de TGIF1 por *Western blot*, sendo isolados das seguintes linhagens celulares de câncer de mama: MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130™), MDA-MB-453 (ATCC® HTB-131™), MDA-MB-453 (ATCC® HTB-132™), MDA-MB-157 (ATCC® HTB-24™), DU 4475 (ATCC® HTB-123™), HCC1143 (ATCC® CRL-2321™), HCC1599 (ATCC® CRL-2331™), HCC1937 (ATCC® CRL-2336™), HCC70 (ATCC® CRL-2315™), HCC1806 (ATCC® CRL-2335™), BT-549 (ATCC® HTB-122™), Hs 578T (ATCC® HTB-126™).

3.2 Preparo das nanopartículas e complexação com DNA plasmidial

Para o carregamento do DNA plasmidial, foram produzidas SLN utilizando técnica de micro extrusão desenvolvida pelo grupo de pesquisa *Nano-cell interactions lab* liderado pelo professor Marcelo Bispo de Jesus. Esta técnica consiste na preparação de uma microemulsão catiônica em água bidestilada contendo ácido esteárico (lipídio sólido a temperatura ambiente – *Sigma-Aldrich, US*), DOTAP (lipídio catiônico, *Avanti Polar Lipids Inc., US*) e *pluronic F68* (surfactante não-iônico, *Fluka, US*). A microemulsão foi aquecida a 5 °C acima da temperatura de fusão do ácido esteárico (69 °C). Posteriormente, o tamanho das partículas foi uniformizado utilizando uma mini-extrusora (*Avanti Polar Lipids Inc., US*), por meio de 30 passagens sucessivas através de uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm (*Isopore™, Merck Millipore, US*). Após esse processo, a solução contendo as SLN foi transferida para um banho de gelo, com o objetivo de solidificar as partículas e evitar sua agregação. Por fim, a solução foi armazenada a 4 °C para uso futuro (DE JESUS et al., 2010, 2013). A concentração final de SLN foi de 3,8 µg/mL, o cálculo foi realizado a partir da concentração de lipídios totais (ácido esteárico e DOTAP) (GARCIA-FOSSA; DE JESUS, 2024).

3.3 Medidas de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão

A caracterização físico-química das SLN foi avaliada a partir do tamanho de partículas e o índice de polidispersividade (*Polydispersivity Index - PDI*), para isso, a leitura foi realizada duas semanas após a produção de SLN para estabilização da

formulação (DE JESUS et al., 2013; GARCIA-FOSSA; DE JESUS, 2024; RADAIC, DE PAULA; DE JESUS, 2015). Assim, as SLN sem complexação e as SLN complexadas (SLNplex) foram incubadas com DNA plasmidial (pDNA TGIF1_1 e TGIF1_2 relacionado ao CRISPR/Cas-9 e mKO2 que codifica uma proteína fluorescente) à 37°C por 20 min para a interação eletrostática e formação do SLNplex, a proporção SLN:DNA utilizada foi de 1:1. Logo após, as amostras foram diluídas em água deionizada (ddH₂O) ou meio de cultura celular RPMI1640 na proporção 1:20 e depositadas em cubetas de poliestireno retangulares de 10 mm de espessura para leituras. As medidas foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering – DLS – Zetasizer NanoZS 90, Malvern Panalytical, UK*) que mede a distribuição de partículas em meio líquido, espalhando o feixe de luz que incide na amostra.

Em outro experimento, as SLN e os SLNplexos foram diluídos na proporção de 1:20 e transferidos para cubetas de poliestireno em formato “Y” contendo eletrodos, para a determinação do potencial zeta (ζ) hidrodinâmico. O potencial ζ é uma medida da capacidade de repulsão ou atração eletrostática das cargas superficiais, semelhante ao princípio da microeletroforese, e seus efeitos influenciam diretamente a estabilidade dos construtos (BHATTACHARJEE, 2016). Essas medições fornecem informações detalhadas sobre o estado de agregação das partículas, permitindo otimizar as formulações para assegurar maior estabilidade das suspensões (BHATTACHARJEE, 2016; SERRANO-LOTINA *et al.*, 2023). Vale destacar que as medidas obtidas são hidrodinâmicas, o que significa que a água forma uma camada de cargas ao redor das partículas. Dessa forma, os tamanhos apresentados nos resultados não correspondem exatamente aos diâmetros reais das partículas, assim como o potencial ζ , já que as partículas estão dispersas em água deionizada ou outras soluções (BHATTACHARJEE, 2016). As medidas foram realizadas no equipamento *Zetasizer NanoZS90 (Malvern Panalytical, UK)*.

3.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A fim de avaliar a morfologia e a superfície das SLN, as nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Dessa forma, as SLN foram depositadas em grades 300 *mesh* tendo sua superfície recoberta com filme de carbono, logo após foram contrastadas com citrato de uranila. As imagens

foram adquiridas em MET modelo JEM1400Plus (*JEOL, Japan*) a uma voltagem de 120 kV. O microscópio é equipado com uma câmera *OneView CMOS* com resolução 4K x 4K (*GATAN, US*) para a aquisição digital de imagens. As imagens não foram tratadas. Gostaríamos de agradecer ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano, CNPEM) pela *facility* e apoio técnico na execução da proposta TEM-28107F.

3.5 Desenho do *single guide RNA* (sgRNA)

O sgRNA é a uma das moléculas essenciais para a funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9, pois ela direciona a proteína Cas9 ao DNA-alvo que deve ser editado, o que garante a especificidade do CRISPR/Cas9 (CONG *et al.*, 2013). Para o desenho das sequências sgRNA, utilizou-se as ferramentas *online* disponíveis gratuitamente: *crispor.tefor.net/* e *www.e-crisp.org/*. Ambas necessitam da sequência genômica no formato BLAST para encontrar a sequência guia adequada e mais eficaz, a fim de evitar sequências fora do alvo desejado. As sequências escolhidas encontram-se na tabela 2 e foram sintetizadas pela empresa IDT & síntese – Brasil. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê Interno de Biossegurança do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) sob número de registro 2020-16.

Tabela 2. Sequências dos sgRNAs sintetizados para construção plasmidial

Identificação	Sequência
sgRNA_TGIF1_1_Foward	caccGGATGGTTCTAGCGCAGAGC
sgRNA_TGIF1_1_Reverse	aaacGCTCTGCGCTAGAACCATCC
sgRNA_TGIF1_2_Foward	caccGTTTACAATTTCCCGCCGTG
sgRNA_TGIF1_2_Reverse	aaacCACGGCGGGAAATTGTGAAC
sgRNA_eGFP3_Foward	caccGGCCACAAGTTCAGCGTGTC
sgRNA_eGFP3_Reverse	aaacGACACGCTGAACTTGTGGCC

Para compreender melhor a forma de corte do sistema CRISPR-Cas9, e quais parâmetros seriam mais interessantes em nosso estudo, foi estabelecido uma análise acerca da sequência de nucleotídeos para avaliar os sgRNAs mais eficazes. Dessa forma, foi verificado na literatura diferentes sequências do gene TGIF1 que

codificam para proteínas com estruturas de tamanhos distintos, assim, foi gerado um alinhamento de sequências de DNA bem como das proteínas dos bancos de dados *uniPROT* e *NCBI*.

3.6 Clonagem de vetor plasmidial com co-expressão de Cas-9 e sgRNA

A clonagem de plasmídeos bacterianos permite a introdução de sequências gênicas de interesse em células eucarióticas. A clonagem é essencial em estudos de biologia molecular especialmente para compreender fenômenos biológicos. O sistema CRISPR/Cas9 é formado por duas partes, o sgRNA e a endonuclease Cas, utilizamos um vetor plasmidial para a co-expressão de ambas sequências a fim de simplificar o processo de edição gênica (CONG *et al.*, 2013; RAN *et al.*, 2013). Para essa construção, foi manipulado o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro-(PX459) V2.0 (Addgene #62988). Esse plasmídeo facilita a clonagem para a co-expressão de CRISPR/Cas9, sendo necessário apenas inserir o sgRNA de interesse além disso, possui gene de resistência aos antibióticos ampicilina para seleção bacteriana e puromicina para seleção de células eucarióticas (RAN *et al.*, 2013).

A ação da enzima DNA ligase depende do grupo fosfato presente na extremidade 5' de um fragmento de DNA e o grupo hidroxila na extremidade 3' de outra. A fosforilação foi usada para preparar os oligonucleotídeos para inserção do sgRNA no plasmídeo. Inicialmente, ocorreu o anelamento e fosforilação dos oligonucleotídeos de TGIF1 e eGFP. Os *primers forward* e *reverse* foram ressuspensos a concentração final de 100 μ M e a reação de fosforilação foi preparada com 1 μ L de *primer*, 1X tampão de ligação T4, 1X tampão de reação T4 PNK (*polynucleotide kinase*, ambos de *New England Biolabs, US*), a reação foi levada ao termociclador 30 min a 37 °C seguido de 5 min a 95 °C e após resfriada gradualmente até 25 °C (RAN *et al.*, 2013).

A digestão enzimática permite abrir o plasmídeo em locais específicos para inserir sequências de DNA. Para clonar o sgRNA para TGIF1, foi necessário fazer a digestão enzimática do plasmídeo com a enzima de restrição Bbs I (*New England Biolabs, US*), 1x tampão 2.1 e 2 μ g de plasmídeo. O plasmídeo Px459 possui dois sítios de corte em que essa enzima atua, um na posição 245 e outro na posição 267, criando extremidades não-coesivas para inserção do sgRNA. A reação foi incubada em um microtubo por 2h a 37 °C e após 10 min a 65 °C (RAN *et al.*, 2013). A

confirmação da digestão foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e as amostras correram no gel a 80 mV por 1h. As imagens foram capturadas por transiluminador UV. A banda única do gel foi removida com bisturi e depositada em microtubo para extração do DNA através do *kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen, Germany)* seguindo as instruções do fabricante.

Os insertos de sgRNA foram ligados ao vetor plasmidial linearizado. Essa reação é catalisada pela enzima DNA ligase, que une as extremidades de DNA, formando ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos. Para isso, os oligos fosforilados foram previamente diluídos a uma proporção de 1:200 em ddH₂O e foi adicionado 20 ng de plasmídeo, tampão T4 DNA ligase 1X e Enzima T4 DNA ligase 1U. A reação foi incubada por 3h a temperatura ambiente (RAN *et al.*, 2013).

3.6.1 Transformação bacteriana

As bactérias possuem uma característica singular para captação de plasmídeos externos e isso contribui para adaptações, evolução e sobrevivência. Graças a esse sistema é possível que bactérias quimicamente competentes recebam e repliquem DNA plasmidial, permitindo produzir inúmeras cópias de forma rápida e acessível. Após a reação de ligação, as bactérias quimicamente competentes da linhagem Stbl3 foram transformadas. Após ambientação, 2 µL da reação de ligação foram adicionados gentilmente e incubados por 10 min no gelo. Posteriormente, foram incubadas o banho-maria a 42 °C por 45 segundos e rapidamente incubadas no gelo por 2 min nesse processo de choque térmico, o plasmídeo é incorporado pela bactéria. Em seguida, foi adicionado meio de cultura *super optimal broth* com glicose - SOC (0,5% extrato de levedura; 2% triptona; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glicose) e as amostras foram incubadas a 37 °C por 1h. Posteriormente, as bactérias foram inoculadas sobre uma placa de ágar Luria Bertani (LB ágar) com o auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas a 37 °C *overnight* (RAN *et al.*, 2013).

3.6.2 PCR de colônias

A inserção de plasmídeos contendo genes codificantes para proteínas permite que as bactérias atuem como pequenas fábricas de DNA, entretanto, nem todas as bactérias recebem o DNA de interesse, sendo necessário fazer uma triagem.

As bactérias transformadas foram plaqueadas e mantidas a 37° C *overnight*. Em uma nova placa de LB ágar, foram demarcadas as posições das colônias, em seguida essas colônias foram divididas: uma parte foi transferida para uma nova placa e a outra parte para microtubos. Na sequência, as placas foram incubadas a 37° C por 24h para o crescimento bacteriano e os microtubos foram levados ao banho seco a 95 °C por 10 min para lise e extração de DNA bacteriano.

O preparo da reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizado com os seguintes *primers*: *forward* PLKO1 - (GGACTATCATATGCTTACCG) para ambas construções e o *reverse* TGIF1_1 (aaacGCTCTGCGCTAGAACCATCC) ou TGIF1_2 (aaacCACGGCGGGAAATTGTGAAC) a 0.5 µM, juntamente com 200 µM dNPT, 1U enzima *Phusion*, 1x tampão *phusion* e 200 ng de DNA proveniente da lise bacteriana. As reações foram levadas ao termociclador por um ciclo de 95 °C, 2 min, 2 ciclos de 95 °C, 20 seg; 60 °C, 20 seg; 72 °C, 20 seg e um ciclo final de 72 °C, 3 min. Em seguida, o produto da amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e as amostras correram a 80 mV por 1h. As imagens foram capturadas por transiluminador UV com o *software Carestream* (*Onex Corporation, Canada*).

3.6.3 Sequenciamento

Para a determinar a ordem exata das bases nucleotídicas incorporadas ao plasmídeo foi realizado o sequenciamento do DNA plasmidial. Foi selecionada uma única colônia de cada sgRNA (TGIF1_1; TGIF1_2; eGFP3) para produção plasmidial e posterior sequenciamento para confirmação da inserção do sgRNA. Para isso, foi adicionado 5 mL de meio LB líquido em um tubo contendo o antibiótico ampicilina (1:1000), seguido de transferência da colônia com o auxílio de uma ponteira p10, seguindo para incubação a 37 °C sob agitação constante *overnight*.

No dia seguinte, o meio de cultura foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 300 x g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e os plasmídeos purificados pelo *kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (*Cellco Biotech, BR*), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram enviadas para o setor de sequenciamento de DNA do CNPEM, utilizando a metodologia de Sanger.

3.7 Ensaio de carregamento de partículas

O carregamento de DNA pelas SLN é um ponto chave do estudo. Nesta etapa foi avaliado o potencial de carregamento das SLN. A formação do SLNplex impede a passagem do DNA pela trama do gel de agarose, dessa maneira, o DNA fica retido no poço de aplicação e apenas o DNA que não foi ligado às SLN consegue migrar pelo gel.

Tabela 3. Concentrações molares para o ensaio de carregamento e proteção

SLN (nM)	pDNA (nM)
0,04	0,04
0,04	0,08
0,04	0,11
0,04	0,15
0,04	0,19
0,04	0,23
0,04	0,27
0,04	0,3
0,04	0,35
0,04	0,39
0,04	0,43
0,04	0,47

Primeiramente, foram incubadas diferentes concentrações molares pDNA para uma concentração fixa de nanopartículas (0.04 nM). A concentração molar mínima de DNA foi de 0,04 nM e máxima de 0,47 nM (vide Tabela 3). As SLN e o pDNA foram incubados a 37 °C por 20 min para a formação dos SLNplex e DNA livre foi utilizado como controle. Foi adicionado 10% de glicerol para gerar densidade na amostra e realizar carregamento do gel. Foi produzido gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x (40 mM Tris pH 7.6; 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA). As amostras correram no gel a uma tensão de 50 mV por aproximadamente 1h. Após a corrida, o gel foi banhado em 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As imagens foram obtidas através de transiluminador UV com o *software Carestream (Onex Corporation, Canada)*.

3.8 Ensaio de proteção de DNA plasmidial

Outro ponto de checagem é se as SLN têm a capacidade de proteger o pDNA de enzimas que o degradem. Assim, a proteção de pDNA pelas SLN foi avaliada através do ensaio de proteção contra DNase I para verificar a integridade do DNA que irá migrar através do gel de agarose. O DNA protegido é liberado da SLN pela adição de SDS (dodecil sulfato de sódio) e se protegido deve migrar pelo gel sem indícios de degradação. Da mesma forma que no ensaio de carregamento, foram incubadas diferentes concentrações molares de pDNA para uma concentração fixa de nanopartículas (0,04 nM), já o pDNA foi variável, a concentração molar mínima de 0,04 nM e máxima de 0,47 nM (vide Tabela 3). Os SLNplexos foram incubados a 37 °C por 20 min. Em seguida, foi adicionada 1U de DNase I para cada 2,5 µg de pDNA, juntamente com tampão (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 25 mM de MgCl₂; 1mM CaCl₂) e a mistura foi incubada a 37 °C por 30 min. Para parar a reação de degradação enzimática, foi adicionado 1% de SDS, que também atua como agente de liberação do pDNA do SLNplexo e como controle foi utilizado DNA livre e DNA livre tratado com DNase I (RADAIC; DE PAULA; DE JESUS, 2015). Após, foi adicionado 10% de glicerol para carregamento do gel de agarose a 1% produzido em tampão TAE 1x. As amostras percorreram o gel a uma tensão de 50 mV por aproximadamente 1h. Ao final o gel foi banhado em 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As imagens foram capturadas por transiluminador UV com o *software Carestream (Onex Corporation, Canada)*.

3.9 Transfecções em monocamada

O potencial de transfecção é compreendido como a capacidade dessas nanoestruturas inserir ácidos nucléicos no interior das células e o quanto esse carregamento será eficiente. Para esse ensaio utilizamos um plasmídeo genérico que codifica para uma proteína constitutivamente fluorescente chamada *mKusabira Orange 2* - mKO2 (excitação 551 nm e emissão 565 nm), utilizada para rastreamento e análise da eficácia de transfecção. Os ensaios de transfecção foram realizados utilizando as linhagens celulares MCF-7 e PC-3, descritas anteriormente. A como controle positivo, foi utilizada Lipofectamina 2000 (LF2K, *Invitrogen, UK*) foi preparada conforme instruções do fabricante e complexada com 1,7 nM de pDNA. Para a transfecção, foram preparados dois tubos contendo 50 µL de meio de cultivo celular sem suplementação, SLN e pDNA foram adicionados em seus respectivos tubos, em

seguida o tubo de pDNA foi adicionado ao tubo contendo as SLN e incubado por 20 min em temperatura ambiente para a formação dos SLNplexos. As proporções testadas de SLN:DNA estão descritas na tabela 4.

Além disso, células HEK293T também foram transfectadas com os plasmídeos construídos para edição gênica de TGIF1, a fim de avaliar a eficiência da entrega do editor gênico por SLN nessas células.

Tabela 4. Concentrações molares utilizadas para o ensaio de transfecção

SLN (nM)	pDNA (nM)
0,32	1,0
0,48	1,7
0,64	2,2
0,8	2,8
1,0	3,3

3.10 Western blot

Para avaliar a eficiência de edição gênica pelo sistema CRISPR/Cas9, avaliamos os níveis de expressão de TGIF1 em após a transfecção do DNA plasmidial contendo os sgRNAs. As amostras foram coletadas para análise a nível protéico por *Western blot*. Para isso, as células HEK293T foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de 1×10^6 células. As células foram então transfectadas com os SLNplex como descrito na sessão anterior e mantidas em cultura por 72h. Para a extração do material, a placa foi colocada sobre o gelo, o sobrenadante foi aspirado e a monocamada foi lavada gentilmente com PBS 1x. Então as células foram lisadas com o auxílio de *cell scraper* e tampão de lise contendo 1% de triton X-100 (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM cloreto de sódio; 10 mM pirofosfato de sódio; 20 mM fluoreto de sódio; 5 mM EDTA pH 8,0; 10 mM ortovanadato de sódio; 1 mM PMSF em isopropanol; 10 mM β -glicerofosfato; 10 μ M leupeptina; 1 μ M pepstatina; 4 mM benzamidina HCl hidratada; 2 μ g/mL aprotinina; 1% triton X-100; ddH₂O). As amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido para a finalização da lise celular, descongeladas em gelo e centrifugadas em centrífuga refrigerada à 4^o C a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado, aliqotado e congelado a -80^o C para usos futuros. A quantificação de proteínas totais foi obtida por reagente *Bradford* com curva

padrão para calibração de albumina sérica bovina (BSA) a 2 mg/mL em diluição seriada. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm em leitor de placas *EnSpire* (*PerkinElmer, US*).

Uma parte da amostra foi preparada em tampão *Laemmli* (Tris-HCl 0,25 mol/L; 2% SDS; 10% glicerol; 0,001% azul de bromofenol e 5% β -mercaptoetanol). Para a corrida eletroforética, foram utilizadas 20 μ g de proteínas totais, o restante foi armazenado sob a temperatura de -20° C. A corrida de SDS-PAGE foi realizada em gel contendo 2% de bis-acrilamida, corrido a 80 mV até a entrada no gel de separação e após a voltagem foi aumentada para 100 mV por aproximadamente 2h. Após, a transferência foi feita para membrana de nitrocelulose pelo sistema *Trans-Blot Turbo* (*Bio-Rad Laboratories, Inc., US*) alternando tecidos embebidos em tampão de transferência 1X (2,5 mM Tris base; 19,2 mM glicina). A corrida no *Trans-Blot turbo* foi feita por 7 min a 25 V.

Então, a membrana foi bloqueada com leite em pó com baixo teor de gorduras a 5% por 1h e lavada 3 vezes com tampão TBS-T (Tris 20 mM; NaCl 150 mM; 0,1% Tween 20) e incubada com os anticorpos primários *overnight* em câmara fria sob agitação constante. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: anti-TGIF1 (#ab220965, *Abcam, UK*, diluição 1:5000), anti-vinculina (#ab18058, *Abcam, UK*, diluição 1:20000), anti- β actina (#ab3280, *Abcam, UK*, diluição 1:1000) e anti-FLAG M2 (#F1804, *Sigma-Aldrich, US* diluição 1:20000). No dia seguinte, o excesso de anticorpos foi lavado 3 vezes com TBS-T. A contra-marcação foi feita com o anticorpo secundário da respectiva linhagem em que foi feita a produção do anticorpo primário, incubando a temperatura ambiente por 1h ou 2h. Novamente, a membrana foi lavada 3X com TBS-T e as bandas reveladas com luminol *SuperSignal™ West Pico PLUS* ou *SuperSignal™ West Femto* (*ThermoFischer Scientific, US*) dependendo da abundância da proteína de interesse. A membrana foi levada a um leitor de quimioluminescência *ImageQuant™ 500 LAS* (*GE HealthCare Technologies, Inc., US*) e exposição de 1 até 8 min para revelação.

3.11 Scratch assay

As SLN apresentaram um efeito colateral no que se refere a velocidade de migração de células de adenocarcinoma de próstata PC-3 (GARCIA-FOSSA; DE JESUS, 2024), dessa maneira, investigamos se o mesmo efeito seria observado em

células de câncer de mama. Para esse experimento, as células MCF-7 foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/mL em placa de 12 poços utilizando meio DMEM completo. Após a aderência das células por 24h, houve a privação de SFB por 24 h, a fim de estabilizar a taxa proliferativa. As células foram tratadas com 0,04 nM de SLN por 4 h e como controle, utilizamos SLN mais 0,1% de SFB para prevenção ao descolamento celular. Após o tratamento, o meio foi aspirado e a monocamada foi gentilmente lavada com PBS 1X. Um sulco foi criado com o auxílio de uma ponteira p200. As imagens foram adquiridas no leitor de detecção híbrido *Cytation 5 Hybrid Multidetecction Reader* (BioTek Instruments, Inc., US), utilizando objetiva 4x em contraste de fase, a cada 15 min durante 60 h em atmosfera úmida de 5% de CO₂ à 37°C. A análise da velocidade de migração das células foi calculada com o auxílio do software *PyScratch* (GARCIA-FOSSA; GAAL; DE JESUS, 2020).

3.12 Preparo de placas e cultivo celular de modelos esferoides

Modelos tridimensionais (3D) de cultivo celular têm sido amplamente investigados a fim de mimetizar o comportamento tumoral, onde há dificuldade de trocas gasosas e distribuição de nutrientes, trazendo um microambiente celular mais realista (HAN; KWON; KIM, 2021). Para impedir a adesão das células ao fundo da placa, utilizamos *poly (hydroxyethyl-methacrylate)* (*poly-HEMA – Sigma-Aldrich, US*). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para repelir as células da superfície plástica das placas de cultura (CHEN et al., 2015). Em ambiente estéril, preparamos uma solução em concentração de 12,5 mg/mL em etanol 95%, para isso, utilizamos etanol absoluto adicionando água deionizada estéril em quantidade suficiente para atingir o grau de etanol 95%. O tubo cônico foi vedado com parafilme para evitar a evaporação e a suspensão permaneceu sob agitação constante em agitador multifuncional *overnight* a 37°C para dissolver o polímero completamente (NASR et al., 2019).

Em ambiente estéril, utilizamos placas de fundo “U” contendo 96 poços, sem nenhum tipo de tratamento para aderência/suspensão. Para o revestimento, adicionamos 21 µL de solução de *poly-HEMA* em cada poço, após as placas foram embrulhadas em papel alumínio e mantidas a 37° C para evaporação completa do etanol por pelo menos 72h.

A produção dos modelos esferoides foi iniciado com as células MCF-7 em monocamada que foram descoladas por tripsinização. A formação dos esferoides ocorreu por agregação celular espontânea e foi padronizado utilizando uma escala de número de células, onde adicionamos aproximadamente 500; 750; 1.000; 5.000; 10.000 e 15.000 células por poço em triplicatas. A formação dos esferoides foi acompanhada no decorrer de 7 dias. A cada 48h, o meio de cultura foi aspirado e um meio novo foi adicionado. As imagens foram adquiridas logo após as primeiras 24h de cultivo em microscópio *EVOS XL Core Cell Imaging System (Thermo-Fischer Scientific, US)*.

3.13 Descarte de amostras contendo SLN e possíveis impactos ambientais

As amostras utilizadas para medidas de caracterização foram descartadas após adição de detergente extran 5% ou detergente comum por pelo menos 1h. Quando em cultura celular, o meio das células é aspirado e armazenado em *Kitasato* contendo 20 mL de hipoclorito de sódio. Todo o resíduo gerado dentro laboratório de cultivo celular de células de mamíferos e insetos (LCCMI – LNBio) é autoclavado antes de ser coletado e descartado, portanto, a estrutura lipídica residual é destruída.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A entrega eficiente de ácidos nucleicos para fins terapêuticos representa um dos maiores desafios na terapia gênica. Apesar do potencial uso de nanopartículas para esse fim, a produção da SLN aqui proposta enfrenta desafios significativos que podem limitar sua aplicação. A fabricação de SLN requer o equilíbrio entre eficiência de encapsulamento, estabilidade estrutural, biocompatibilidade e especialmente a entrega dos ácidos nucleicos para as células de interesse. Inicialmente, propomos o uso de SLN para entrega da maquinaria CRISPR/Cas9 e desenvolvemos dois plasmídeos contendo as sequências distintas de sgRNA para o gene TGIF1. A fim de avaliar o potencial de transfecção, utilizamos também um plasmídeo para expressão de molécula fluorescente mKO2, os resultados obtidos bem como as discussões são descritos a seguir.

4.1 Caracterização físico-química e potencial de carregamento de SLN

As SLN foram produzidas pela técnica de microextrusão desenvolvida pelo professor Dr. Marcelo Bispo de Jesus e colaboradores (DE JESUS et al., 2013). Essa técnica é simples, rápida, acessível e facilmente reproduzível. As análises das nanopartículas vazias e carregadas com os plasmídeos são apresentadas na Figura 8 e mostraram um diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 107,9 nm e houve aumento do diâmetro com a adição dos plasmídeos em ambos os meios de diluição (Figura 8A). Um efeito mais dramático foi observado nas SLN conjugadas com DNA e medidas em RPMI1640, o meio foi utilizado para entender o comportamento das SLN ao entrar em contato com a solução que irá interagir durante o processo de transfecção. Os meios de cultivo celular são ricos em aminoácidos, glicose, sais minerais e tampões para manutenção de pH (DARAMY et al., 2024). Todos esses componentes tem potencial para formação de interações moleculares, formando uma coroa ao redor da SLN, esse fenômeno é conhecido como proteína coroa e tem sido amplamente estudado para compreender a interação nanopartícula-célula (BILARDO et al., 2022; DARAMY et al., 2024; MISHRA et al., 2021).

Foi observado que o PDI médio da SLN foi de 0,054 SLN e 0,315 para a SLN TGIF1_1 e 0,453 SLN TGIF1_2 (Figura 8B). A média do potencial ζ hidrodinâmico foi de +47,6 mV para a SLN e quando os ácidos nucleicos foram adicionados, houve uma inversão de cargas, que passou a aproximadamente -30 mV (Figura 8C). Caracterizações físico-químicas semelhantes foram descritas em formulações de SLN, demonstrando que DOTAP (GÓMEZ-AGUADO et al., 2020) e ácido esteárico (FÀBREGAS et al., 2014) são bons agentes catiônicos para a produção de nanopartícula para aplicações em sistemas biológicos.

A Figura 9 demonstra os gráficos de distribuição representativos de cada uma das medidas analisadas pelo *Zetasizer (Malvern Panalytical, UK)*. A SLN sem adição de DNA apresenta-se monodispersa, ou seja, possuem tamanho e formato semelhantes, enquanto a adição de pDNAs apresenta distribuição polidispersa, evidenciando a complexação com pDNA. As distribuições de diferentes perfis de NP são relevantes para estudos em biociências, pois diferentes tamanhos de partículas, bem como seu formato e potencial ζ afetam suas interações com as células e até mesmo nas vias de internalização e mecanismos de citotoxicidade (SALATIN; MALEKI DIZAJ; YARI KHOSROUSHAHI, 2015). Em conjunto, esses dados mostram

que as SLN podem apresentar diferentes tamanhos hidrodinâmicos quando em contato com pDNA e quando analisado por microscopia eletrônica de transmissão, como ilustra a figura 8 D, parece haver um espessamento na superfície de SLNplex.

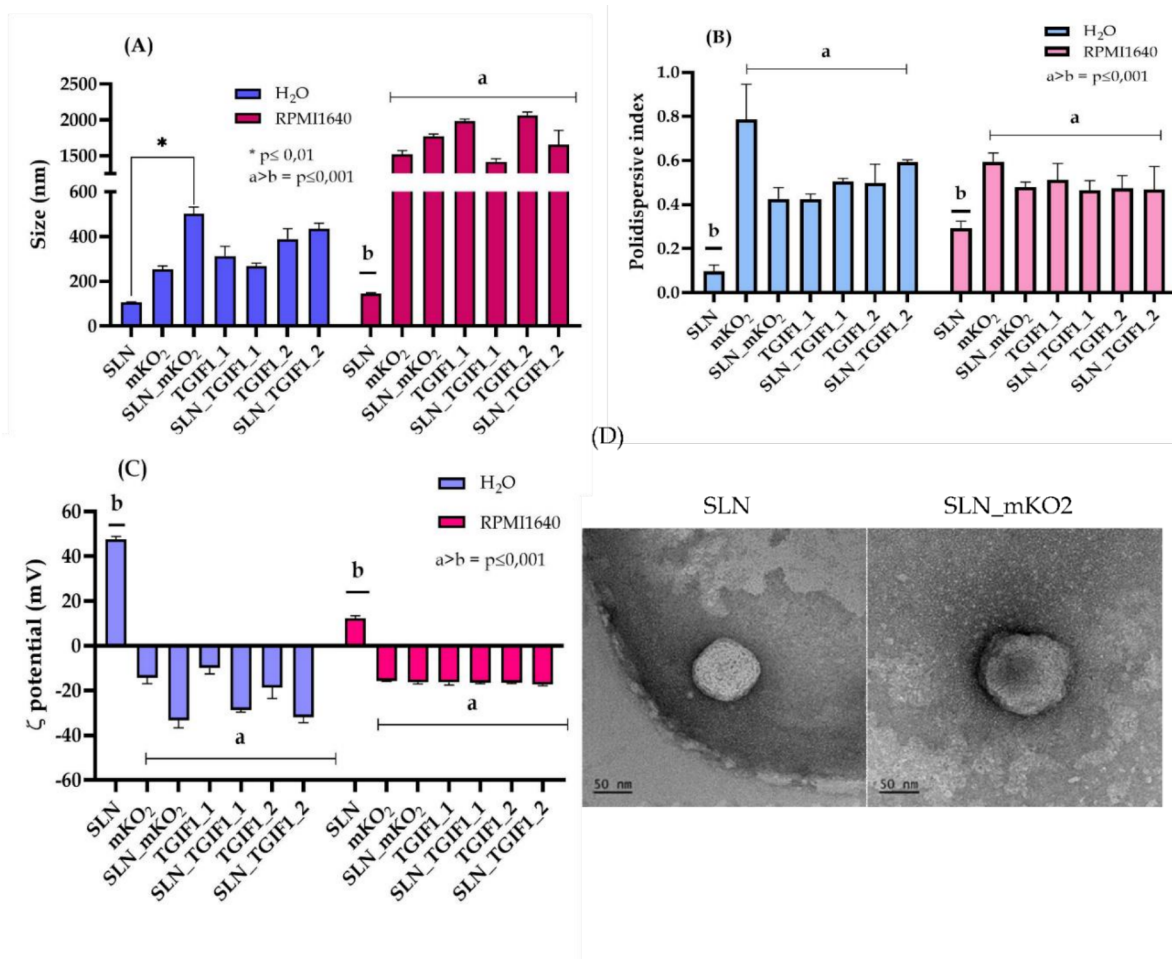


Figura 8. Caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas.

As SLN vazias (SLN), SLN complexadas com plasmídeo mKO2 (SLN_mKO2), TGIF1_1 (SLN_TGIF1_1) e TGIF1_2 (SLN_TGIF1_2) bem como os plasmídeos livres. As medidas foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética em meio líquido (água deionizada e meio de cultura celular RPMI1640). O tamanho hidrodinâmico de SLN, SLN_TGIF1_1 e SLN_TGIF1_2 é mostrado em (A.); índice de polidispersão em (B.) e potencial ζ em (C.). Cada valor representa a média $\pm$ DP ($n=3$). As medidas foram realizadas através do sistema *Malvern Zetasizer NanoZS 90* (Malvern Panalytical, UK), a 25 ° C em cubetas de poliestireno com 10 mm de espessura. (D) morfologia de SLN por microscopia eletrônica de transmissão, mostrando SLN e SLN carregada com o pcDNA mKO2. Barra de escala 50 nm.

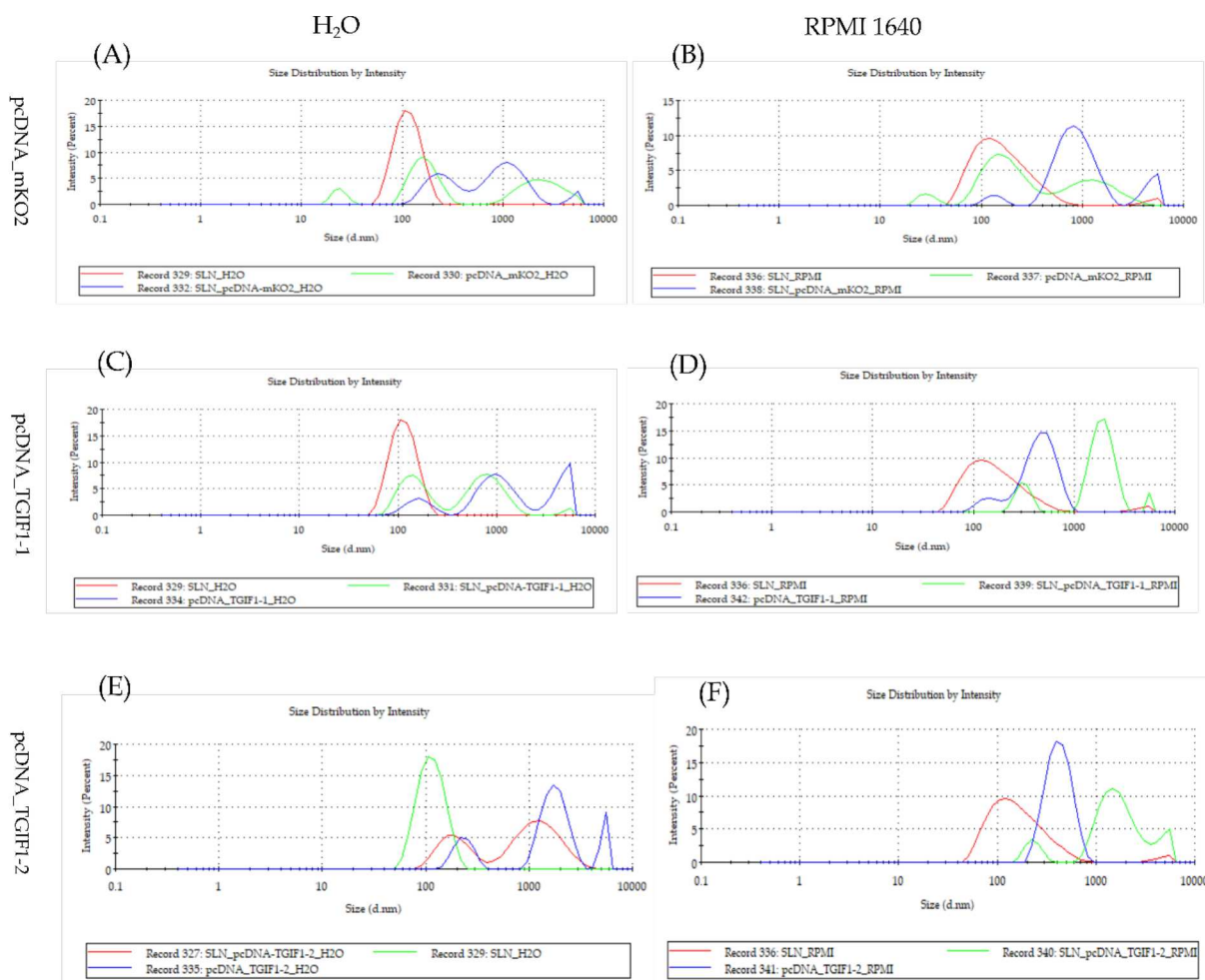


Figura 9. Imagens representativas da distribuição das medidas das SLN, pDNA e SLNplexos.

Os parâmetros foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico para a análise do diâmetro em meio líquido (água deionizada apresentado no conjunto de imagens à esquerda e meio de cultura celular RPMI1640 à direita), em que (A) e (B) representam a SLN vazia; pDNA_mKO2 e SLNplex mKO2; (C) e (D) SLN vazia, pDNA_TGIF1-1 e SLNplex TGIF1-1; (E) e (F) SLN vazia, pDNA_TGIF1-2 e SLNplex TGIF1-2. Os gráficos mostram a distribuição de populações de nanopartículas que podem apresentar diferentes perfis. Os gráficos foram adquiridos através do sistema *Malvern Zetasizer NanoZS 90* (*Malvern Panalytical, UK*) a 25 °C em cubetas de poliestireno com 10 mm de espessura.

4.2 As nanopartículas são capazes ligar o DNA e proteger da degradação enzimática

Com objetivo de avaliar a viabilidade do uso de SLN para veicular ácidos nucleicos, construímos vetores plasmidiais para expressão do sistema CRISPR/Cas9. Dessa forma, as SLN poderão veicular sgRNA e a enzima Cas9, a fim de fazer o *knockout* de genes alvo em células tumorais. Para isso, efetuamos a clonagem do plasmídeo pX459 contendo o sgRNA para a proteínas TGIF1. A eficácia de carregamento (Figura 10) e de proteção do DNA (Figura 11) foram investigadas, visto

que o plasmídeo possui mais de nove mil pares de base e pode apresentar um desafio na interação e preservação da integridade do DNA pelas SLN.

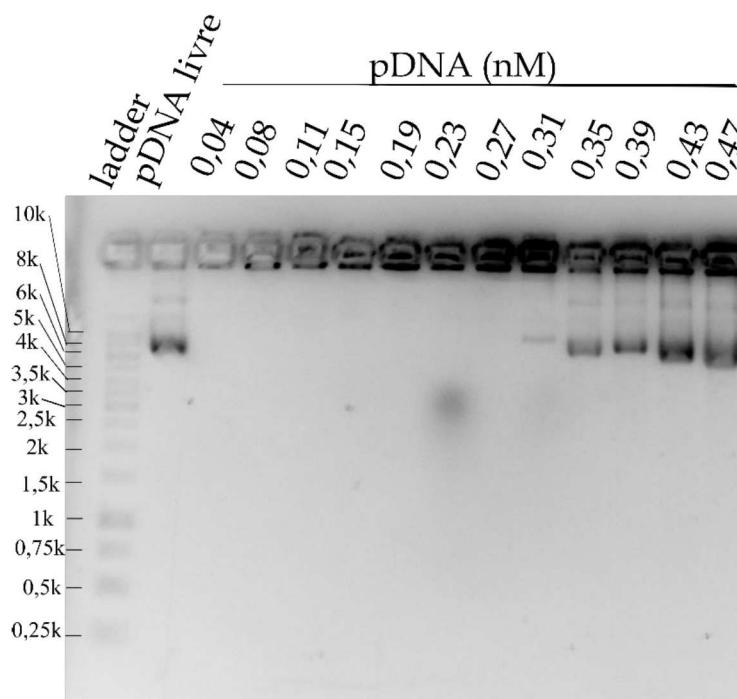


Figura 10. Retardo da migração de DNA para avaliação do carregamento de pDNA por SLN.

A ligação de moléculas de DNA altera sua carga, conformação e peso molecular, retardando sua migração durante a eletroforese em gel de agarose. Os SLNplexos foram preparados com concentração molar fixa de SLN (0,04 nM) e variação de pDNA (0,04 a 0,47 nM) e analisadas por eletroforese. As imagens foram obtidas através de transiluminador UV com o *software Carestream* (Onex Corporation, Canada).

O carregamento de DNA plasmidial foi avaliado após a incubação dos SLNplexos (0,04 nM de SLN) com diferentes proporções de pDNA e as amostras foram carregadas em gel de agarose para corrida eletroforética. Nesse ensaio, observamos o retardamento do deslocamento das bandas de pDNA, que ficaram retidas no poço devido ao tamanho dos SLNplexos. Entretanto, a partir de 0,31 nM, observou-se o deslocamento das bandas de DNA e isso indica que as SLN atingiram seu máximo de incorporação por volta de 0,27 nM de pDNA, como ilustrado na figura 10. Apesar de apresentar lipídios semelhantes, cada formulação de SLN apresenta diferentes potenciais de ligação com os ácidos nucleicos. SLN contendo ácido esteárico apresentaram uma capacidade de carregamento de 200:1 (SLN:DNA) (FÀBREGAS *et al.*, 2014), enquanto SLN contendo DOTAP tiveram uma proporção de 5:1 (SLN:DNA) (GÓMEZ-AGUADO *et al.*, 2020), enquanto a SLN aqui produzida

teve uma taxa de carregamento de aproximadamente 1:7 (SLN:DNA). Em outro ensaio, os autores verificaram que lipossomos que contém DOTAP em sua composição, tiveram maior habilidade em carregar DNA (PATRI *et al.*, 2024), esses dados em conjunto indicam a eficiência da união de DOTAP e ácido esteárico em uma única formulação promove maior capacidade de ligação com o DNA plasmidial.

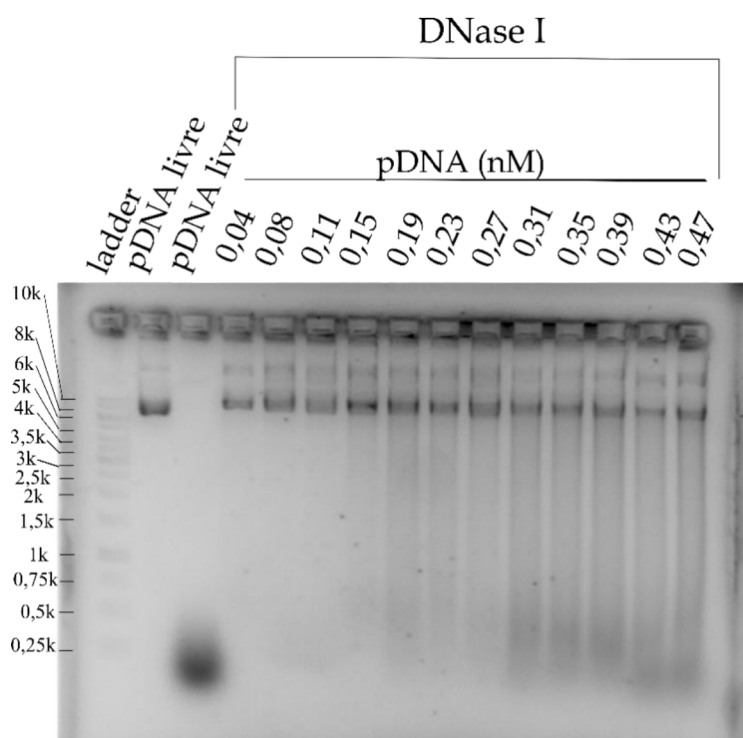


Figura 11. Ensaio de proteção de SLNplex da degradação enzimática por DNase I.

A estabilidade do DNA foi avaliada quanto atividade de nucleases, para investigar a eficácia do sistema de entrega de DNA por SLN. Os SLNplexos foram preparados com concentração molar fixa de SLN (0,04 nM) e variação de pDNA (0,04 a 0,47 nM), tratados com DNase I para avaliação da estabilidade e analisadas por eletroforese. As imagens foram obtidas através de transiluminador UV com o *software Carestream (Onex Corporation, Canada)*.

A proteção do pDNA foi avaliada através do ensaio de degradação de DNA por DNase I. Após a incubação formação dos SLNplexos com diferentes proporções de pDNA, as amostras foram carregadas em gel de agarose para corrida eletroforética. Dessa maneira, observamos a atividade protetiva da formação dos SLNplexos em comparação ao pDNA na forma livre tratado e não tratado com DNase I. Os SLNplexos promoveram atividade protetiva parcial em todas as proporções testadas. Utilizamos SDS 1% para soltar o pDNA do SLNplexo, dessa forma, apresentarmos uma banda íntegra que permaneceu protegida enquanto ligada ao

SLNplexo. Um arraste característico da degradação enzimática por DNase I foi observado a partir 0,15 nM, como ilustra a Figura 11. Isso indica que a residual de DNA ou pontas mais distantes do SLNplexo foram degradadas. Ensaios semelhantes com SLN formuladas a partir de DOTAP também demonstraram a proteção do DNA plasmidial frente ao tratamento com DNase I (GÓMEZ-AGUADO *et al.*, 2020).

4.3 Propriedades funcionais de SLN para entrega de ácidos nucleicos para cultura de células

Para os ensaios biológicos, utilizamos as linhagens tumorais PC-3 (Figura 12), pois foi demonstrado que as SLN possuem influência na velocidade de migração (GARCIA-FOSSA; DE JESUS, 2024) e MCF-7 (Figura 13) como modelo de tumores mamários e de fácil formação de esferoides. As células foram então transfectadas usando SLNplexos em diferentes proporções molares de pDNA-mKO2 e SLN. Como resultado, obtivemos a razão de 0,8 nM de SLN para 2,8 nM de pDNA com a melhor eficiência de transfecção, como demonstrado em ambas figuras. Os cálculos de molaridade de SLN foram baseados na quantidade total de lipídios presentes na produção, considerando um rendimento de 100% da reação. Já os cálculos de pDNA foram baseados no tamanho do plasmídeo em pares de base. A eficiência absoluta foi calculada utilizando a porcentagem de células que apresentaram fluorescência de mKO2 dentro do número total e células quantificado, enquanto que para o cálculo de eficiência relativa, os dados foram normalizados para o controle LF2K.

Na linhagem prostática, a eficiência absoluta de transfecção chegou a 26,6% (Figura 12A) e a eficiência relativa 56,7% (Figura 12B), houve um aumento da porcentagem de transfecção dose-dependente, entretanto, na maior concentração, observamos uma leve diminuição de eficiência, esse efeito foi visível nas imagens representativas de cada tratamento sobre células PC-3 (Figura 12C). Já na linhagem de mama MCF-7, não houve diferença significativa entre os grupos. A eficiência total ficou em torno de 19% (Figura 13A), enquanto a relativa máxima foi de 34,5% (Figura 13B). As imagens representativas de cada tratamento sobre MCF-7 encontram-se na figura 13C, onde observamos que o número de células expressando mKO2 não variou de forma significativa.

PC-3

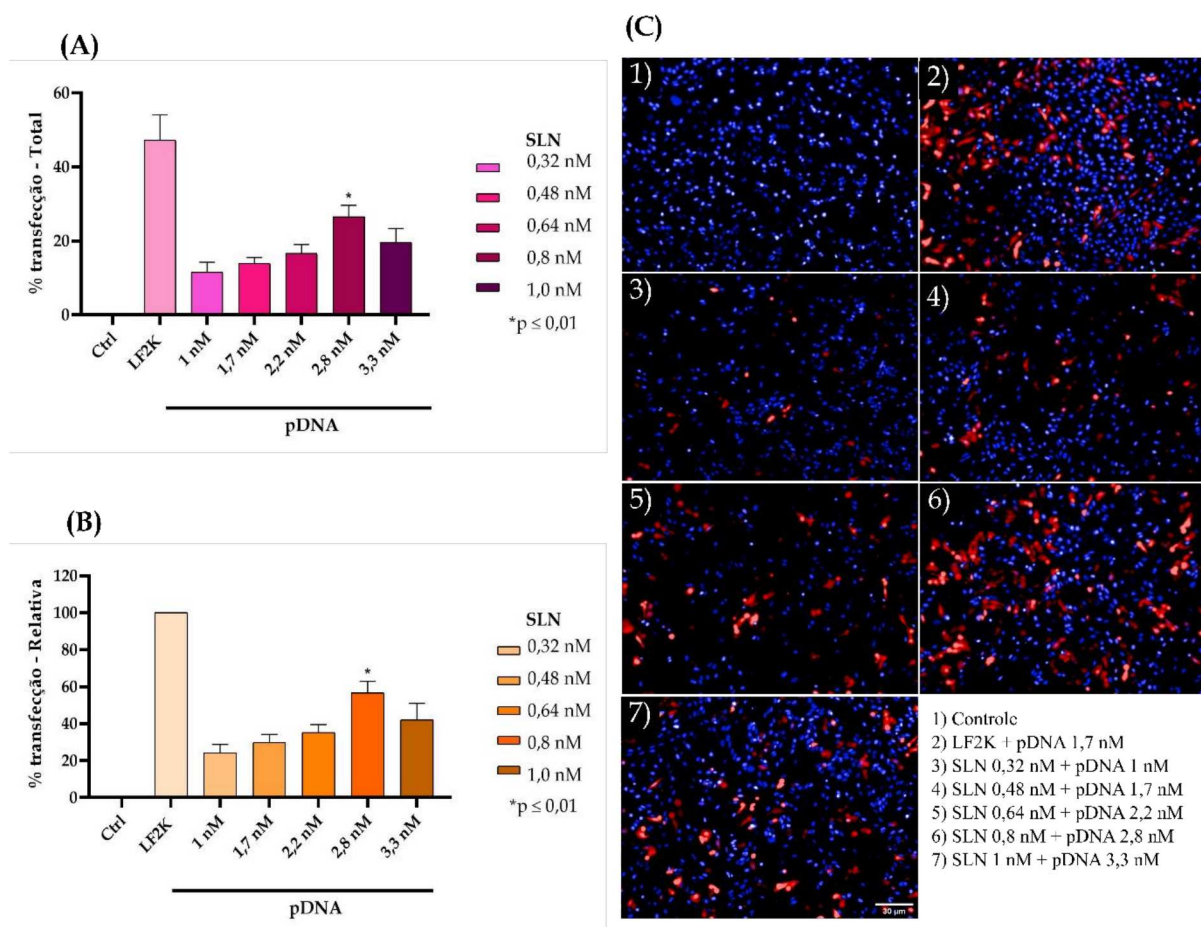


Figura 12. Eficácia de entrega de pDNA por SLN em células de câncer de próstata PC-3.

A transfecção de plasmídeos carregados por SLN em células PC-3 foi avaliada após 24h de incubação. Os gráficos demonstram a transfecção total (A) e relativa (B) considerando LF2K como 100% eficiente. As imagens foram adquiridas na plataforma de microscopia com aquisição automatizada de imagens fluorescentes *Operetta® CLS™ high throughput microplate imager for high-content analysis* (Perkin Elmer, US). A taxa de transfecção foi avaliada por fluorescência de pDNA contendo uma sequência para expressão de mKO2. Utilizamos diferentes concentrações pDNA e SLN. Os ensaios foram realizados em triplicata com $n=4$. As imagens representativas de cada tratamento (C) foram analisadas no software *Columbus™ Image Data Storage and Analysis System* (Perkin Elmer, US), barra de escala 30 μm . *One-way ANOVA* com *post-test* de *Tukey* foi utilizado para a análise estatística utilizando o software *GraphPad Prism v. 8.0*.

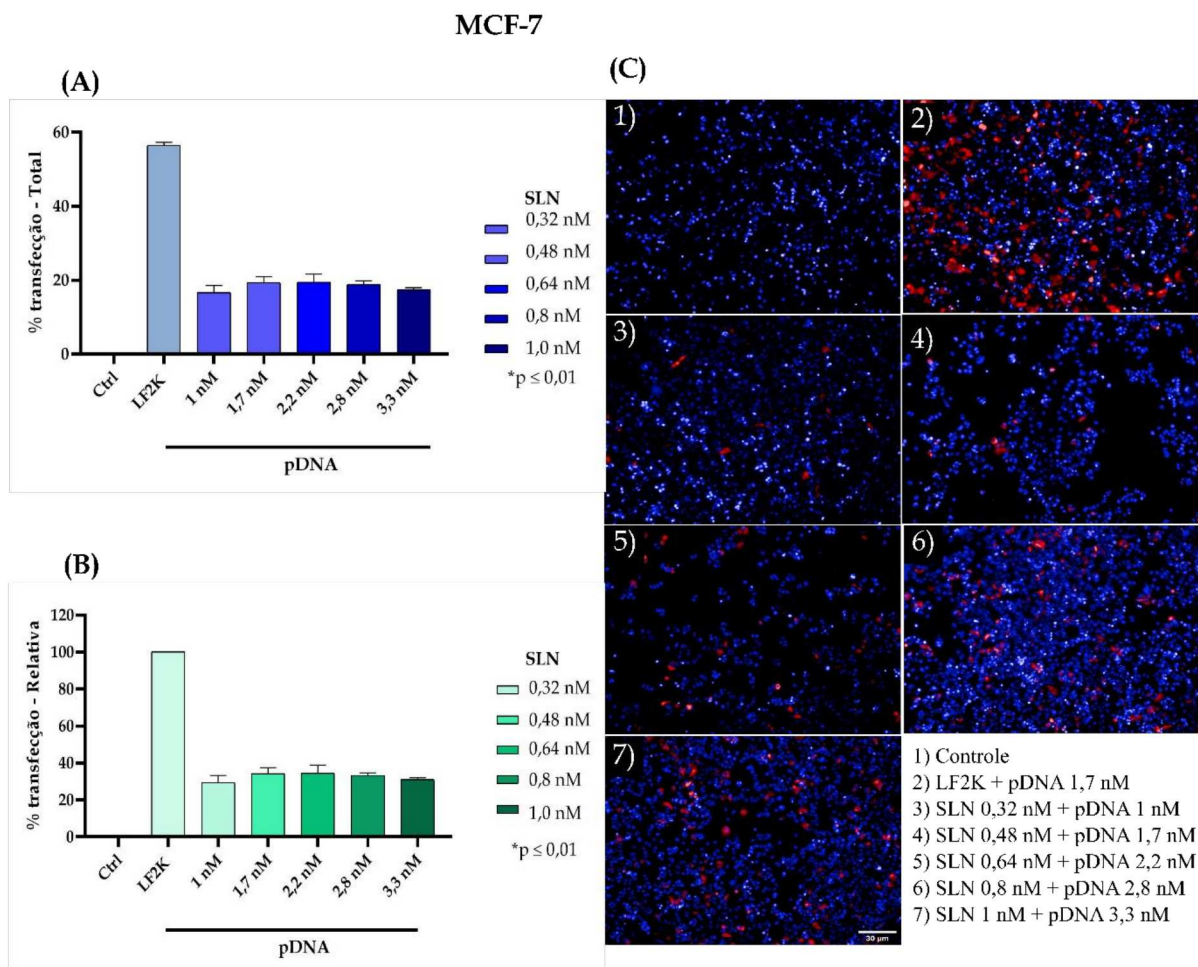


Figura 13. Eficácia de entrega de pDNA por SLN em células de câncer de mama MCF-7.

A transfecção de plasmídeos carregados por SLN em células MCF-7 foi avaliada após 24h de incubação. Os gráficos demonstram a transfecção total **(A)** e relativa **(B)** considerando LF2K como 100% eficiente. As imagens foram adquiridas na plataforma de microscopia com aquisição automatizada de imagens fluorescentes *Operetta® CLS™ high throughput microplate imager for high-content analysis* (Perkin Elmer, US). A taxa de transfecção foi avaliada por fluorescência de pDNA contendo uma sequência para expressão de mKO2. Utilizamos diferentes concentrações pDNA e SLN. Os ensaios foram realizados em triplicata com $n=4$. As imagens representativas de cada tratamento **(C)** foram analisadas no software *Columbus™ Image Data Storage and Analysis System* (Perkin Elmer, US), barra de escala 30 μm . *One-way ANOVA* com *post-test* de *Tukey* foi utilizado para a análise estatística utilizando o software *GraphPad Prism v. 8.0*.

Para avaliar se a diminuição na eficiência de transfecção seria devido à alta concentração de SLN e uma possível citotoxicidade, utilizamos o software *Columbus* (Perkin Elmer, US) para contagem de núcleos celulares corados com a sonda fluorescente DAPI. Surpreendentemente, observamos um aumento no número de núcleos, especialmente na linhagem de mama MCF-7 (Figura 14B). O efeito

proliferativo foi dose-dependente de SLN, chegando a ser 2,5 vezes maior que o controle sem exposição aos SLNplexos. Já a linhagem PC-3 teve aumento proliferativo discreto como demonstra a Figura 14A.

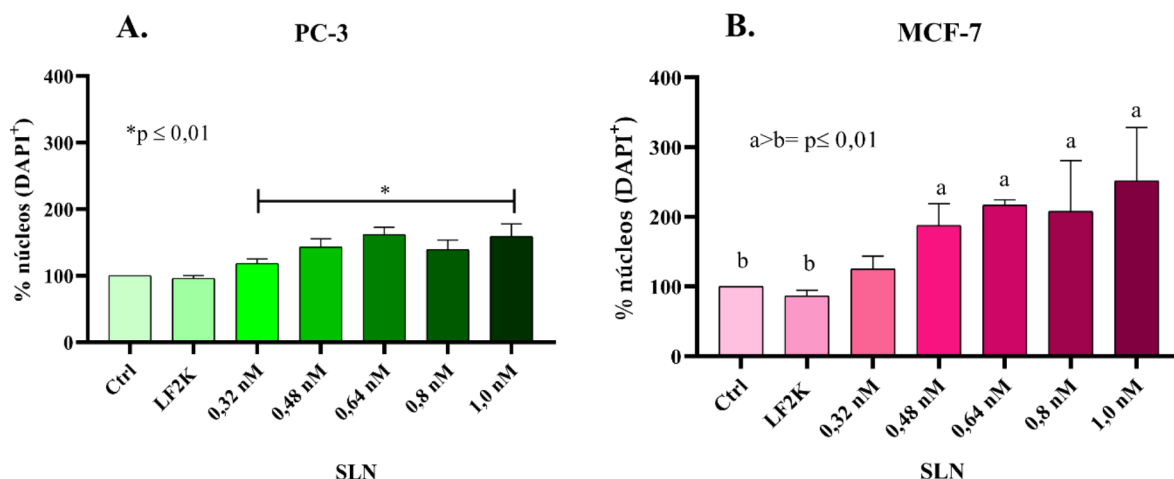


Figura 14. Contagem de núcleos marcados com DAPI+ para avaliação de citotoxicidade.

As células PC-3 (A) e MCF-7 (B) foram tratadas com SLN e avaliadas após 24h de incubação. Os gráficos demonstram a porcentagem de núcleos DAPI⁺ em relação ao controle não tratado. As imagens foram adquiridas em leitor de fluorescência *Operetta® CLS™ high throughput microplate imager for high-content analysis* (Perkin Elmer, US). Os ensaios foram realizados em triplicata com n=4. As imagens foram analisadas no *software Columbus™ Image Data Storage and Analysis System* (Perkin Elmer, US). *One-way ANOVA* com *post-test* de *Tukey* foi utilizado para a análise estatística utilizando o *software GraphPad Prism v. 8.0*.

A migração celular é crucial para o espalhamento de células metastáticas, recentemente dados da literatura demonstraram que as SLN são capazes de alterar a velocidade de migração de células cancerígenas prostáticas (GARCIA-FOSSA; DE JESUS, 2024). Assim, foi investigada se a motilidade celular seria afetada como efeito colateral da SLN em células MCF-7. Para isso, a linhagem MCF-7 foi tratada com 0,04 nM de SLN e utilizamos também 0,1% de SFB para prevenir descolamento celular. As imagens foram adquiridas a cada 15 min por aproximadamente 60h.

A velocidade de migração (Figura 15A) foi calculada a partir da relação entre os valores de área (eixo y) e o tempo em minutos (eixo x), utilizando a fórmula: inclinação da curva / 2x o comprimento da imagem em pixels. O resultado, inicialmente obtido em pixels/min, foi convertido para $\mu\text{m}/\text{min}$ com base no fator de conversão da objetiva utilizada para capturar as imagens ($1,6 \mu\text{m}/\text{pixel}$) (GARCIA-FOSSA; GAAL;

DE JESUS, 2020). Por sua vez, a Figura 15B apresenta a migração após 24 e 48 horas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com SLN. Recentemente foi demonstrado que essa formulação de SLN possui atividade na migração em linhagem de adenocarcinoma prostático PC-3, entretanto o mesmo efeito não foi observado em células de próstata não tumorais (PNT1A). Houve aumento da expressão de vimentina e foi observado que o fator de transcrição ZEB1 (*Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1*) foi translocado para o núcleo das células. A vimentina e ZEB1 exercem funções na remodelação do citoesqueleto celular e propiciam a EMT, afetando a migração, entretanto, os autores não identificaram aumento de proliferação (GARCIA-FOSSA; DE JESUS, 2024), especulando-se que os efeitos adversos observados sejam célula-dependente.

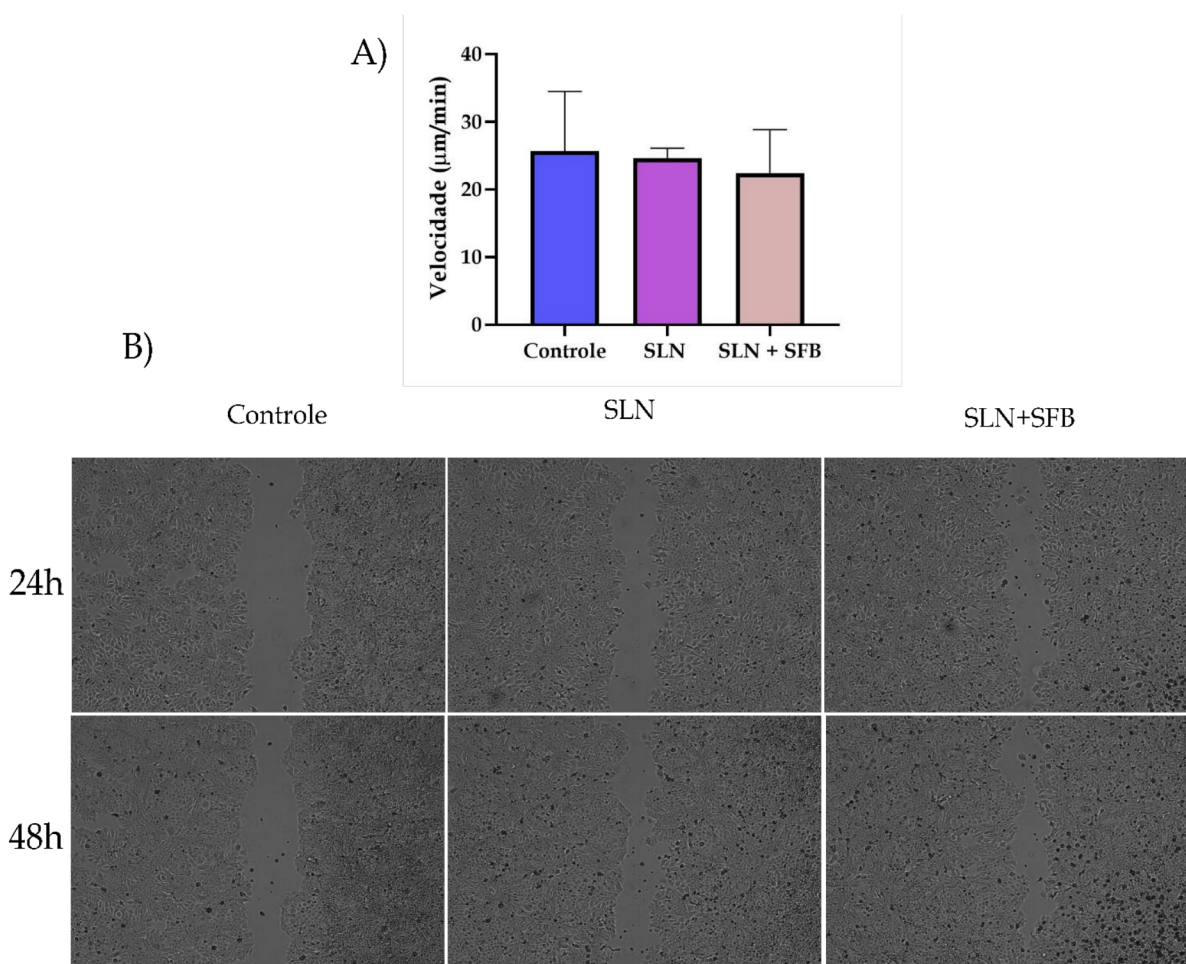


Figura 15. Avaliação da migração em células tratadas com SLN por *scratch assay*.

A migração celular foi monitorada ao longo do tempo, observando como as células MCF-7 migram nas bordas do sulco para preencher o espaço vazio após o tratamento com SLN. As imagens foram adquiridas em contraste de fase na presença de 5% CO₂ a cada 15 min em leitor de multidetecção *Cytation 5* (Biotek instruments, US) em aumento de 4x, por aproximadamente 60h. As imagens foram

analisadas pelo *software PyScratch* afim de avaliar a velocidade de migração e *One-way ANOVA* com *post-test de Tukey* foi utilizado para a análise estatística utilizando o *software GraphPad Prism v. 8.0*.

Ainda no intuito de verificar se SLN tem capacidade de realizar a entrega de ácidos nucleicos, verificamos a expressão de Cas9 na linhagem HEK293T. As células foram transfectadas utilizando SLN ou LF2K com plasmídeo contendo sgRNA para TGIF1_1 e TGIF1_2. Um plasmídeo de glutaminase C (GAC) expressando eGFP foi utilizado como controle de transfecção para observar o momento em que as células iniciaram a expressão da sequência contida no pDNA, os dados são mostrados na figura 16. Como esperado, não houve expressão de Cas9 no controle GAC. A vinculina foi utilizada como controle endógeno. O plasmídeo px459 possui a *tag* FLAG ligada a sequência de Cas9, possibilitando a identificação da proteína com um anticorpo anti-FLAG. Nossos dados demonstraram que a expressão de Cas9 foi induzida em todos os tratamentos com SLN e LF2K, com exceção de GAC, que não possui Cas9-FLAG (Figura 16), esse ensaio foi realizado sem a seleção de clones, sendo um *pool* de células transfectadas.

O próximo passo planejado foi a seleção de clones para sequenciamento e confirmação do *knockout* do gene TGIF1. O plasmídeo PX459 possui um cassete de resistência à puromicina, entretanto, ao adicionar o antibiótico para seleção, constatamos a morte celular massiva, não restando células viáveis para seguir com a expansão clonal. Por esse motivo, verificou-se a expressão proteica de TGIF1 nas células totais, sem seleção por antibiótico, utilizando o anticorpo anti-TGIF1 para avaliar o *knockout* da proteína. Observou-se diminuição no nível proteico de TGIF1 utilizando o sgRNA para TGIF1_1, entretanto esse dado pode gerar dúvidas se realmente houve o *knockout* pela impossibilidade de seleção dos clones.

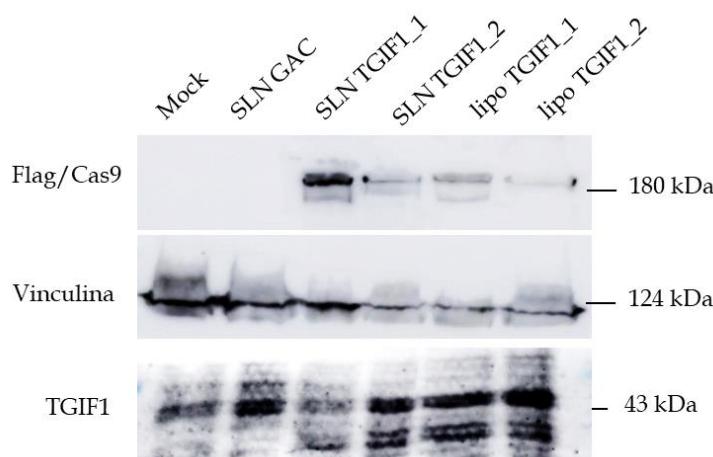


Figura 16. Níveis de expressão de TGIF1 em células HEK293T editadas por CRISPR/Cas9.

Os níveis da proteína TGIF1 foram avaliados na linhagem HEK293T por meio de *Western blot*. As células foram transfectadas com plasmídeo contendo sgRNA para TGIF1_1 e TGIF1_2, utilizando SLN ou Lipofectamina como veículos de entrega. Um plasmídeo expressando GAC-eGFP foi incluído como controle de transfecção, enquanto a vinculina foi utilizada como controle endógeno.

Interessados em determinar o modelo mais adequado para os estudos de *knockdown* de TGIF1, foram avaliadas treze linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo quanto à expressão de TGIF1. Os lisados celulares, fornecidos pela Dra. Marília Meira Dias, foram analisados por *Western blot*, permitindo identificar variações na expressão de TGIF1 entre as linhagens. Os resultados são apresentados na Figura 17, indicando maiores níveis de TGIF1 nas linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-157. Algumas linhagens celulares apresentam banda dupla de TGIF1 no SDS-PAGE, sendo que a banda de migração mais lenta corresponde à forma fosforilada do TGIF1 e foi descoberto que níveis mais altos de TGIF1 fosforilado está correlacionado a um aumento dos níveis de expressão de *Twist1*, um fator de transcrição também presente na EMT e atua regulando a supressão de genes envolvidos na adesão celular e remodelação do citoesqueleto, promovendo um fenótipo de desdiferenciação, ou seja, com características mesenquimais, importante na progressão tumoral e formação de metástases (PARAJULI *et al.*, 2019; RAZZAQUE; ATFI, 2020). Das treze linhagens avaliadas, seis apresentaram bandas fosforiladas: HCC1143, HCC70, HCC1806, BT-549, Hs578T e MDA-MB-157, esses resultados destacam a relevância investigação do papel funcional do TGIF1 para carcinogênese.

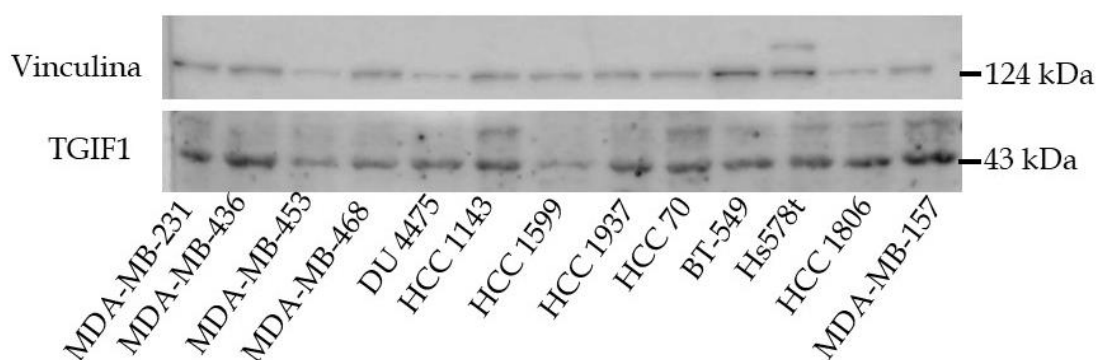


Figura 17. Análise dos níveis de expressão de TGIF1 em linhagens celulares TNBC

A análise de proteínas por *Western blot* foi utilizada para avaliar a expressão de TGIF1 em linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose. A detecção da proteína TGIF1 foi realizada utilizando anticorpos anti-TGIF1, enquanto a vinculina foi empregada como controle endógeno.

Por fim, com o intuito de estabelecer modelos esferoides, foram produzidos cultivos celulares 3D para compreender a organização celular e assim mimetizar condições mais próximas da realidade. Esses modelos são bastante utilizados para melhorar a representação de condições fisiológicas, como as encontradas no microambiente tumoral. Inicialmente, as SLN seriam testadas para avaliar a capacidade de entrega em modelos esferoides e as padronizações ocorreram em paralelo com os demais ensaios de transfecção em monocamada.

Para a produção de esferoides, foi utilizada a linhagem MCF-7, por se tratar de um modelo de mama, podem ser chamadas de mamoesferas. As mamoesferas foram produzidos utilizando o tratamento da superfície com polímero que repele e impede a adesão celular e mantendo-as em suspensão, o que possibilita a formação de agregados celulares. Utilizamos diferentes quantidades de células – de 500 a 15000, para avaliar a formação dessas mamoesferas e acompanhamos o seu desenvolvimento ao longo de 7 dias.

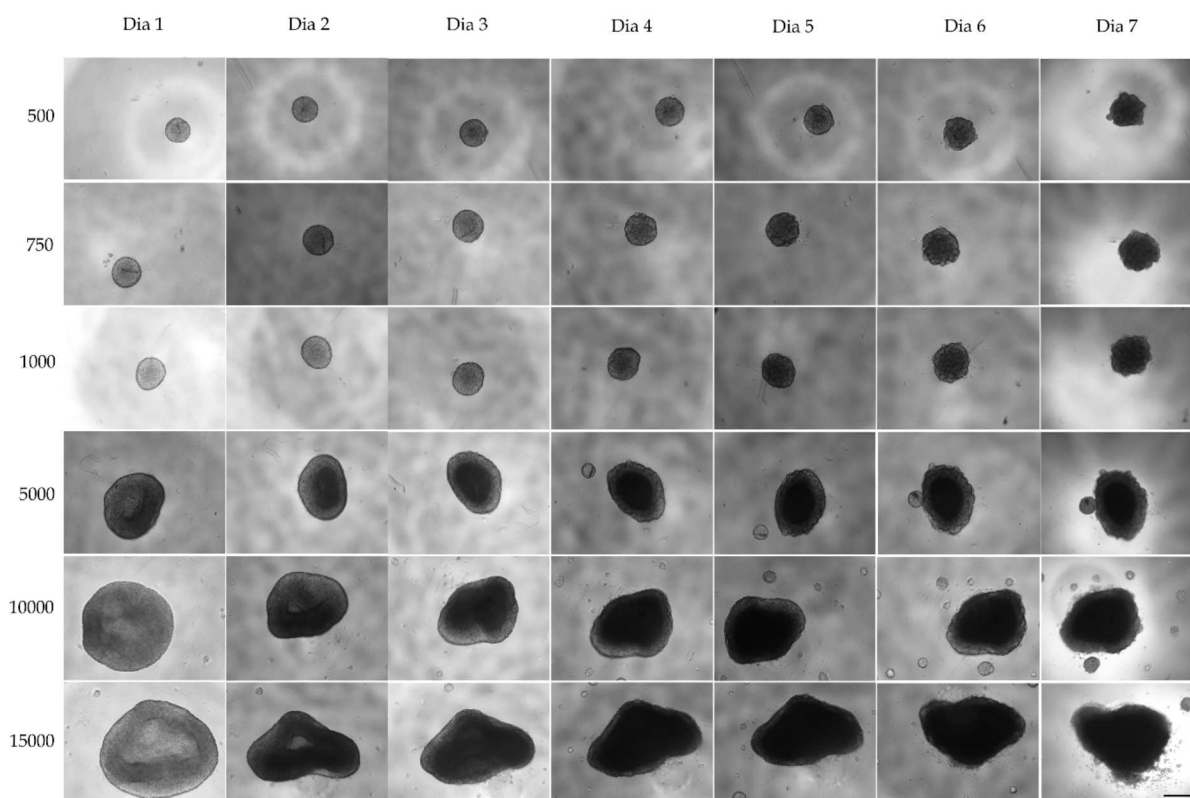


Figura 18. Formação de esferoides derivados da linhagem de câncer de mama MCF-7.

Modelos tridimensionais imitam melhor o TME, bem como as interações célula-célula permitindo uma análise mais precisa. Foram desenvolvidas mamoesferas a partir da prevenção da aderência celular utilizando placas com fundo arredondado revestidas com *poly-HEMA*. Essa abordagem foi adotada para permitir a análise do crescimento celular em condições de suspensão. Diferentes quantidades de células (500 a 15000 por poço) foram acompanhadas ao longo de 7 dias. As imagens foram adquiridas em magnitude de 4 X em microscópio óptico. Barra de escala: 500 μ m.

Esses modelos permitem avaliar as trocas gasosas e a distribuição de nutrientes desiguais na extensão dos esferoides, visto que as células que estão na periferia recebem maior quantidade de nutrientes. Além disso, há a formação de um núcleo necrótico, pois há uma grande dificuldade dessas células das camadas mais internas em receber oxigênio e nutrientes e também eliminar CO_2 e excretar metabólitos (HAN; KWON; KIM, 2021). Essas características ficam bem evidentes quando observamos a formação das mamoesferas no decorrer dos 7 dias em que foram avaliados (Figura 18). Mesmo os tamanhos menores, como 500 a 1000 células, apresentam a formação de núcleo enegrecido, no entanto, fica mais evidente quando utilizamos 5000 células. Ademais, quando há um aumento massivo do número de células, observa-se que há um afrouxamento das camadas mais externas, levando as células a se desprenderem da formação inicial dos esferoides. Os ensaios de

transfecção nas mamoesferas não foi testado devido à baixa eficiência de transfecção obtida em monocamada.

5. CONCLUSÕES

A nanopartícula lipídica sólida avaliada apresentou resultados promissores em termos de eficiência de ligação com o DNA plasmidial e proteção contra a degradação por endonuclease, demonstrando potencial como vetor para terapias gênicas. No entanto, foi constatado que as SLN não proporcionam uma alta taxa de transfecção em culturas celulares em monocamada, evidenciando limitações em seu desempenho *in vitro*. Além disso, os testes revelaram que o aumento da concentração de SLN está correlacionado o aumento no número de células, sugerindo um impacto direto no crescimento celular. Esse achado levanta preocupações quanto aos possíveis efeitos indesejáveis dessa nanoestrutura no contexto do câncer de mama, especialmente considerando o objetivo de desenvolver novas abordagens terapêuticas.

Dado o microambiente tumoral complexo característico do câncer de mama, o presente estudo propôs a realização de transfecções em culturas tridimensionais. Essa abordagem mimetiza melhor as condições *in vivo*, mas também apresenta desafios adicionais, como a heterogeneidade celular, a barreira física imposta pela matriz extracelular e a distribuição desigual das nanopartículas. Como a taxa de transfecção em monocamada foi baixa, os ensaios em esferoides tornaram-se inviáveis. Assim, iniciamos uma nova jornada para desvendar o papel de enzimas glutaminases no microambiente tumoral e seu impacto sobre a apresentação de antígenos pelo complexo de histocompatibilidade classe I.

CAPÍTULO III

1. INTRODUÇÃO

As células tumorais desenvolveram diversas maneiras de permanência e sobrevivência (HANAHAHAN, 2022), seja ignorando os sinais reguladores do crescimento celular que as células normais obedecem, como a apoptose, a capacidade de invasão e infiltração em tecidos adjacentes (HANAHAHAN, 2022), estímulo da angiogênese para suprimento de oxigênio e nutrientes (CARMELIET; JAIN, 2000), estratégias de escapar do reconhecimento do sistema imunológico suprimindo as células responsáveis pelo reconhecimento de anomalias (YANG et al., 2023) e até mesmo capacidade de se desprender do tecido primário e colonizar outros tecidos distantes (FARES *et al.*, 2020). A junção desses fatores culmina na proliferação celular exacerbada que leva a desordem tecidual e que aliada a capacidade de captação de nutrientes, especialmente a glicose, é marca registrada das neoplasias (CARMELIET; JAIN, 2000; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Apesar de inúmeros esforços para compreender os mecanismos moleculares envolvidos no surgimento do câncer, a complexidade desta doença é bastante desafiadora, especialmente na compreensão da biologia envolvida e que reflete nos tratamentos utilizados, e que por muitas vezes, apresentam pouco benefício clínico ou desencadeiam inúmeros efeitos colaterais (PETERSON; DENLINGER; YANG, 2022). Assim, a investigação de novos alvos terapêuticos oncológicos bem como novas estratégias e até mesmo regimes quimio ou imunoterápicos tem ganhado os holofotes da ciência e é de grande interesse mundial (PETERSON; DENLINGER; YANG, 2022; SAPIO; NAVIGLIO, 2022).

1.1 O papel das Glutaminases no microambiente tumoral

A adaptação metabólica dos tumores tem sido alvo de extensa pesquisa nos últimos anos. Na intrincada teia metabólica humana, destaca-se a glutaminólise, a qual apresenta um papel crucial no metabolismo celular e isso se deve à geração de moléculas intermediárias essenciais para o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) (ARNOLD; FINLEY, 2023). Este processo metabólico é orquestrado pelas enzimas glutaminases, que catalisam a conversão de glutamina em glutamato e amônia (Figura 19). O glutamato gerado por reação serve como substrato fundamental para a

biossíntese de vários aminoácidos, como asparagina e arginina, bem como vários antioxidantes. Além disso, o glutamato sofre quebra para α -cetoglutarato (α -KG) pela glutamato desidrogenase, fornecendo um substrato adicional para o ciclo TCA, assim promovendo a produção energética na forma de ATP (adenosina trifosfato), ácidos graxos e nucleotídeos (MATÉS *et al.*, 2020).

O genoma humano contém dois genes parálogos, GLS e GLS2, que codificam para isoformas distintas de glutaminase (CEDERKVIST *et al.*, 2022; MATÉS; CAMPOS-SANDOVAL; MÁRQUEZ, 2018), conforme ilustra a figura 19. Cada um destes genes pode gerar duas isoformas principais por meio de *splicing* alternativo: o gene GLS contém 19 exons e está localizado no cromossomo 2 *locus* 2q32.2 e dá origem à Glutaminase *kidney type* (KGA) codificada pelos exons 1 a 14 e 16 a 19 e à Glutaminase C (GAC) pelos exons 1 a 15. Por outro lado, o gene GLS2 é composta por 18 exons dentro do cromossomo 12 *locus* 12q13.3 e produz as isoformas Glutaminase *liver type* (LGA) exon 2 a 18 e Glutaminase B (GAB) 1 a 18 utilizando um local alternativo de início de transcrição (KATT; LUKEY; CERIONE, 2017).

Os níveis de mRNA de GAC são frequentemente aumentados em células cancerígenas para atender às demandas metabólicas elevadas de células altamente proliferativas (CEDERKVIST *et al.*, 2022; SHANKAR *et al.*, 2022). Embora GLS2 tenha sido historicamente classificado como um supressor tumoral, descobertas recentes sugerem a sua atividade protumorigênica (DIAS *et al.*, 2020). No entanto, a complexidade e o comportamento real da enzima na tumorigênese ainda não é bem compreendido (WANG *et al.*, 2024). Esse papel ora supressor tumoral, ora protumorigênico destacam a interação dinâmica entre a expressão de glutaminase e o comportamento das células cancerígenas, enfatizando a necessidade de investigação mais profunda sobre os papéis de GLS e GLS2 no TME.

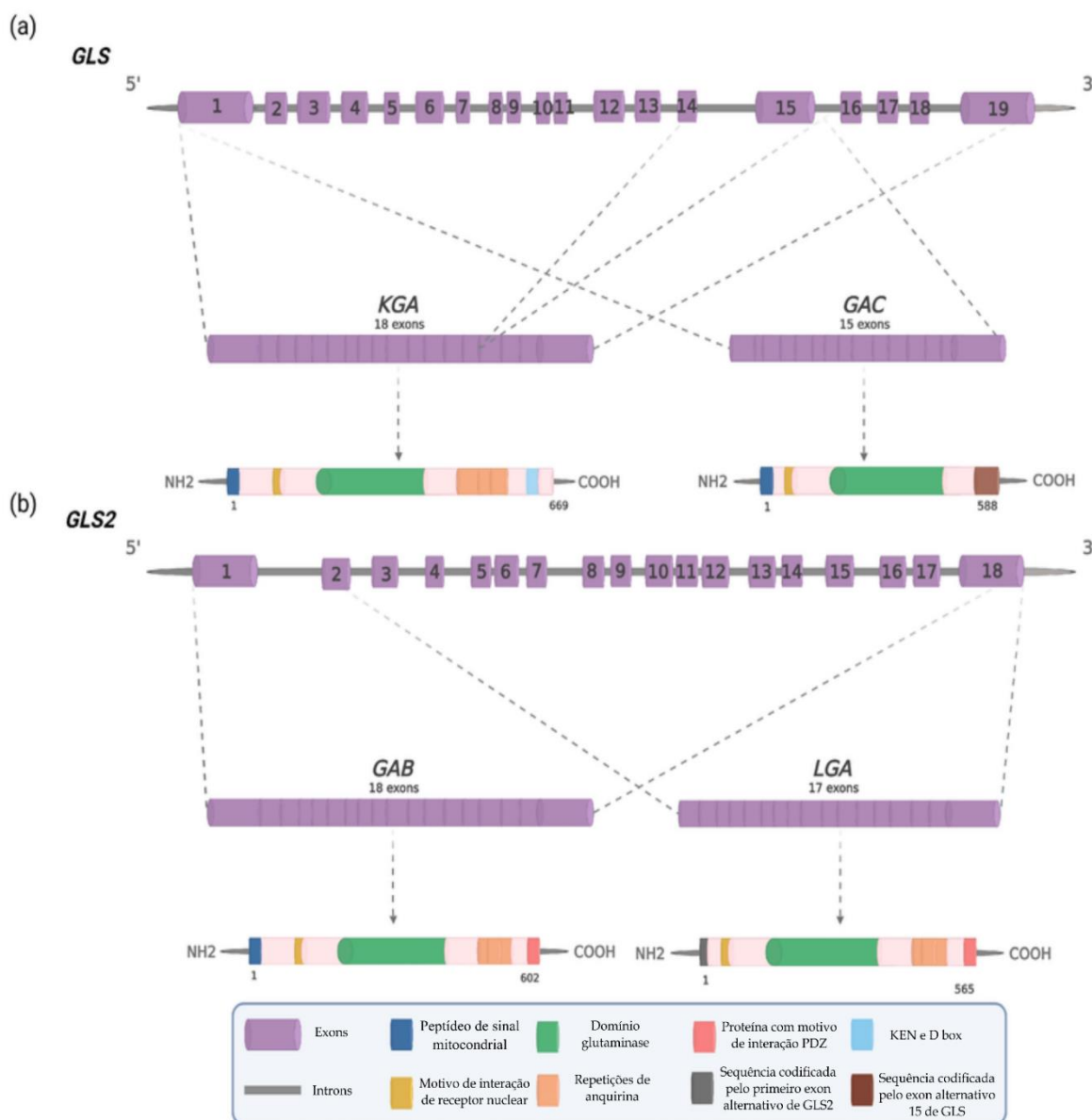


Figura 19. Ilustração das isoformas das enzimas glutaminases KGA, GAC, GAB e LGA.

As isoformas das glutaminases. a) GLS codifica as enzimas KGA e GAC por meio de *splicing* alternativo, enquanto b) GLS2 codifica para GAB e LGA através de início alternativo de transcrição. Os exons são representados em roxo, enquanto os íntrons em uma linha cinza. Todas as isoformas possuem atividade glutaminolítica (verde) e motivo de interação com receptor nuclear (bege). KGA, GAB e LGA possuem domínios anquirina (salmão). Ambas as isoformas de GLS2 possuem motivo de interação PDZ (rosa). Com exceção de LGA, as enzimas possuem peptídeo sinal mitocondrial (azul marinho). LGA possui sequência codificada pelo primeiro exon alternativo de GLS2 (bloco cinza) e GAC tem sequência codificada pelo exon alternativo 15 (marrom), adicionalmente KGA possui motivos KEN e D box (azul claro). A imagem foi traduzida e reproduzida de (BUCZKOWSKA; SZELIGA, 2023).

As glutaminases desempenham outro papel fundamental na mediação da proliferação celular, fornecendo substratos essenciais e mantendo o metabolismo da glutathione (GSH), importante para o mecanismo de reparo tecidual (JIN; ALESI; KANG, 2016). Dessa forma, a inibição da glutaminase pode prejudicar a síntese de GSH levando à diminuição dos níveis de cisteína, aumentando assim a suscetibilidade celular a danos oxidativos por espécies reativas de oxigênio (ROS) (MATÉS *et al.*, 2020). Assim, a capacidade de modulação metabólica das glutaminases em relação ao GSH que tem implicações significativas para o TME (KHRAMTSOV; GILLIES, 2014). Além disso, a atividade da glutaminolítica pode impactar a produção de ROS por células imunes e como consequência haverá alteração da resposta imune à inflamação (JOHNSON *et al.*, 2018), dado que a inflamação crônica, muitas vezes impulsionada pelo excesso de ROS, está intimamente relacionada com a carcinogênese (SIES; JONES, 2020).

Além de sua função catalítica, estudos bioquímicos anteriores estabeleceram há muito tempo que as glutaminases podem formar polímeros ativos (OLSEN *et al.*, 1970). Mais recentemente, a formação de filamentos de glutaminase foi implicada em desempenhar um papel fundamental na formação das redes mitocondriais e na proteção contra a mitofagia (ADAMOSKI *et al.*, 2023), o que poderia ter consequências para múltiplos distúrbios de longo prazo e pode impactar mecanismos ainda não descobertos na biologia tumoral. A intrincada interação entre o metabolismo celular, o estresse oxidativo, o destino mitocondrial e a resposta imune, regulada em parte pela glutaminase, destaca o potencial estratégico dessas enzimas na terapêutica do câncer (MATÉS *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2019). Dado este cenário, a atividade das glutaminases poderia ter um papel chave no TME, tornando-se um potencial alvo terapêutico (CLAIBORNE; LEONE, 2022).

1.2 A diversidade celular do microambiente tumoral

Dentro da diversa composição celular do TME, as células cancerígenas se destacam devido à sua capacidade única de aumento da captação intratumoral de glutamina (REINFELD *et al.*, 2021). Este processo metabólico tem sido observado para estimular reciprocamente a captação de glicose pelas células imunes (REINFELD *et al.*, 2021). Nesta orquestrada rede metabólica, as glutaminases desempenham um papel central, modulando a atividade tanto de células imunes

quanto não imunes em relação ao consumo de glutamina (WANG *et al.*, 2024). Esta modulação torna-se particularmente significativa no contexto de células que se proliferam rapidamente, como aquelas encontradas em tumores e tecidos linfoides (GURI; NORDMANN; ROSZIK, 2018). Apesar dos dados obtidos até agora, o papel funcional das glutaminases em outros tipos celulares dentro do TME ainda não é totalmente conhecido.

Outro componente significativo do TME são os infiltrados leucocitários. As células imunes são atraídas através de citocinas e quimiocinas para locais de dano tecidual, como ocorre nos tecidos tumorais, dando início a uma cascata reparadora (KONDO, 2010). Tais atividades celulares demandam um reservatório de nutrientes substancial para sustentar a proliferação celular. É importante ressaltar que uma notável competição por recursos surge entre células tumorais e imunes, envolvendo elementos essenciais como nutrientes e oxigênio (CRUZAT *et al.*, 2018; REINFELD *et al.*, 2021).

Dentre os leucócitos presentes no TME, destacam-se os macrófagos associados ao tumor (TAMs) que desempenham um papel crítico na progressão tumoral e nas estratégias de evasão imunológica das células malignas (OH *et al.*, 2020), como ilustra a figura 20. Os macrófagos podem ser funcionalmente polarizados em dois principais fenótipos: macrófagos tipo M1, comumente induzidos pelo interferon- γ e lipopolissacarídeo, e macrófagos tipo M2, induzidos pelas interleucinas-4 (IL-4) e IL-13 (BOUTILIER; ELSAWA, 2021), e essa polarização determina o perfil pró-inflamatório de M1, enquanto os M2 apresentam atividade imunossupressora (BOUTILIER; ELSAWA, 2021). Essa polarização e a reprogramação metabólica têm sido objetos de intensa pesquisa, visando compreender seus papéis na formação de padrões de infiltração de TAMs e seus efeitos subsequentes na progressão do tumor (XIANG *et al.*, 2023).

Os macrófagos tipo M2 auxiliam na expansão tumoral e formação de metástases através da geração de um microambiente imunossupressivo (Figura 20) que atua inibindo a apresentação de antígenos e promovendo o escape da vigilância imunológica (BOUTILIER; ELSAWA, 2021). Ainda, atua promovendo a exaustão dos linfócitos T citotóxicos (CTL) devido à estimulação antigênica crônica, expressão de receptores inibitórios da apresentação de antígenos como PD-1 (BALANÇA *et al.*, 2021), CTLA4 (SOBHANI *et al.*, 2021), TIM-3 (AUSEJO-MAULEON *et al.*, 2023) e

LAG-3 (ADASHEK *et al.*, 2022), além de alterações metabólicas no consumo de glicose e glutamina (LI *et al.*, 2023). Adicionalmente, fibroblastos associados ao tumor (CAF) (EIRO *et al.*, 2018; HUANG; HUANG; LI, 2019), células endoteliais associadas ao tumor (TAEC) e componentes da matriz extracelular (ECM) atuam como imunossupressores e promotoras da angiogênese secretando VEGF (HUANG; HUANG; LI, 2019), HGF (DING *et al.*, 2018), citocinas CXCL12 (ZHANG *et al.*, 2023) e CCL2 (PAUSCH *et al.*, 2020). Os macrófagos M2 juntamente com CAF também induzem as células Treg a modular a supressão de CTL por TGF β , IL-10 e CD25 (PLITAS; RUDENSKY, 2020; STOCKIS; ROYCHOUDHURI; HALIM, 2019). As células derivadas mieloides supressoras (MDSC) também contribuem para o ambiente imunossupressivo inibindo a ação de células NK (BRUNO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2009) e linfócitos T (FLEMING *et al.*, 2018) e induzindo a transição epitélio mesenquimal (ZHU *et al.*, 2017).

Por outro lado, os macrófagos tipo M1 suportam o papel pró-inflamatório secretando IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014) e contribuem na vigilância imunológica antitumoral das células T CD8⁺ (VERMARE *et al.*, 2022) e na secreção de quimiocinas e citocinas, especialmente CXCL9 e CXCL10 (HOUSE *et al.*, 2020) além de liberar ROS e óxido nítrico (SINGH; GAUTAM, 2023). Além disso, são fundamentais na apresentação de antígenos pelas células dendríticas (DC), que tem o papel crucial na geração de clones de linfócitos T citotóxicos combatentes do tumor e que por sua vez, secretam granzima B, perforinas e IFN- γ que contribuem para a apoptose das células cancerosas (OBLEUKHOVA *et al.*, 2018). Além disso, as DCs trabalham em conjunto com os linfócitos TCD4⁺ para gerar a resposta imune adaptativa ao tumor (*priming* de linfócitos) (DEL PRETE *et al.*, 2023). Nesse caso, as células apresentadoras de antígenos (APCs), fragmentam peptídeos tumorais, também chamados de neoantígenos tumorais, assim promovendo a produção de anticorpos contra o tumor pelos linfócitos B (BENVENUTO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023).

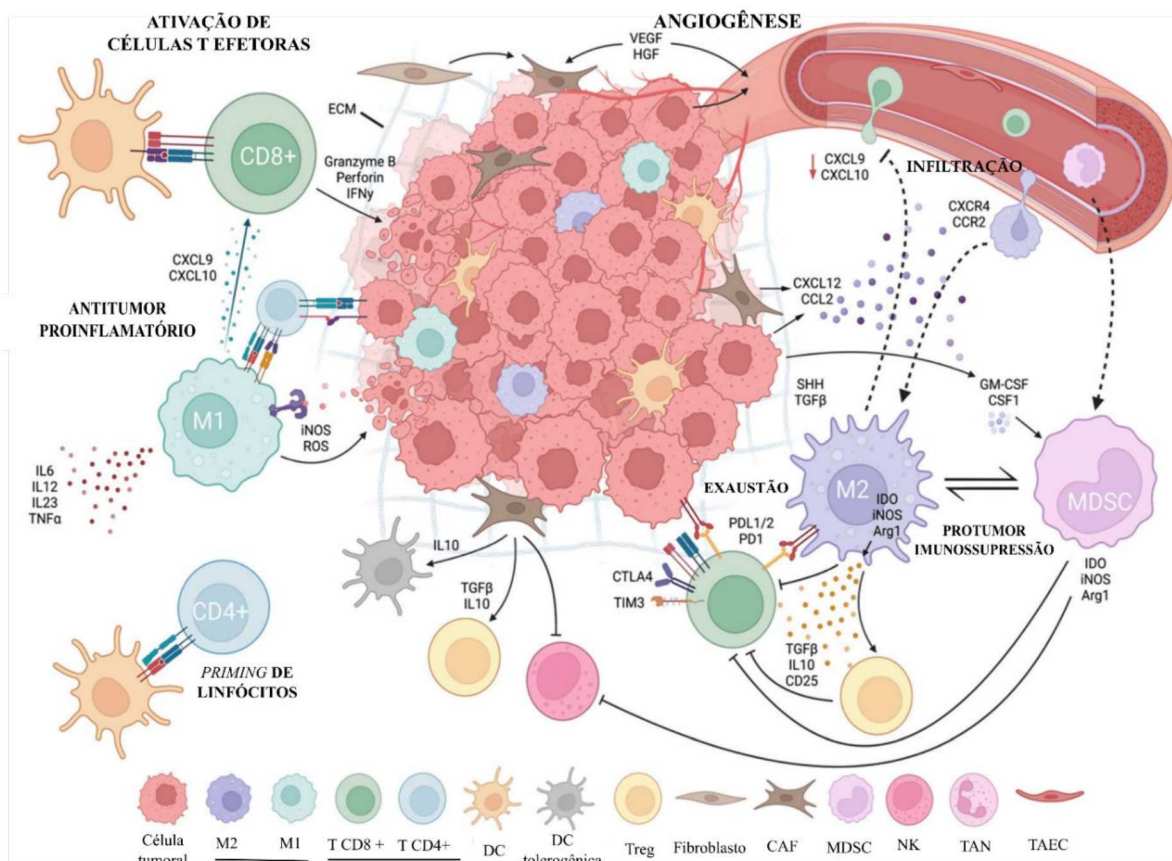


Figura 20. O TME e a regulação metabólica orquestram o crescimento ou o combate ao tumor.

Células tumorais liberam fatores pró-angiogênicos para nutrição e captação de oxigênio, enquanto células imunológicas são recrutadas para o local da injúria tecidual. A depender dos fatores solúveis, como quimiocinas e citocinas, as células tumorais podem modular a atividade pró ou antitumoral. Neste meio, é comum ocorrer a adaptação e o disparo de mecanismos tumorais que levam à evasão do sistema imune, garantindo assim o seu crescimento e promovendo o surgimento de metástases. Adaptado de: (PETERSON; DENLINGER; YANG, 2022).

1.3 O Sistema ubiquitina-proteassomo e a apresentação de antígenos tumorais

A biogênese do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) é iniciada com a degradação de proteínas intracelulares de importância crucial para a vigilância imunológica, seja por infecções virais, mal formações de proteínas, em especial é destacado aquelas que levam a condições de malignidade (ÇETIN *et al.*, 2021). Dessa forma, as proteínas passam por um processo de ubiquitinação (Figura 21), ou seja, essas proteínas são marcadas com uma *tag* pelo menos quatro moléculas de ubiquitina (Ub) e encaminhadas para degradação no complexo multiprotéico chamado proteassomo (ÇETIN *et al.*, 2021; DENG *et al.*, 2020; YANG *et*

al., 2021). Esse sistema proteolítico é chamado de via de degradação Ub-proteassomo e é um importante mecanismo de regulação de proteínas. A poliubiquitinação é iniciada através de uma cascata enzimática em três etapas principais: ativação (MCHUGH *et al.*, 2018), conjugação (STEWART *et al.*, 2016) e ligação (YANG *et al.*, 2021). Na primeira etapa, ocorre a ativação da extremidade C-terminal de Ub pela enzima de ativação (E1) e é dependente de ATP para a formação de um grupo tioéster, em seguida a Ub é transferida do resíduo de cisteína para a enzima de conjugação (E2) e mais um grupo tioéster é formado, por fim, a enzima E3 ligase (E3) realiza a ponte de ligação entre o resíduo de cisteína do complexo E2 e com o resíduo de lisina da proteína alvo (ÇETIN *et al.*, 2021; STEWART *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2021).

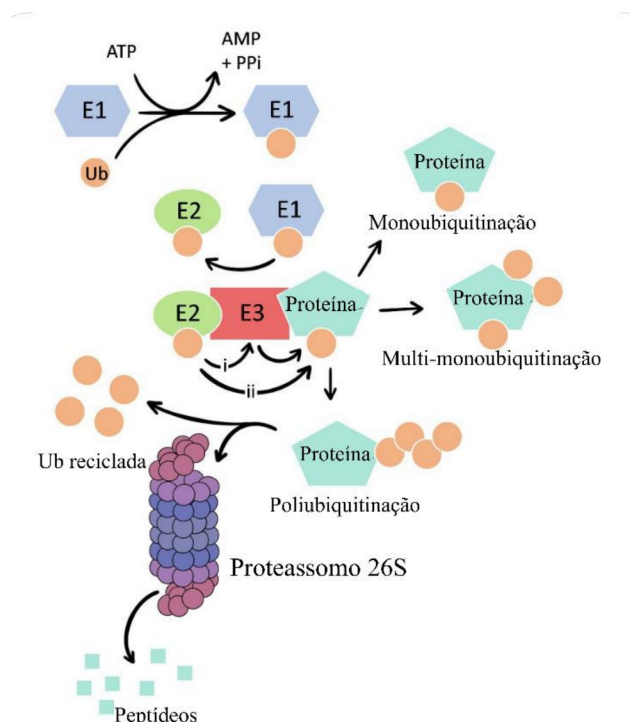


Figura 21. Representação esquemática do processo de ubiquitinação de proteínas.

O processo de ubiquitinação de proteínas. As enzimas E1, E2 e E3 reagem com a proteína alvo promovendo a poliubiquitinação. Essa cauda fornece o sinal necessário para a proteína ser encaminhada para a degradação via proteassomo, uma estrutura cilíndrica responsável pela proteólise. Imagem traduzida e reproduzida de (MACKINNON; STONE, 2022).

A próxima etapa é orquestrada pelo proteassomo, um complexo multiprotéico cilíndrico com função proteolítica denominado 20S coberto por uma partícula reguladora chamada 19S (KAMBER KAYA; RADHAKRISHNAN, 2021). A

figura 22A ilustra cada subunidade que compõe esse complexo. Estruturalmente, ele possui uma "tampa" sem atividade ATPase, que apresenta alta afinidade e avidéz por proteínas Ub (PSMD1, PSMD2, PSMD10 e PSMD13), essa estrutura é ilustrada em laranja na figura 22A. Nesta fase, ocorre a desubiquitinação por enzimas desubiquitinadoras (DUB, PSMD11) e as Ub são recicladas para serem reutilizadas em novas reações. Além disso, outras subunidades ligam a tampa à base, que é composta por um anel com atividade ATPase (PSMC1-PSMC6) (GRICE; NATHAN, 2016; TYCHHON *et al.*, 2023), ilustrado em rosa na figura 22A. O ATP é utilizado para desdobrar a proteína, permitindo sua translocação para a subunidade proteolítica 20S (BUDENHOLZER *et al.*, 2017; RAČKOVÁ; CSEKES, 2020).

A subunidade 20S é composta por cadeias organizadas em forma de anel. Os anéis externos representados em azul na figura 22A, são formados por 7 subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), controlam a abertura e fechamento do canal, regulando a entrada das proteínas no núcleo proteolítico (BUDENHOLZER *et al.*, 2017; TYCHHON *et al.*, 2023). Similar aos anéis α , os anéis β , ou internos ilustrados em verde na figura 22A, também consistem em 7 subunidades ($\beta 1$ - $\beta 7$) e são responsáveis pela clivagem das proteínas (BUDENHOLZER *et al.*, 2017; KAMBER KAYA; RADHAKRISHNAN, 2021). No entanto, apenas três dessas subunidades possuem atividade proteolítica: $\beta 1$, que atua de forma semelhante à caspase e cliva após resíduos ácidos como ácido glutâmico; $\beta 2$, que é semelhante à tripsina e cliva após resíduos básicos como arginina e lisina; e $\beta 5$, que tem uma atividade catalítica semelhante à quimotripsina e cliva após resíduos hidrofóbicos como triptofano, fenilalanina e tirosina (BUDENHOLZER *et al.*, 2017; RAČKOVÁ; CSEKES, 2020). Os peptídeos gerados por esse processo podem ser degradados no citosol, onde seus aminoácidos são reutilizados, ou podem ser conjugados a moléculas de MHC I (ÇETIN *et al.*, 2021; RAČKOVÁ; CSEKES, 2020).

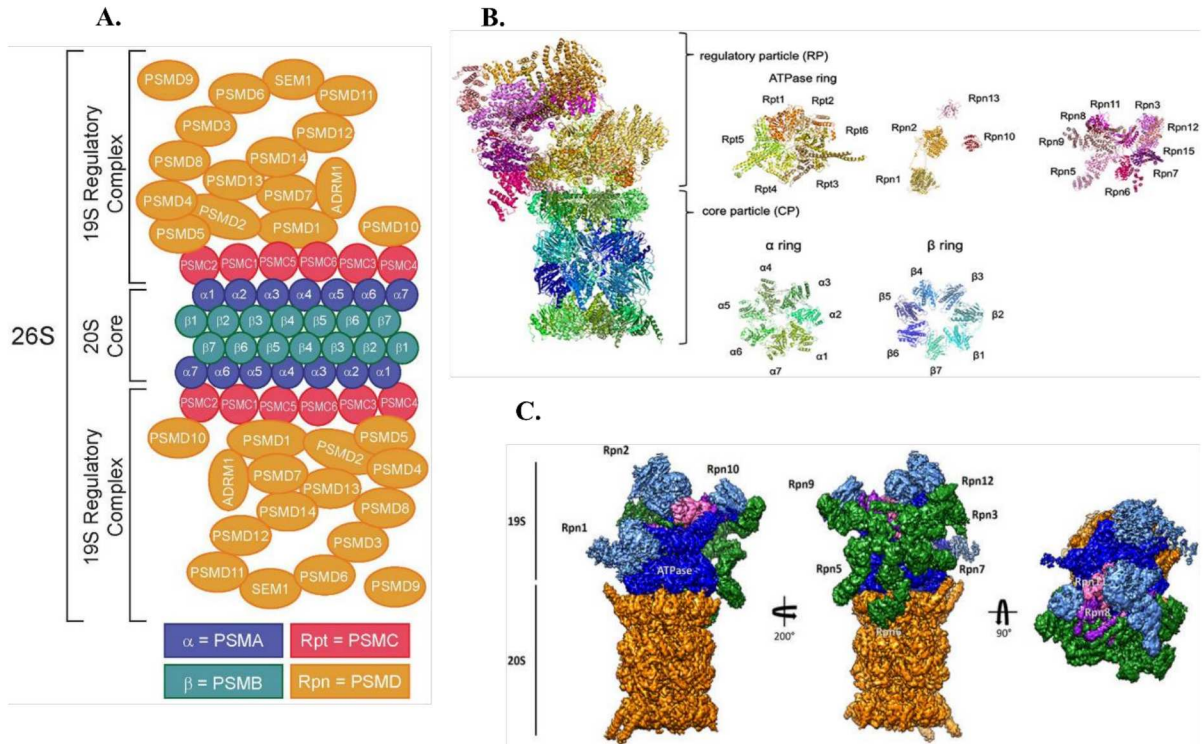


Figura 22. Representação molecular e estrutural do proteassomo 26S de mamíferos.

O proteassomo é composto por múltiplas subunidades protéicas. **A.** As subunidades do complexo 19S ou regulatório (laranja), também chamada de “tampa” é responsável por reconhecer proteínas poliubiquitinadas. Essa porção é composta por proteínas não-ATPase PSMD ou Rpn. A estrutura de base (rosa), é codificada pelos genes PSMC ou Rpt, esta estrutura possui atividade ATPase e tem função no desdobramento da proteína e a translocação para o centro do proteassomo. O complexo central ou 20S é composto por anéis subdivididos em 7 subunidades. Os anéis PSMA ou $\alpha 1$ - $\alpha 7$ (azul) controlam a entrada da proteína, ao passo que o anel β , (PSMB, verde) possui efetivamente os sítios catalíticos $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$. A união da porção reguladora 19S e o complexo central 20S foram a estrutura completa denominada proteassomo 26S. Imagem reproduzida de (TYCHHON *et al.*, 2023). **B.** Modelo de predição de estrutura protéica do proteassomo 26S, imagem reproduzida de (MOTOSUGI; MURATA, 2019). **C.** Estrutura do proteassoma 26S avaliada por criomicroscopia eletrônica colorida computacionalmente, imagem reproduzida de (WEHMER; SAKATA, 2016).

A molécula de MHC I é sintetizada em múltiplas etapas como ilustrado na figura 23. No citoplasma, é formada a cadeia pesada ou cadeia α composta de três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática (DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021). Em seguida, essa estrutura é transportada para o retículo endoplasmático (RE) e é associada a $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$) (DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021; DIRSCHERL *et al.*, 2022). Concomitante a esse processo, os peptídeos ou agora chamados antígenos, gerados a partir da via Ub-proteassomo são transportados do

citosol para o RE pelo transportador associado ao processo antigênico (TAP) (MARGULIES; JIANG; NATARAJAN, 2020), dessa maneira os peptídeos que contêm entre 9 e 13 aminoácidos podem ser conjugados ao MHC I (RAMMENSEE; FALK; RÖTZSCHKE, 1993). Ainda nesse processo a aminopeptidase do RE (ERAP) pode auxiliar na produção dos fragmentos antigênicos para serem inseridos no sulco do MHC I (COMPAGNONE; CIFALDI; FRUCI, 2019).

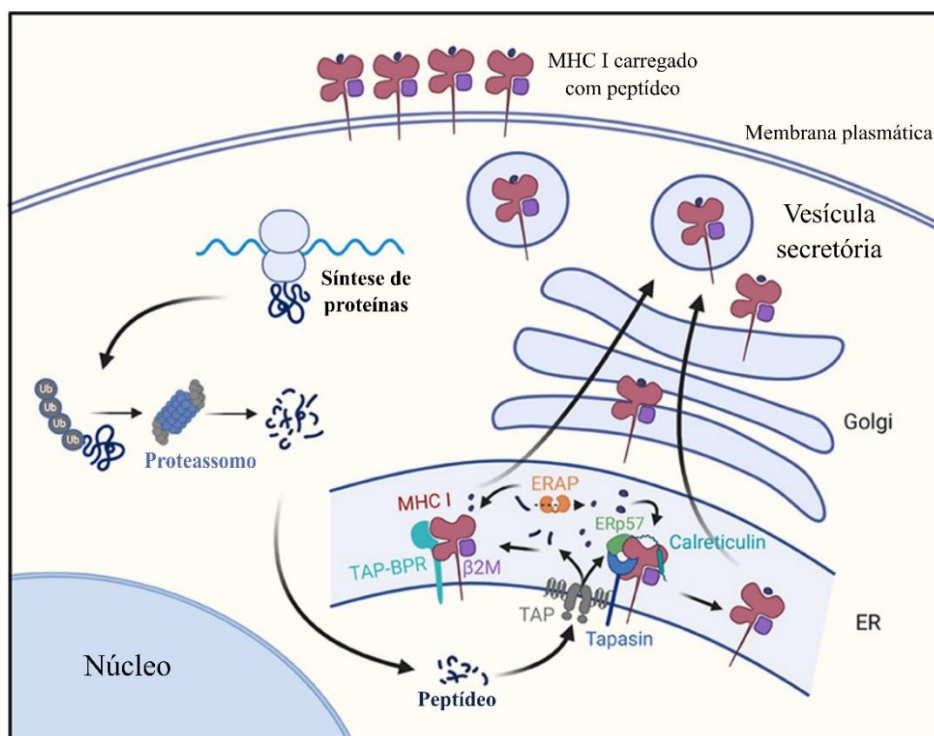


Figura 23. O destino dos peptídeos degradados pelo proteassomo é a apresentação de antígenos. As moléculas de MHC I são unidas aos peptídeos derivados de proteínas intracelulares e os expõem na superfície da célula. Esse processo permite o reconhecimento específico pelos linfócitos T CD8+ que desencadeiam uma resposta imune direcionada e eficiente. Reproduzido de (DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021)

MHC I e peptídeos no lúmen do RE permanecem próximos para o momento do carregamento dos antígenos, entretanto, o MHC I ainda é instável e por esse motivo, é estabilizado por chaperonas como a calreticulina (CALR) que estabiliza a união da cadeia pesada com $\beta 2m$ (LAM; LIM, 2021). A calnexina auxilia no enovelamento da cadeia pesada (LAM; LIM, 2021), tapasin promove o carregamento do peptídeo de alta afinidade e também evita que moléculas de MHC I vazias saiam do RE (MARGULIES; JIANG; NATARAJAN, 2020), proteína de ligação TAP (TAP-BPR) também auxilia no carregamento antigênico (MARGULIES; JIANG;

NATARAJAN, 2020; PORTER *et al.*, 2014), ERp57 ou PDIA3 é uma oxidoredutase envolvida no enovelamento, na formação da ponte dissulfeto do MHC I (CHICHIARELLI *et al.*, 2022; LAM; LIM, 2021). Com o MHC I estável e funcional, as chaperonas são dissociadas e o complexo MHC I conjugado com o antígeno é transportado para o aparelho de Golgi e enviado para a superfície celular através de vesículas de transporte para ser apresentado para as células T citotóxicas e dar início a resposta imunológica (DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021; LAM; LIM, 2021).

Todas as células eucarióticas nucleadas apresentam antígenos por meio do MHC I como forma de vigilância ativa contra possíveis proteínas nocivas e reconhecimento do que é próprio. No TME, o processo de apresentação de antígenos também ocorre, entretanto, a diferença reside no fato que podem ser gerados fragmentos que identifiquem o tumor, os chamados neoantígenos tumorais (BENVENUTO *et al.*, 2021; BRITO BALEEIRO *et al.*, 2023). Esses peptídeos tumorais são parte fundamental da imunidade antitumoral e é uma grande aposta terapêutica (PANSY *et al.*, 2021). A nova geração de tratamentos oncológicos já em estudos clínicos de fase III, se baseia em neoantígenos individualizados, ou seja, é realizada uma análise molecular do tumor para busca de uma assinatura gênica tumoral individual e posteriormente, a produção de RNA mensageiros (mRNA) sintéticos que podem ser traduzidos em diversos neoantígenos tumorais que, por sua vez, serão entregues ao sistema imune para serem processados e apresentados às células T (WEBER *et al.*, 2024). A imunidade contra os tumores acontece naturalmente no TME, entretanto, as células tumorais possuem mecanismos para burlar o sistema de defesa por diversas formas, seja diminuindo a expressão de MHC I na superfície celular, expressando a molécula de MHC I sem a inserção do antígeno no sulco, expressando MHC I não clássico, produzindo moléculas inibitórias da apresentação antigênica e produzindo um ambiente imunossupressivo (PANSY *et al.*, 2021), conforme ilustra a figura 24.

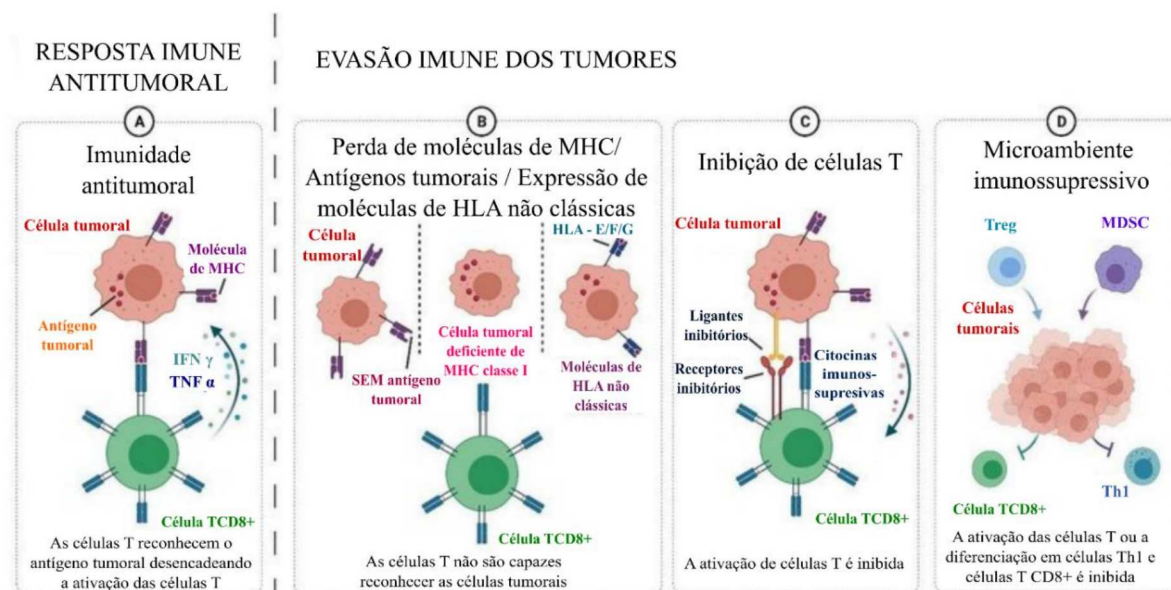


Figura 24. Os mecanismos de evasão tumoral frente ao sistema imunológico.

A evasão tumoral é um recurso utilizado para escapar da vigilância imunológica. A) Imunidade antitumoral onde as células T reconhecem os antígenos tumorais apresentados pelo MHC de classe I gerando ativação de células T CD8. B) Deficiências na expressão de moléculas de MHC I: sem a presença de antígeno tumoral, células tumorais que não expõe MHC I na superfície ou a expressão de MHC I não clássica, nesse caso, as células T CD8 não são capazes de reconhecer as células tumorais. C) Inibição das células T ocorre com a expressão de ligantes inibitórios e a secreção de citocinas imunossupressivas, estimulando a expressão de receptores inibitórios por parte das células TCD8. D) A produção de um microambiente imunossupressivo através de células T reguladoras e MDSC que inibem a ação de células TCD8+ e T *helper* tipo 1. Traduzido e reproduzido de: (PANSY *et al.*, 2021).

1.4 Resultados prévios

O papel de glutaminases foi investigado em modelo murino singênico de câncer de mama induzido pela inoculação de células de câncer de mama murino EO771 (MAFRA, 2021). Para isso, foram construídas três linhagens a partir de EO771 contendo um cassete de superexpressão de GAB murina (GAB^{high}), utilizando o vetor γ -retroviral pQC modificado por membros da equipe (ADAMOSKI *et al.*, 2023). O vetor pQC_MCS_IRES_G418 (*Addgene* #110344) foi utilizado para gerar EO771 MCS (*Mock*) ou pQC_V5_IRES_G418 (*Addgene* #110345) este vetor foi usado para a construção das de duas linhagens GAB^{high}: GAB^{high} *wild type* (GAB.wt) e GAB^{high} contendo uma mutação na posição 219, substituindo o aminoácido serina (S) por uma alanina (A), nomeada de GAB.S219A, essa mutação preserva a estrutura da enzima, porém não há atividade catalítica, além disso, conta a *tag* V5 para facilitar a identificação de GAB (ADAMOSKI *et al.*, 2023).

As células EO771 geneticamente modificadas MCS ou GAB^{high} foram inoculadas na glândula mamária de camundongos fêmeas e o crescimento tumoral foi acompanhado. Ao final do experimento, foi observado que tumores GAB^{high} tiveram um crescimento significativamente maior quando comparado seu controle MCS. Além disso, esses tumores apresentaram uma diferença morfológica evidenciando fibrose, necrose e processo hemorrágico. Também foi avaliada a infiltração de macrófagos de forma qualitativa e observou-se que há uma razão M2/M1 mais acentuada em tumores GAB^{high} (MAFRA, 2021).

Para tentar elucidar o mecanismo pelo qual os tumores GAB^{high} apresentaram o perfil descrito acima, ensaios de co-imunoprecipitação (co-IP) de GAB de linhagens celulares de mama murina EO771 e humana MCF-7, foram avaliadas por espectrometria de massas para verificar possíveis proteínas parceiras de interação com GAB, porém não foram realizados ensaios para a confirmação das interações (MAFRA, 2021).

1.5 Análises *in silico* da espectrometria de massas para identificação de possíveis mecanismos envolvidos no crescimento de tumores GAB^{high}

Os dados gerados por co-IP de GAB e avaliado por espectrometria de massas foram analisados a fim de investigar as interações de GAB com outras proteínas para desvendar vias funcionais que poderiam estar associadas a respostas metabólicas da GAB^{high}. Para isso, utilizamos as ferramentas *MetaCore*, *WikiPathways* e *Reactome* para realizar um rastreio de vias biológicas envolvidas no efeito de GAB^{high} sobre os tumores singênicos avaliados por (MAFRA, 2021).

Os achados *in silico* revelaram que houve a interação de GAB com vias relacionadas ao processamento de antígenos pelo MHC I, além de proteínas das subunidades do proteassomo, ou seja, antígenos provenientes da degradação peptídica interna das células podem estar envolvidos com o potencial de apresentação de neoantígenos tumorais no TME. Os dados seguem na figura 25 e o detalhamento das proteínas identificadas encontra-se na tabela 5.

Tabela 5. Análise *in silico* de proteínas que interagiram com GAB

Célula	Software	Proteínas IP	Vias relacionadas
EO771	<i>MetaCore</i>	TPP2; PSME1; <i>Bleomycin hydrolase</i> ; <i>Nardilysin</i> , UGCGL1	<i>Immune response: Antigen presentation by MHC class I</i>
	<i>WikiPathways</i>	PSMD6; PSMD9; PSMC4; PSME1; PSMC1; NEED4	<i>Proteasome Degradation</i>
MCF-7	<i>MetaCore</i>	PDIA3; PSMB5; CALR,	<i>Immune response: Antigen presentation by MHC class I</i>
	<i>ReactomePA</i>	PDIA3; PSMB5; CALR	<i>Antigen processing-cross presentation</i>
		PDIA3; CALR	<i>Calnexin/calreticulin cycle</i>
		PDIA3; CALR	<i>Antigen presentation: folding, assembly, peptide loading of MHC class I</i>

TPP2= *Tripeptidyl Peptidase 2*; PSME1= *Proteasome Activator Subunit 1*; *Bleomycin hydrolase*; *Nardilysin*, UGCGL1= *UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase 1*; PDIA3= *protein disulfide isomerase family A member 3*; PSMB5= *proteasome 20S subunit beta 5*; CALR= *calreticulin*; PSMD6= *proteasome 26S subunit, non-ATPase 6*; PSMD9= *26S subunit, non-ATPase 9*; PSMC4= *26S subunit ATPase 4*; PSMC1= *26S subunit ATPase 1*; NEED4= *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4*.

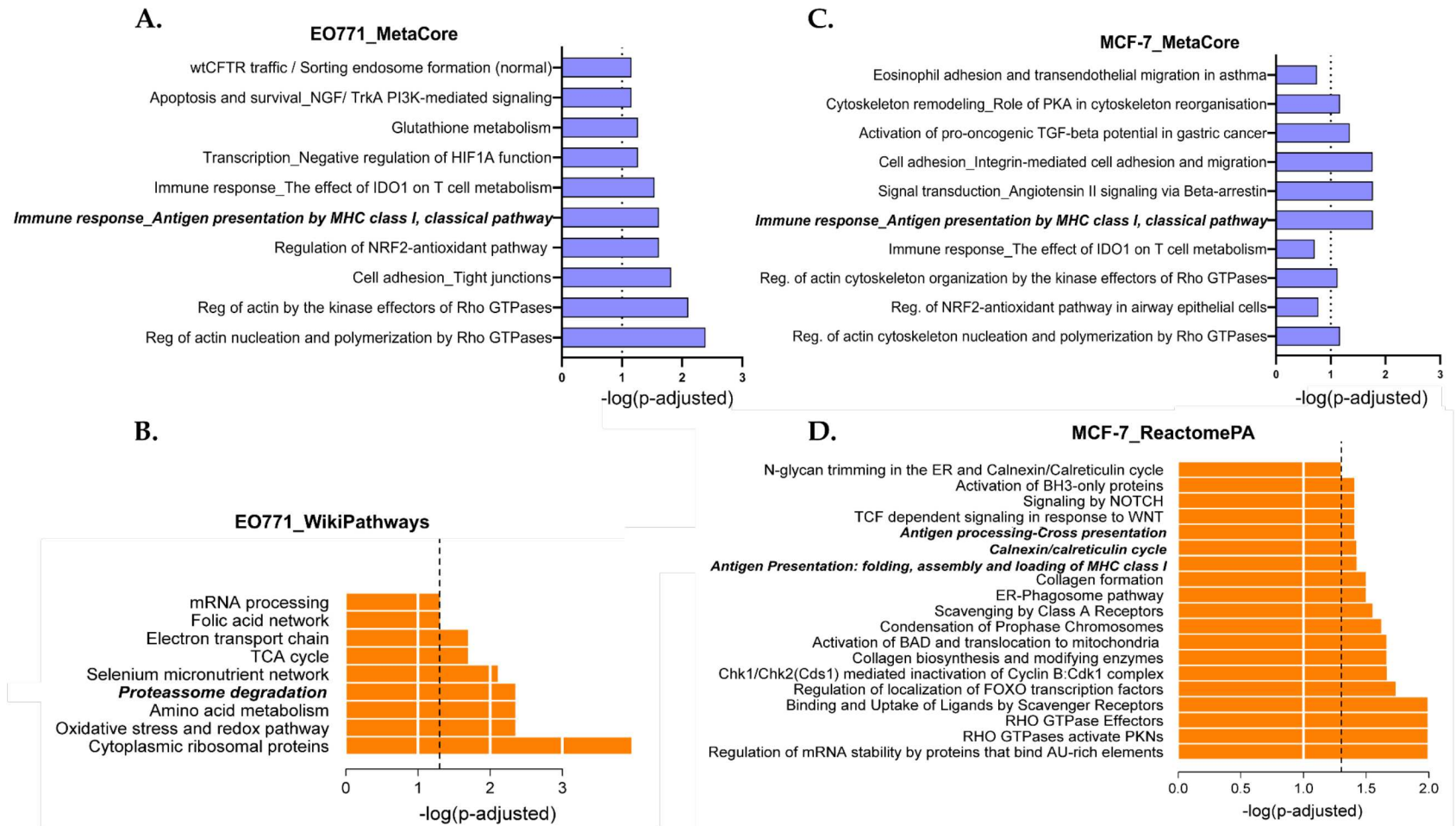


Figura 25. Análise interações de proteínas obtidos por co-imunoprecipitação de GLS2

Os dados foram processados utilizando as plataformas de análise de interações biológicas. Os dados obtidos EO771 por espectrometria de massas foram analisados pelas plataformas: **A. MetaCore** e **B. WikiPathways** e MCF-7 **C. Metacore** e **D. ReactomePA** destacando vias metabólicas mais significantes. Em todas as análises, um ponto comum foi a presença de vias relacionadas ao processamento e apresentação de antígenos por meio de proteassomo e MCH I.

O enriquecimento de vias biológicas, sugeriu que há uma relação entre as subunidades do proteassomo, organela intimamente envolvida na degradação de proteínas e a apresentação de antígenos mediadas por MHC I. Possivelmente, essa relação está entre o proteassomo e a apresentação de neoantígenos tumorais para células T. Dessa forma, nossa hipótese inicial foi de que tumores com alta expressão de GAB poderiam desenvolver peptídeos menos imunogênicos ou menos peptídeos ou ainda diminuir a expressão de MHC I, o que levaria ao desenvolvimento progressivo dos tumores GAB^{high}, que passaria despercebido pelo sistema de vigilância imunológica e aperfeiçoando as vias de progressão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esse estudo tem por objetivo elucidar o papel da modulação da expressão de GAB e na sua influência na degradação de peptídeos via proteassomo e o impacto na expressão MHC I.

2.2 Objetivos específicos

- a. Obter linhagens de câncer de mama murinas com o silenciamento de GAB endógena (GAB^{low});
- b. Avaliar o perfil de proliferação das células de câncer de mama murino GAB^{high} e GAB^{low} para avaliar a repercussão da modulação da expressão de GAB;
- c. Elucidar as implicações da modulação da expressão de GAB sobre a expressão de moléculas de MHC I na superfície de células de câncer de mama GAB^{high} e GAB^{low};
- d. Analisar o efeito da privação do aminoácido cistina e seu papel na proliferação e expressão de MHC I na superfície de células de câncer de mama GAB^{high} e GAB^{low}

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As linhagens celulares de carcinoma de mama murino EO771 (ATCC® CRL-3461™) foram mantidas em meio de cultura completo: meio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium - Thermo Fisher Scientific, US*) *high glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - *Thermo Fisher Scientific, US*) e 20 mM de HEPES (*Thermo-Fischer Scientific, US*) ou RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute, Thermo-Fischer Scientific, US*). As culturas foram mantidas a 37°C e sob atmosfera de 5% CO₂ em incubadora (*Panasonic Healthcare, US*), em placas de 60, 100 ou 150 mm até atingir 80% de confluência da monocamada. As linhagens EO771 contendo superexpressão ectópica de GAB (GAB^{high}) foram previamente estabelecidas por membros da equipe. Para avaliar o efeito de modulação de GAB, foram construídas três linhagens a partir de EO771 contendo o *knockdown* de GAB endógena que será chamado de GAB^{low}, os detalhes da geração dessas linhagens serão descritos abaixo. Para facilitar o entendimento, a tabela 6 mostra as nomenclaturas utilizadas para a construção das linhagens EO771 GAB^{high} e GAB^{low}.

Tabela 6. Nomenclatura para identificação das linhagens GAB^{high} e GAB^{low}

Célula	Plasmídeo	Nomenclatura estendida	Abreviatura
EO771	pQC MCS	Controle pQC MCS	MCS
	pQC GAB ^{high} V5	GAB ^{high} <i>wild type</i> V5	GAB.wt
		GAB ^{high} mutada S219A V5	GAB.S219A
	pLKO.1 shGFP	Controle pLKO.1 shGFP	shGFP
	pLKO.1 GAB ^{low}	GAB ^{low} shRNA 3'UTR	shGAB.3'UTR
		GAB ^{low} shRNA CDS2	shGAB.CDS2

Além das linhagens celulares de mama, utilizamos também outras linhagens celulares para transfecção e transdução como a HEK293T (ATCC® CRL-3216™) e NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), para essa linhagem utilizamos o meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% de SFB. Todos os cultivos celulares foram realizados sem a utilização de antibióticos ou antimicóticos a fim de minimizar a interferência metabólica desses fármacos.

3.2 Construção do *short hairpin RNA* (shRNA) para silenciamento de GAB

O silenciamento por shRNA utiliza estruturas na forma de grampios para interferir na expressão de genes de forma duradoura. O silenciamento de GAB foi realizado para compreender o impacto dessa enzima no microambiente tumoral, especialmente sobre as moléculas de MHC I.

3.2.1 Estratégia de clonagem de shRNA para silenciamento de GAB

Para os silenciamentos, utilizamos duas sequências distintas do mRNA de GAB murina, uma que compreende a região 3'-UTR (*untranslated region*) (TRCN0000198217) que contém regiões reguladoras e exerce atividade pós-transcricional da expressão gênica, além de garantir uma especificidade adicional pois tende a ser mais variável entre isoformas de um gene, como as glutaminases, permitindo o desenho de shRNAs que atinjam isoformas específicas sem afetar outras variantes e uma na região *coding sequence* (CDS) 2 (TRCN0000177991). Ao contrário das regiões UTR, a CDS geralmente não está associada a interações regulatórias de proteínas e RNAs não codificantes, reduzindo a interferência funcional, a região CDS está diretamente envolvida na tradução do gene, tornando-a um alvo eficaz (KOCABAS *et al.*, 2015).

As sequências foram conferidas no *The RNAi Consortium* (TRC), sintetizadas pela *Integrated DNA Technologies* (IDT-síntese) e estão listadas na tabela 7. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê Interno de Biossegurança (CIBio) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) sob número de registro 2017-09. As sequências foram inseridas no *backbone* do vetor lentiviral pLKO.1 conforme o mapa da figura 26. Dois plasmídeos foram clonados, um inserto contendo a sequência na região 3'UTR (Figura 26A) e outro com sequência na região CDS2 (Figura 26B) para *knockdown* de GAB, a nomenclatura utilizada para se referir a cada uma das linhagens está listada mais acima na tabela 6.

Tabela 7. Sequências dos shRNAs sintetizados para construção plasmidial

Identificação	Sequência
mGAB_shRNA_3'UTR_fow	CCG GCA TCA TGC CAA CAA GCA ACT TCT CGA GAA GTT GCT TGT TGG CAT GAT GTT TTT G
mGAB_shRNA_3'UTR_rev	AAT TCA AAA ACA TCA TGC CAA CAA GCA ACT TCT CGA GAA GTT GCT TGT TGG CAT GAT G
mGAB_shRNA_CDS2_fow	CCG GGA ACC TGC TAT TTG CTG CAT ACT CGA GTA TGC AGC AAA TAG CAG GTT CTT TTT G
mGAB_shRNA_CDS2_rev	AAT TCA AAA AGA ACC TGC TAT TTG CTG CAT ACT CGA GTA TGC AGC AAA TAG CAG GTT C

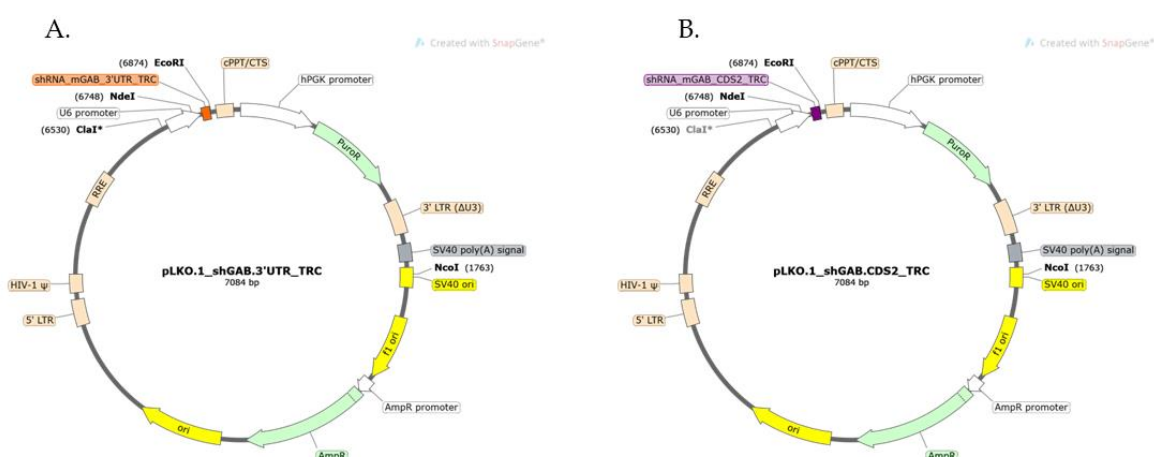


Figura 26. Mapa dos plasmídeos contendo sequências de shRNA para *knockdown* de GAB murina A. shRNA desenhado para região 3'UTR, destacado em laranja e B. para a região CDS2, em roxo. Os mapas e predições de clonagem foram analisados no *software snapgene* (GSL Biotech LLC).

Inicialmente, foi realizado o anelamento e fosforilação de ambos oligonucleotídeos de mGAB, 3'UTR e CDS2, adicionalmente foi utilizado um controle negativo de silenciamento. Os *primers foward* e *reverse* foram ressuspensos a concentração final de 100 μ M e preparamos a reação de fosforilação e anelamento dos shRNA utilizando 1X tampão de ligação T4, 1X T4 PNK (ambos de *New England Biolabs, US*).

A digestão enzimática proporciona a abertura do plasmídeo em locais específicos para inserir sequências de DNA. Para clonar o shRNA para GAB, foi

necessário fazer a digestão enzimática sequencial do plasmídeo pLKO.1 com as enzimas de restrição *AgeI* e *EcoRI* (*New England Biolabs, US*). Para isso, 2 µg de plasmídeo pLKO.1 foram digeridos com 1X *NEB buffer* 1.1 e 1X *AgeI*, essa reação foi incubada em microtubo por 2h a 37 °C, após inativada por 10 min a 65 °C. Sequencialmente, foi adicionado 50 mM de cloreto de sódio, 1x *NEB buffer* 1.1 e 1X *EcoRI* e novamente incubada por 2h a 37 °C, seguido de inativação por 10 min a 65 °C. A confirmação da digestão foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e as amostras correram a 80 mV por 1h. As imagens foram capturadas por transiluminador UV. A banda única do gel foi removida com bisturi e depositada em microtubo para extração do DNA através do *kit QIAEX II Gel Extraction* (*Qiagen, Germany*) seguindo as instruções do fabricante.

Bactérias podem captar plasmídeos externos, ajudando na adaptação e sobrevivência. Isso permite que bactérias competentes recebam e repliquem DNA plasmidial, gerando muitas cópias rapidamente. Após a reação de ligação, transformamos bactérias quimicamente competentes da linhagem *NEB Stable competent E. coli* (*New England Biolabs, US, #C3040H*). Após ambientação, 2 µL da reação de ligação foram adicionados gentilmente e incubados por 10 min no gelo. Após, realizamos o choque térmico em banho-maria a 42 °C por 45 segundos e rapidamente elas foram reincubadas no gelo por 2 min, para incorporação do plasmídeo pela bactéria. Em seguida, adicionamos meio de cultura *super optimal broth* com glicose - SOC (0,5% extrato de levedura; 2% triptona; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glicose) e incubamos a 37 °C por 1h. Posteriormente, inoculamos as bactérias sobre uma placa de LB ágar (1% Bacto-triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 1,5% ágar) com o auxílio de uma alça de Drigalski e incubamos a 37 °C *overnight*.

3.2.2 Triagem de colônias positivas

A inserção de plasmídeos em bactérias as transforma em fábricas de DNA, mas é preciso selecionar as que recebem o DNA desejado. Após o crescimento bacteriano, seguimos o *screening* das colônias positivas. Utilizamos *deep well* contendo meio LB e ampicilina para as coletas e após selamos com filme respirável, seguido de incubação a 30 °C *overnight* sob agitação. Em seguida, foi realizado com a reação de PCR utilizando os *primers*: *foward* pLKO.1 -

(GGACTATCATATGCTTACCG) e o *reverse* de cada uma das regiões 3'UTR e CDS2 a 0.5 μ M, juntamente com 200 μ M dNPT, 1U enzima *Phusion*, 1x *Phusion buffer* e 200 ng de DNA. As reações foram levadas ao termociclador por um ciclo de 95 °C por 2 min, 2 ciclos de 95 °C por 20 seg; 60 °C por 20 seg; 72 °C por 20 seg e um ciclo final de 72 °C por 3 min. Em seguida, produto da amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio e as amostras correram a 80 mV por 1h. As imagens foram capturadas por transiluminador UV (*Carestream, Onex Corporation, Canada*).

3.2.3 Sequenciamento

A fim de verificar se as colônias positivas tiveram a correta inserção dos shRNA, foram selecionadas amostras de cada shRNA (3'UTR e CDS2) para produção plasmidial e posterior sequenciamento para confirmação da inserção do shRNA. Para isso, adicionamos 5 mL de meio LB líquido em um tubo contendo ampicilina (1:1000), seguido de transferência do pré-inóculo do poço selecionado e incubação a 37 °C sob agitação constante *overnight*.

No dia seguinte, transferimos o meio para um tubo cônico e centrifugamos a 300 x g por 10 min, descartamos o sobrenadante e seguimos com o protocolo de purificação de plasmídeos *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (Cellco Biotech, BR)* seguindo as instruções do fabricante e enviadas para o laboratório de sequenciamento de DNA do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM.

3.3 Geração de células com *knockdown* de GAB por shRNA

3.3.1 Produção lentiviral

A interferência gênica de shRNA é realizada através de vetor lentiviral, esse vetor contém a sequência codificadora do shRNA junto com as sequências necessárias para a transcrição e produção do shRNA. Para a produção lentiviral, células HEK293T/16 foram previamente plaqueadas a uma densidade de $2,5 \times 10^6$ em placas de 60 mm em meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% de SFB. No dia seguinte, a transfecção foi preparada utilizando uma solução de polietilenoimina (PEI) a 1 μ g/ μ L em 150 mM de NaCl. Adicionalmente, utilizamos 4U plasmídeo de transferência, contendo as sequências de shRNA de interesse, 3U de empacotamento de 2ª geração (psPAX2), 1U de plasmídeo de envelope (pMD2.G), que foram diluídos

em solução salina. As soluções foram agitadas vigorosamente, seguido de incubação por 5 min. Após, misturamos as soluções de PEI com as soluções contendo os plasmídeos, seguido de 20 min de incubação e em seguida gotejado sobre as células e incubados em atmosfera úmida a 37 °C e saturação de 5% de CO₂ por 8 h. Na sequência o meio de transfecção foi trocado por meio fresco e realocadas na estufa. Em condições de biossegurança nível 2, foram realizadas 6 coletas de sobrenadantes virais a cada 12 h e após congelados a -80° C para posterior ensaio de titulação viral.

3.3.2 Titulação viral

Células NIH/3T3 foram plaqueadas a densidade de 1×10^4 células em placa de 6 poços. No dia seguinte, o meio foi aspirado e substituído pelo meio de titulação contendo 8 µg/mL de polibreno contendo as partículas virais produzidas. Após 24h, adicionamos 5 µg/mL do agente de seleção puromicina, o meio foi trocado a cada 48h por aproximadamente 7 dias. Ao final do período, o meio foi descartado e a placa fixada com etanol absoluto e corada com Giemsa 0,4% seguido de 3 lavagens com água destilada. As colônias de células foram contadas para determinação do título viral.

3.3.3 Transdução viral para silenciamento de GLS2

Para garantir a qualidade e a eficiência de vírus produzidos foi realizada a quantificação do número de partículas virais infecciosas. As células de carcinoma mamário murino EO771 foram plaqueadas em placa de 6 poços a uma densidade de 2×10^5 por poço e mantidas em atmosfera úmida a 37°C e saturação de 5% de CO₂ *overnight*. No dia seguinte, o meio de transdução viral foi preparado utilizando *multiplicity of infection*, MOI=4 suplementado com polibreno (8 µg/mL) por 8 h. Após, o meio de transdução foi aspirado e substituído por meio de cultivo celular fresco. Após 24 h, o meio foi aspirado e substituído por meio de seleção contendo puromicina a 5 µg/mL e trocado a cada 48 h até a formação de monocamada. Um controle sem adição de partículas foi utilizado para a seleção. As células selecionadas foram então expandidas para crioconservação e confirmação do silenciamento de GLS2 por *Western blot*.

3.4 Isolamento de proteassomos por centrifugação diferencial em EO771

Para entender se a GAB exerce algum tipo de função sobre os proteassomos, realizamos a tentativa de isolamento por centrifugação diferencial. Lisados celular das linhagens EO771 GAB^{high} (GAB.wt e GAB.S219A) e a linhagem controle MCS foram utilizadas para essa técnica. As células foram cultivadas em placas de 150 mm até atingir 90% da confluência, então o meio foi aspirado e a monocamada foi lavada 2 vezes com PBS 1X gelado. O protocolo foi adaptado de (TAI *et al.*, 2010). A lise celular foi realizada com o auxílio de *cell scraper* e tampão de lise (20 mM HEPES; 0,32 M sacarose; 5 mM MgCl₂; 2 mM ATP; 2 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 1 mM leupeptina, 1 mM pepstatina, 1 µg/mL aprotinina, 10 mM ortovanadato; pH 7,2), seguido de congelamento em nitrogênio líquido. Os lisados foram descongelados no gelo e foram realizadas as centrifugações diferenciais. A cada passo, uma pequena alíquota foi coletada para posterior análise por *Western blot*. Todas as etapas foram realizadas no gelo e centrífugas refrigeradas a 4°C. Para sintetizar a metodologia, um esquema representativo foi ilustrado na figura 27.

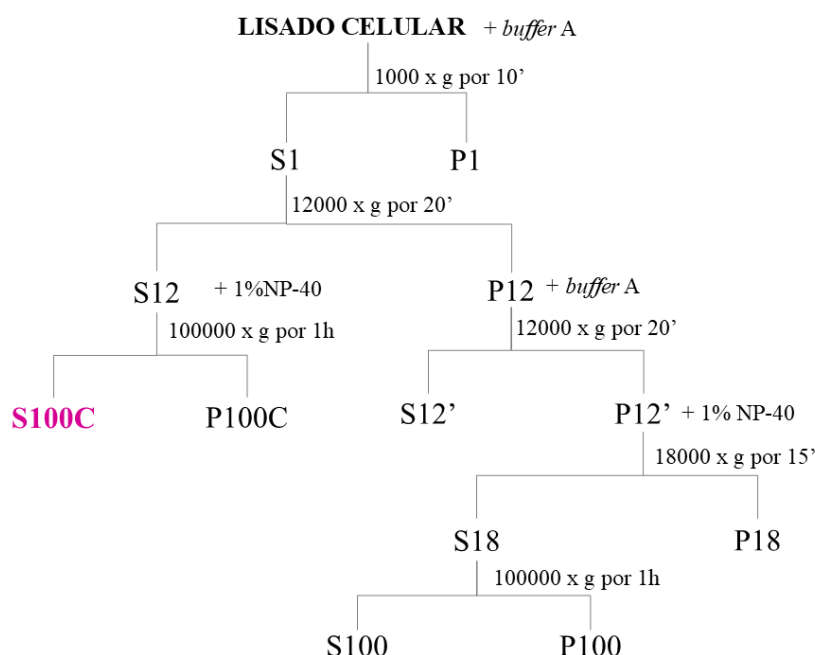


Figura 27. Fluxograma de isolamento de proteassomo 26S por centrifugação diferencial.

A metodologia foi adaptada de Tai e colaboradores para isolamento de proteassomo 26S. Os lisados foram centrifugados e separados em sobrenadantes (S) e *pellets* (P) sequencialmente e uma amostra foi separada em cada etapa para posterior análise (TAI *et al.*, 2010).

3.5 Análise da taxa de proliferação celular em resposta a modulação da expressão de GAB em células EO771

Células EO771 geneticamente modificadas foram avaliadas por sua capacidade proliferativa. Para isso, EO771, MCS, GAB.wt, GAB.S219A, shGAB.3'UTR, shGAB.CDS2 e shGFP foram plaqueadas a uma densidade de 1000 células por poço e mantidas por 24 h para aderência em atmosfera úmida a 37°C e saturação de 5% de CO₂. A seu tempo, as placas foram fixadas (4% de paraformaldeído; 4% de sacarose diluídos em PBS 1X, PFA-S) e permeabilizadas com 0,2% de *triton* X-100, seguida de marcação dos núcleos com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 300 nM). As imagens foram obtidas por fluorescência (^{ex/em}: ^{350/465}) no leitor *Operetta® High Content Analysis System* (Perkin Elmer, US) e analisadas no *software Columbus™ Image Data Storage and Analysis system* (Perkin Elmer, US).

3.6 Ensaio de privação de cistina para avaliação do impacto de GAB sobre o crescimento de células EO771

O déficit de nutrientes pode gerar inúmeras disfunções celulares, inclusive alterar o balanço *redox* das células. A privação de cistina pode interferir no metabolismo das glutaminases, induzindo mecanismos de morte celular por ferroptose (SHIN *et al.*, 2020), o que poderia promover a interação entre a GAB e os proteassomos, para isso, avaliamos o impacto de privação de cistina nas células EO771. As células EO771, MCS, GAB.wt e GAB.S219A foram plaqueadas em meio completo a uma densidade de 1000 células em placa de 96 poços e mantidas em atmosfera úmida a 37°C e saturação de 5% CO₂ *overnight*. No dia seguinte, foi dado seguimento a privação do aminoácido, o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS 1X aquecido, finalmente adicionamos os meios modificados DMEM *high glucose* (Thermo Fisher Scientific, US) e RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific, US), suplementados com 4mM L-glutamina, 0,1 mM L-metionina, 10% SFB e 20 mM HEPES, para os controles adicionamos 0,208 mM L-cistina. As células foram acompanhadas para avaliação da proliferação celular por até 96h, seguindo o mesmo protocolo de marcação do item anterior.

Adicionalmente, buscamos entender em qual horário as células entrariam no processo de morte celular, observando-se o descolamento das células do fundo da

placa. Este ensaio serviu para determinar o ponto em que as células seriam avaliadas por citometria de fluxo, verificando a expressão de moléculas de MHC I e se GAB com ou sem a privação de cistina teria algum impacto nessa expressão. As imagens foram obtidas em campo claro no leitor *Operetta® High Content Analysis System (Perkin Elmer)* com atmosfera a 37°C e saturação de 5% de CO₂ e analisadas no *software Columbus™ Image Data Storage and Analysis system*.

3.7 Avaliação de GAB^{high} e GAB^{low} na expressão de MHC I por citometria de fluxo

A expressão de MHC de classe I foi avaliada a fim de verificar alterações celulares nas linhagens construídas. Inicialmente, semeamos 2,5x10⁴ células GAB^{high} (GAB.wt e GAB.S219A e o seu respectivo controle MCS) e células GAB^{low} (shGAB.3UTR, shGAB.CDS2 e seu respectivo controle shGFP), em placas de 6 poços, mantendo *overnight* para aderência. No dia seguinte, a monocamada foi lavada com PBS 1X e adicionamos o meio para o tratamento de privação de L-cistina e as células foram mantidas por 24h, como controle, utilizamos meio completo.

As células foram tripsinizadas seguido de neutralização com tampão PBS 1x contendo 10% de SFB, o meio foi evitado para não haver influência de L-cistina em nenhuma das etapas. As células foram coletadas em tubos para citometria e centrifugados a 500 x g por 5 min seguido de mais uma lavagem com *wash buffer* (*wash B* – 0,13 M NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄; 0,5% BSA; 0,01% azida sódica; pH 7,4). Foi realizada a marcação extracelular com MHC I murino conjugado com alofocianina (APC *anti-mouse* H-2K^b/H-2D^b, *BioLegend, US*, #114614) por 30 min ao abrigo de luz e 4°C seguido de 2 lavagens com *wash B*. Seguimos o protocolo de marcação intramitocondrial de GAB, através do anticorpo anti-V5 conjugado com ficoeritrina (V5 *Tag* Monoclonal, PE, *Thermo Fischer Scientific, US* #12-6796-42). Utilizamos o *kit True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, US, #424401)*, seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas na sequência em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*BD Biosciences, US*) com o *software FACSDiva™ (BD Biosciences, US)* e os dados analisados no *software FlowJo™ versão 10 (BD Biosciences, US)*.

3.8 Análise de interações proteicas de GAB por co-imunoprecipitação

Previamente, preparamos os grânulos de agarose para proteína A/G plus (*Santa Cruz Biotechnology, US, #sc-2003*), para cada 20 µL de grânulos, adicionamos 1 µg de anticorpo anti-V5 (*Thermo Fischer Scientific, US, #R960CUS*), seguido de incubação de 1 a 4h a 4°C sob agitação constante, conforme instruções do fabricante. Os grânulos foram lavados 3 vezes com PBS 1X gelado e centrifugados a 1500 x g por 2 min a 4°C. Os grânulos ligados a anti-V5 puderam finalmente ser utilizados para a IP ou guardados em tampão de lise a 4°C para uso posterior.

As células MCS, GAB.wt e GAB.S219A foram plaqueadas a densidade de 5×10^6 em placas de 150 mm e mantidas até atingir 95% de confluência. A fim de testar se a acidificação do meio de cultivo teria influência na interação entre GAB e proteassomos, 12 h antes da coleta, o meio foi aspirado e substituído por meio completo fresco. Para a lise, as placas foram mantidas no gelo, o meio foi aspirado e a monocamada lavada 2 vezes com PBS 1X gelado. As células foram lisadas com auxílio de *cell scraper* e tampão de lise (50 mM tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP-40; 5% glicerol; 10 µM leupeptina; 1 µM pepstatina e 1 mM PMSF). Para auxiliar no processo de lise, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido ou agitadas de forma constante por 40 min no gelo, em ambiente refrigerado a 4°C. Os lisados foram centrifugados a 12000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a quantificação de proteínas totais por ensaio de Bradford (*Bio-Rad Laboratories, Inc., US, #5000002*) com curva padrão para calibração, utilizando BSA a 2 mg/mL em diluição seriada. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm em leitor de placas *EnSpire* (*PerkinElmer, US*).

Em microtubos, foram incubados 1 mg dos lisados de MCS, GAB.wt e GAB.S219A e os grânulos conjugados com anti-V5 *overnight* a 4°C sob agitação constante. Na sequência, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1X gelado e a uma rotação a 1500 x g por 2 min em centrífuga refrigerada a 4 °C. Ao final, os grânulos contendo as proteínas imunoprecipitadas foram ressuspensos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,25 mol/L; 2% SDS; 10% glicerol; 0,001% azul de bromofenol e 5% β-mercaptoetanol) e aquecidos a 95°C por 5 min seguido de uma centrifugação breve para separação da agarose residual. A corrida de SDS-PAGE foi realizada em gel contendo gradiente de bis-acrilamida, corrido a 80 mV por 20 min e voltagem foi

aumentada para 120 mV por aproximadamente 2h e seguimos com o protocolo para análise de proteínas por *Western blot*.

3.9 Preparo de amostras de cultivo para análise de proteínas

Amostras de células em cultura foram coletadas para análise a nível proteico por *Western blot*. Para isso, as placas foram conservadas sobre o gelo e os sobrenadantes foram aspirados, em seguida a monocamada foi lavada 2 vezes com PBS 1x gelado. A lise foi feita com tampão de lise contendo 1% de triton X-100 (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM cloreto de sódio; 10 mM pirofosfato de sódio; 20 mM fluoreto de sódio; 5 mM EDTA pH 8,0; 10 mM ortovanadato de sódio; 1 mM PMSF em isopropanol; 10 mM β -glicerofosfato; 10 μ M leupeptina; 1 μ M pepstatina; 4 mM benzamidina HCl hidratada; 2 μ g/mL aprotinina; 1% triton X-100; água deionizada) com o auxílio de *cell scraper* e a quantificação de proteínas foi obtida por reagente de *Bradford* com curva padrão para calibração de BSA a 2 mg/mL em diluição seriada. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm em leitor de placas *EnSpire* (*PerkinElmer, US*). As amostras foram então armazenadas em tampão *Laemmli* (Tris-HCl 0,25 mol/L; 2% SDS; 10% glicerol; 0,001% azul de bromofenol e 5% β -mercaptoetanol) e congeladas a -20°C para uso futuro, caso necessário.

3.10 *Western blot*

A corrida de SDS-PAGE foi realizada em gel contendo gradiente de bis-acrilamida, a corrida foi iniciada a 80 mV por 20 min e após 120 mV por aproximadamente 2h. Em seguida, foi realizada a transferência para membrana de PVDF (difluoreto de polivinilideno), gel e membrana foram acomodados entre uma cama tecidos embebidos em tampão de transferência 1X (2,5 mM Tris base; 19,2 mM glicina). A transferência semi-seca foi realizada no *Trans-blot turbo* (*Bio-Rad Laboratories, Inc., US*) por 7 min a 25 V.

Então, a membrana foi bloqueada com leite em pó com baixo teor de gorduras a 5% por 1h e lavada 3 vezes com tampão TBS-T (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% *Tween* 20) e incubada com os anticorpos primários *overnight* em câmara fria (4°C) sob agitação constante. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: anti-GLS2 (*Abcam, UK #ab113509*), anti- β actina (*ThermoFischer Scientific, US, #A5441*), Proteasomo 26S S2/PSMD2 (*Abcam, UK #ab26078*), este último foi gentilmente doado pela prof. Dra. Letícia Ignácio de Souza Zimmermann do

laboratório de distúrbios do metabolismo (LABDIME) alocado na Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp campus Limeira. No dia seguinte, o excesso de anticorpos foi lavado 3 vezes com TBS-T. A contra-marcação foi feita com o anticorpo secundário da respectiva linhagem em que foi feita a produção do anticorpo primário, incubando a temperatura ambiente por 1h ou 2h. Novamente, lavamos a membrana 3X com TBS-T e revelamos as bandas com luminol *SuperSignal™ West Pico PLUS* (ThermoFischer Scientific, US). A membrana foi levada a um leitor de quimioluminescência *ImageQuant™ 500 LAS* (GE HealthCare Technologies, Inc, US) ou *Chemidoc Imaging system* (Bio-Rad Laboratories, Inc., US).

3.11 Avaliação da função mitocondrial e metabolismo celular por Seahorse

A GAB é uma enzima presente na mitocôndria e tem um papel de grande relevância na produção energética, incluindo o metabolismo tumoral. Dessa maneira, entendimento da modulação de GAB e o seu impacto no metabolismo celular é imprescindível para desvendar alterações energéticas que podem influenciar o comportamento celular. Para avaliação do estresse mitocondrial em células EO771, utilizamos o *kit Seahorse XF Cell Mito Stress* (Agilent Technologies, US, #103015-100). No dia anterior ao ensaio, foram semeadas 3×10^4 células em *Seahorse XF Cell Culture Microplate* (Agilent Technologies, US), para avaliar o estresse mitocondrial gerado por GAB^{high} (GAB.wt, GAB.S219A e controle MCS) ou GAB^{low} (shGAB.3'UTR, shGAB.CDS2 e controle shGFP), as células foram mantidas *overnight* em câmara úmida a 37°C e saturação de 5% de CO₂. Adicionalmente, o cartucho contendo os sensores foi hidratado em *Seahorse XF Calibrant* (Agilent Technologies, US) a 37°C em incubadora livre de CO₂ *overnight* e o equipamento permaneceu ligado *overnight* para estabilização.

No dia seguinte, o meio de ensaio *Seahorse XF DMEM* (Agilent Technologies, US) foi suplementado com 1 mM de piruvato, 2 mM glutamina e 10 mM de glicose. Com o meio de ensaio preparado, diluímos os compostos inibidores 1 µM de oligomicina (complexo V), 1 µM *Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone* (FCCP – complexo IV) e 0,5 µM de rotenona /antimicina A (complexo I e III, respectivamente), que serão carregados no cartucho e injetados sobre as células nesta ordem.

As placas tiveram seus meios aspirados e substituídos pelo meio de ensaio aquecido, após as células foram incubadas por 1h em atmosfera úmida a 37°C e sem injeção de CO₂ seguido de análise metabólica de células em tempo real em leitor *Seahorse XFe24 Analyzer* (Agilent Technologies, US). Ao final da leitura, as células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com DAPI e analisadas no *Operetta® High Content Analysis System* (Perkin Elmer, US) e analisadas no software *Columbus™ Image Data Storage and Analysis system* (Perkin Elmer, US) para normalização dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Construção das linhagens EO771 contendo *knockdown* de GAB

Com objetivo de elucidar os efeitos mecanísticos observados no estudo prévio de (MAFRA, 2021), em que modelos singênicos de câncer de mama induzidos por células EO771 GAB^{high} apresentaram um maior crescimento tumoral, fibrose e necrose tecidual e posteriormente avaliar quais os parceiros de interação com GAB poderiam estar envolvidos nesse efeito, foi constatada que a modulação da expressão gênica de GAB tem um papel importante na biologia tumoral. Dessa maneira, construímos vetores plasmidiais contendo shRNA para *knockdown* dos níveis de GAB endógena para compreender melhor o papel de GAB em células de câncer de mama murino.

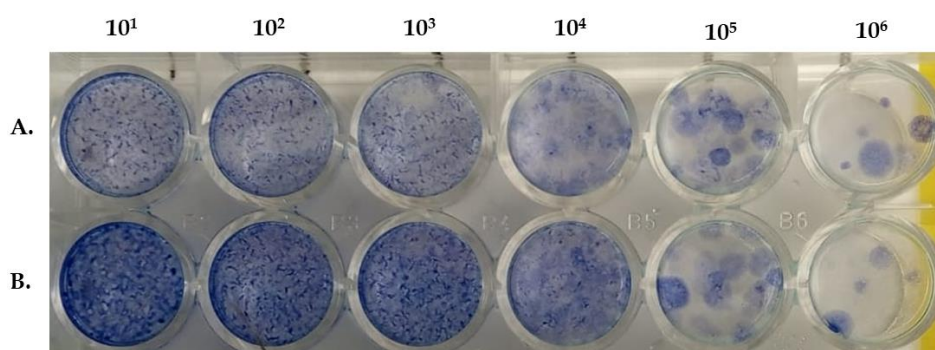


Figura 28. Titulação das partículas virais dos vetores de silenciamento de GAB.

(A.) shGAB.3'UTR e (B.) shGAB.CDS2. Os vírus produzidos foram titulados em células NIH/3T3 contendo meio de seleção puromicina. As células foram fixadas e então coradas com Giemsa para posterior contagem de colônias. Obtemos o título de 5×10^6 UFC/mL para shGAB.3'UTR e 4×10^6 UFC/mL para shGAB.CDS2. A imagem foi capturada utilizando a câmera fotográfica disponível em celular particular da autora.

Para isso, foi realizada a clonagem do plasmídeo pLKO.1 contendo shRNA para duas regiões do mRNA de GAB, 3'UTR e CDS2. Os plasmídeos foram transfectados para células HEK293T para a produção das partículas virais que transportam a maquinaria de silenciamento genético. Após a confirmação do sequenciamento dos vetores e produção das partículas virais, foi determinada a titulação viral para determinação do MOI de transdução. A imagem representativa da titulação é ilustrada na figura 28. A linha (A.) representa a titulação do vetor shGAB.3'UTR com título viral de 5×10^6 UFC/mL e a linha (B.) shGAB.CDS2 com título viral de 4×10^6 UFC/mL.

Após a titulação viral, as células EO771 foram transduzidas e selecionadas com puromicina e então os lisados foram coletados para confirmação do silenciamento por *Western blot*. A figura 29A ilustra as bandas obtidas pela técnica e a figura 29B mostra a quantificação relativa das bandas. Observamos a diminuição da expressão de GAB em ambos, shGAB.3'UTR e shGAB.CDS2 quando comparado com seu controle shGFP, o que confirma o *knockdown* de GAB em nível protéico e além disso, não houve diferença quando comparamos shGAB.3'UTR *versus* shGAB.CDS2.

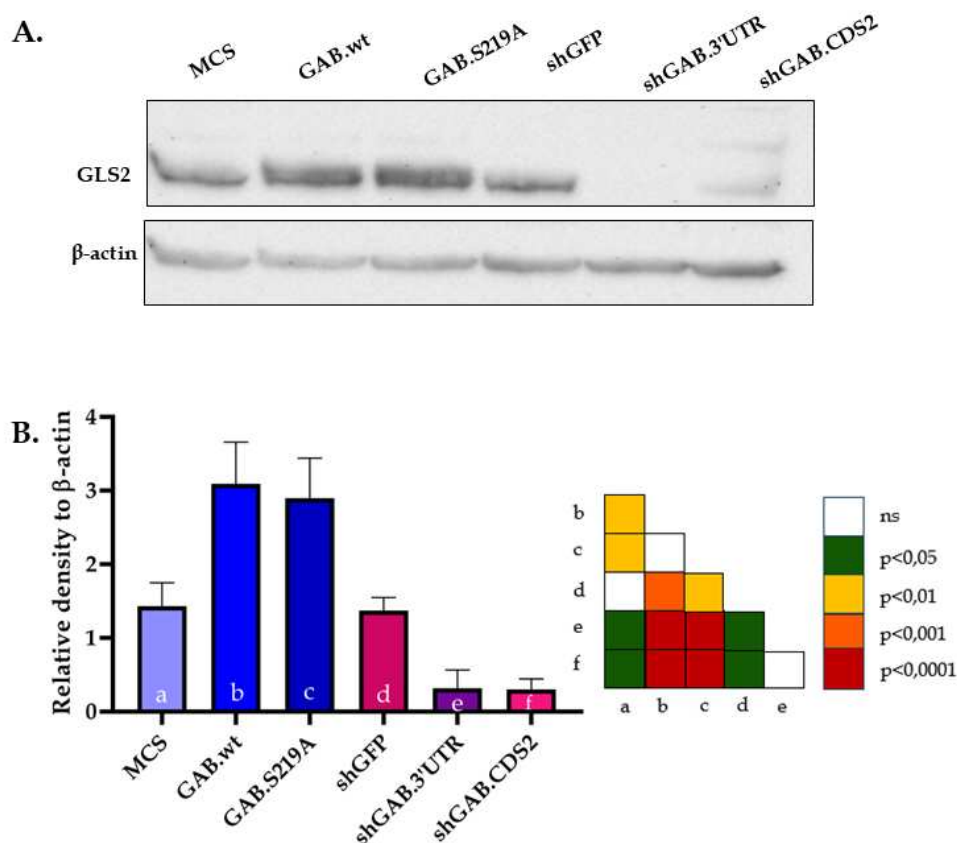


Figura 29. Análise dos níveis de expressão de GAB após silenciamento gênico.

(A) Imagem representativa de membrana de *Western blot*, ilustrando a diminuição da expressão de GAB e (B) quantificação relativa ao controle β-actina por análise de densitometria com o *software* ImageJ. As imagens foram adquiridas por quimioluminescência em *ImageQuant™* LAS 500 (GE HealthCare Technologies, Inc, US). *One-way ANOVA* com *post-test* de *Tukey* foi utilizado para a análise estatística utilizando o *software* *GraphPad Prism* v. 8.0. as significâncias de p estão representadas no quadro de cores ao lado onde branco é não significante (ns); verde p<0,05; amarelo p<0,01, laranja p<0,001 e vinho p<0,0001, n=3.

4.2 Isolamento de proteassomos a partir de células EO771

Para investigar a interação entre o proteassomo e GAB, realizamos uma tentativa de isolar de proteassomos por centrifugação diferencial. Essa metodologia foi utilizada para separar componentes celulares por diferentes tempos e velocidades de rotação com base em seus tamanhos e densidade, dessa forma, as frações foram separadas a partir das linhagens GAB.wt e MCS. O processo inicia com centrifugação a baixa velocidade para separar partículas grandes como o núcleo e células inteiras, seguido de centrifugação intermediária para separar organelas que por ventura

permaneceram intactas e por último a ultracentrifugação para sedimentar partículas como os ribossomos (~4,5 MDa), o proteassomo 26S possui aproximadamente 2,2 MDa e espera-se encontrar no sobrenadante da fração S100C, entretanto, realizamos mais etapas de centrifugações como ilustrado no fluxograma da Figura 30D para garantir detecção em todas frações em caso de perda entre as etapas.

Inicialmente, foi verificado que é possível detectar GAB nas coletas de cada etapa da centrifugação e constatamos que utilizando o lisado de EO771 GAB.wt, os níveis de GAB foram detectáveis até a porção 12' (12000 x g) tanto no sobrenadante (S) quanto no *pellet* (P) conforme ilustra a figura 30 A. Algumas tentativas foram realizadas buscando comparar as linhagens MCS e GAB.wt. Para verificar se há interação entre GAB e PSMD2, analisamos a combinação do painel de anticorpos anti-PSMD2 com anti-GAB (figura 30B) ou anti-V5 (figura 30C), e pode ser observada a marcação de PSMD2 na fração S100, onde era esperado encontrar proteassomo, entretanto não foi possível detectar GAB simultaneamente.

Existem poucos estudos na literatura que relacionam a interação entre GAB e proteassomos, entretanto, dados obtidos em hepatocarcinoma celular, sugerem que a superexpressão de GAB estabiliza Dicer, uma enzima com função de ribonuclease (RNase III), envolvida na clivagem de RNA dupla fita. Essa enzima faz parte da biogênese dos microRNA (miRNA ou miR) e siRNA (*small interfering RNA*) que por sua vez atuam na regulação gênica de diversas vias. A enzima Dicer apresenta-se desregulada em diversas neoplasias. Os dados mostram que o *knockdown* de GAB promoveu a degradação de Dicer, entretanto as amostras foram tratadas com inibidor de proteassomo houve diminuição do efeito. Esses dados sugerem que GAB tem um papel importante na regulação da transcrição de miR34-a (envolvido na regulação da EMT) e essa regulação ocorre com o auxílio da via Ub-proteassomo (KUO et al., 2016). Esse estudo demonstra que, apesar de não ser uma interação óbvia, existem indícios consistentes da função de GAB sobre a via Ub-proteassomo.

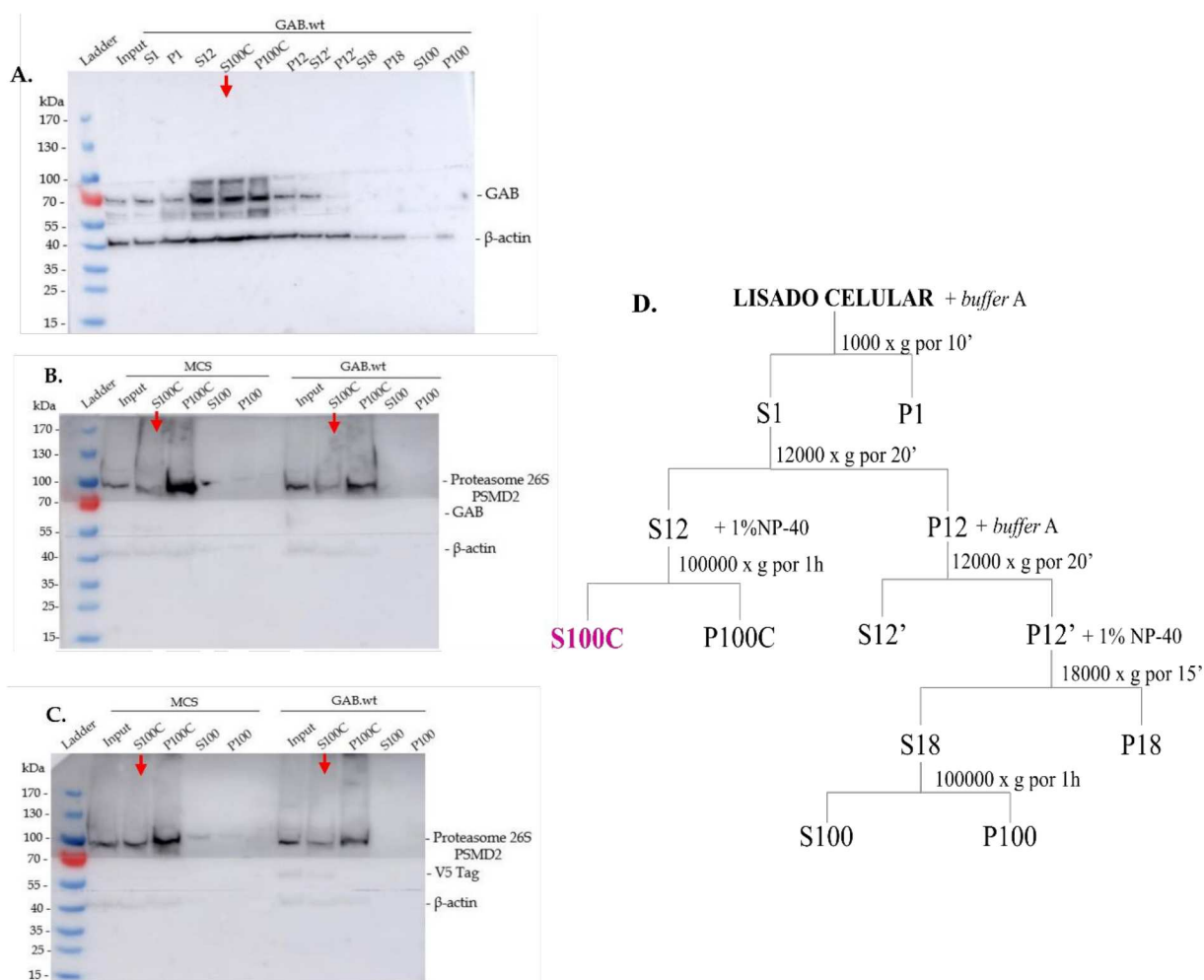


Figura 30. Tentativa de isolamento de proteassomos utilizando centrifugação diferencial.

As imagens são representativas de verificação de proteínas por *Western blot*. A) verificação proteica de todas as etapas das centrifugações do lisado de células GAB.wt, B) avaliando as frações finais de MCS vs GAB.wt e revelado com anticorpo anti-GAB e C) revelado com anticorpo anti-V5. As setas em vermelho apontam as frações S100C em que esperávamos encontrar interação proteassomo-GAB. D) fluxograma seguido para a centrifugação diferencial. As imagens foram adquiridas por quimioluminescência em *ImageQuant™ LAS 500* (GE HealthCare Technologies, Inc, US). Utilizamos anticorpo anti- β -actina como controle e verificamos a presença de proteassomo com o anticorpo anti-PSMD2.

4.3 Imunoprecipitação de GAB

Para determinar a interação entre GAB e proteassomo, realizamos a imunoprecipitação ligando o anticorpo anti-V5 em *beads* de agarose A/G, seguido de incubação com os respectivos lisados celulares MCS, GAB.wt e GAB.S219A. Nossa análise prévia por espectrometria de massas demonstrou interação com as subunidades: PSMD6, PSMD9, PSMC1, PSMC4, PSME1 e PSMB5, porém não houve

evidências de interação com PSMD2. Nós hipotetizamos que o proteassomo possa ter sofrido fragmentação total, visto que é composto por diversas subunidades, por esse motivo, o anticorpo anti-PSMD2 não teve interação com GAB em nossos ensaios, conforme ilustra a figura 31. Mais estudos serão necessários para comprovar a interação GAB/proteassomo.

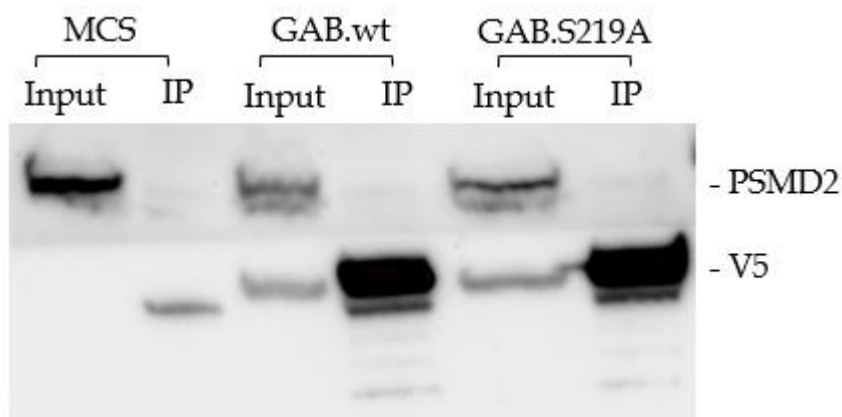


Figura 31. Imunoprecipitação de GAB utilizando a tag V5 conjugada com pérolas de agarose A/G. Os lisados de células EO771 contendo a GAB^{high} (GAB.wt e GAB.S219A), bem como seu controle MCS, foram imunoprecipitados e as proteínas analisadas por *Western blot* para verificação de interação entre PSMD2 (proteassomo) e GAB (V5 tag). As imagens foram adquiridas por quimioluminescência em *ImageQuant™* LAS 500 (GE HealthCare Technologies, Inc, US).

4.4 A modulação da expressão de GAB impacta na proliferação celular

A taxa de proliferação celular foi uma questão intrigante de nosso grupo de pesquisa, pois as linhagens GAB.wt e GAB.S219A não demonstram grande diferença no perfil proliferativo quando comparado com MCS, entretanto, quando comparamos as linhagens shGAB, observamos a diminuição da taxa proliferativa tanto em 72h quanto 96h de análise, sendo aproximadamente a metade da proliferação encontrada no controle shGFP (figura 32). As células EO771 têm um crescimento bastante acelerado e apesar de GAB^{high} não causar grandes alterações no perfil proliferativo, a depleção dos níveis de GAB demonstraram um efeito significativo na diminuição da taxa proliferativa.

A literatura tem evidenciado que a elevação da expressão de GAB tem desempenha um papel protumorigênico importante. Quando GAB foi silenciada em linhagens celulares em tumores de pulmão do tipo não pequenas células (A459) e carcinoma hepatocelular (HepG2) foi observada a diminuição da taxa proliferativa

(LEE *et al.*, 2014), além de diminuir a viabilidade em células QG-56 (carcinoma de células escamosas de pulmão) (YE *et al.*, 2016), mostrando um efeito bastante semelhante ao encontrado no ensaio de proliferação em células de câncer de mama murino EO771. Além disso, a diminuição da expressão de GAB em células de carcinoma cervical resistentes a radiação resultou na mudança no perfil de resistência tornando-as sensíveis ao tratamento (XIANG *et al.*, 2013).

Os altos níveis de expressão de GAB em neoplasias de mama tem se mostrado como uma resposta pró-tumorigênica. Dados obtidos pela equipe, demonstraram que altos níveis de GAB foram detectados em TNBC, evidenciando marcadores envolvidos na EMT, propiciando o surgimento de invasão e metástases, entretanto o silenciamento de GAB promoveu diminuição da taxa replicativa (DIAS *et al.*, 2020). No subtipo luminal, também foram encontrados altos níveis de GAB correlacionados com o aumento GATA-3, um fator de transcrição de grande importância na regulação da diferenciação celular (LUKEY *et al.*, 2019). A análise dos resultados apresentados na figura 32 seguem alinhados ao perfil de resposta observado na literatura e destacam a importância de GAB no metabolismo tumoral.

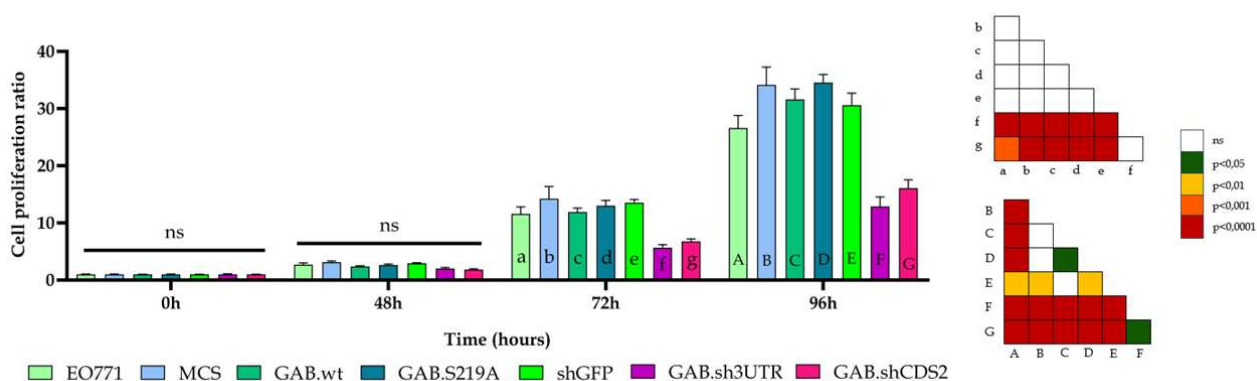


Figura 32. Proliferação de células EO771 GAB^{high} e GAB^{low} ao longo do tempo.

As células GAB^{high} e GAB^{low}, juntamente com seus respectivos controles foram analisadas ao longo de 96h. As imagens foram adquiridas por fluorescência de DAPI em *Operetta® CLS™ high throughput microplate imager for high-content analysis* (Perkin Elmer, US) e analisadas no *software Columbus™ Image Data Storage and Analysis System* (Perkin Elmer, US). One-way ANOVA com post-test de Tukey foi utilizado para a análise estatística utilizando o *software GraphPad Prism v. 8.0*. A análise estatística está representada no quadro de cores ao lado, onde branco é não significativo (ns); verde p<0,05; amarelo p<0,01, laranja p<0,001 e vinho p<0,0001, n=3.

4.5 A privação de cistina influencia na viabilidade de células com baixa expressão de GAB

Buscamos explorar o mecanismo pelo qual GAB pudesse estar diminuindo a resposta imune e dados da literatura apontam o papel da ferroptose mediada por privação de cistina (SHIN *et al.*, 2020). Células que entram em ferroptose, liberam sinais de perigo como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e metabólitos que podem recrutar células imunes (SHI *et al.*, 2022) e GAB parece ter um papel central em promover a ferroptose (SUZUKI *et al.*, 2023). A cistina é precursora de um potente antioxidante, a GSH e, com a depleção deste aminoácido, alguns tipos de tumores, como os de mama, perdem o balanço redox, levando a morte celular mediada por ferroptose (GAO *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2020). Além disso, a glutaminólise pode ser indutora de ferroptose, um fenômeno que somente acontece quando há disponibilidade de glutamina e privação de cistina (SHIN *et al.*, 2020).

A proliferação das células MCS, GAB.wt e GAB.S219A foi avaliada para a elucidar o efeito da depleção dos níveis de cistina. Para entender até que ponto as células suportam a privação do aminoácido, foi realizado um ensaio preliminar acompanhando as células hora a hora durante 24h para verificarmos os efeitos da privação de aminoácido, nessa análise, não observamos diferenças significativas (dados não mostrados). Dessa maneira, seguimos com a avaliação da taxa proliferativa e não observamos diferenças significativas em 24 e 48h. Entretanto, a partir de 72h observamos uma diminuição significativa na taxa proliferativa (figura 33) e em 96h essa diferença foi ainda maior. Se a diminuição no número de células foi devido a ferroptose, de fato, não foi avaliada, entretanto, expressão de GAB.S219A ou GAB.wt não afetou este processo.

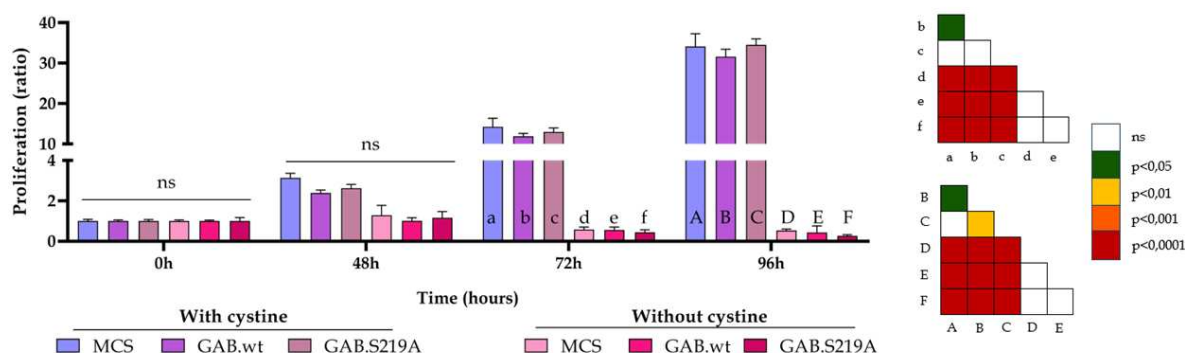


Figura 33. Proliferação celular na privação de cistina sobre as células MCS, GAB.wt e GAB.S219A.

A proliferação celular ao longo de tempo, acompanhada por 96h. As imagens foram obtidas em campo claro e fluorescência de DAPI, em *Operetta® CLS™ high throughput microplate imager for high-content analysis* (Perkin Elmer, US) e analisadas no *software Columbus™ Image Data Storage and Analysis System* (Perkin Elmer, US). *One-way e two-way ANOVA* com *post-test* de *Tukey* foram utilizados para as análises estatísticas utilizando o *software GraphPad Prism v. 8.0*. A análise estatística está representada no quadro de cores ao lado, onde branco é não significativo (ns); verde p<0,05; amarelo p<0,01, laranja p<0,001 e vinho p<0,0001, n=3.

4.6 A modulação de GAB impacta a expressão de MHC I em células de câncer de mama murino

Para confirmarmos os dados prévios de co-IP, analisamos a exposição de MHC I na superfície das linhagens GAB^{high} e GAB^{low} em relação aos seus respectivos controles. Realizamos a marcação extracelular de MHC I (APC) e após as células foram permeabilizadas e a tag V5 foi marcada com PE. A estratégia de *gating* está ilustrada na figura 34 A, onde excluímos os *doublets* e selecionando apenas *single cells*. Separamos as populações V5 negativas (V5-) e V5 positivas (V5+) para a análise, comparamos a marcação de MHC I na população V5+ (GAB.wt e GAB.S219A) com seu respectivo controle MCS que não possui a tag V5 e o mesmo foi feito para as células GAB^{low}, porém, essas são V5-.

A figura 34 B ilustra os histogramas representativos da comparação entre os grupos analisados. Os histogramas foram normalizados pela moda e a média geométrica foi calculada, para assim quantificarmos a diferença entre as linhagens e o tratamento de privação de cistina e o resultado está representado na figura 34 C. Os resultados demonstram que houve um aumento significativo de fluorescência de MHC I na superfície das células GAB^{high} (GAB.wt e GAB.S219A) quando comparamos com o controle MCS, aliado à diminuição significativa da fluorescência de MHC I nas

células GAB^{low} (shGAB.3'UTR e shGAB.CDS2) e esse efeito foi independente da privação de cistina. Uma vez que MHC I expostos na membrana são carregados de antígeno (DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021), estes resultados foram na contramão da nossa hipótese de que superexpressão de GAB estaria relacionada a menor exposição de antígenos por MHC I na superfície das células tumorais mamárias.

A superexpressão de GAB promove um aumento do metabolismo podendo levar a maior produção de ATP, fornecendo mais intermediários metabólicos como o glutamato e o α -KG, além da regulação de vias de sinalização ligados à proliferação e sobrevivência, como o oncogene MYC (XIAO *et al.*, 2015) e ao gene supressor tumoral p53 (MATES *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2010). Além disso, o retículo endoplasmático tem papel fundamental no empacotamento de proteínas, em especial o MHC I e os dados demonstrados indicam que GAB desempenha atividade de regulação de estresse do retículo endoplasmático de linfócitos T cultivados com células tumorais (WANG *et al.*, 2022). Os dados aqui obtidos, demonstram que GAB possui um papel importante na modulação da expressão de MHC I, indicando uma integração do metabolismo da glutamina o seu papel regulador de MHC I, sugerindo que a GAB atua como um elo entre o metabolismo tumoral e a modulação imunológica do TME.

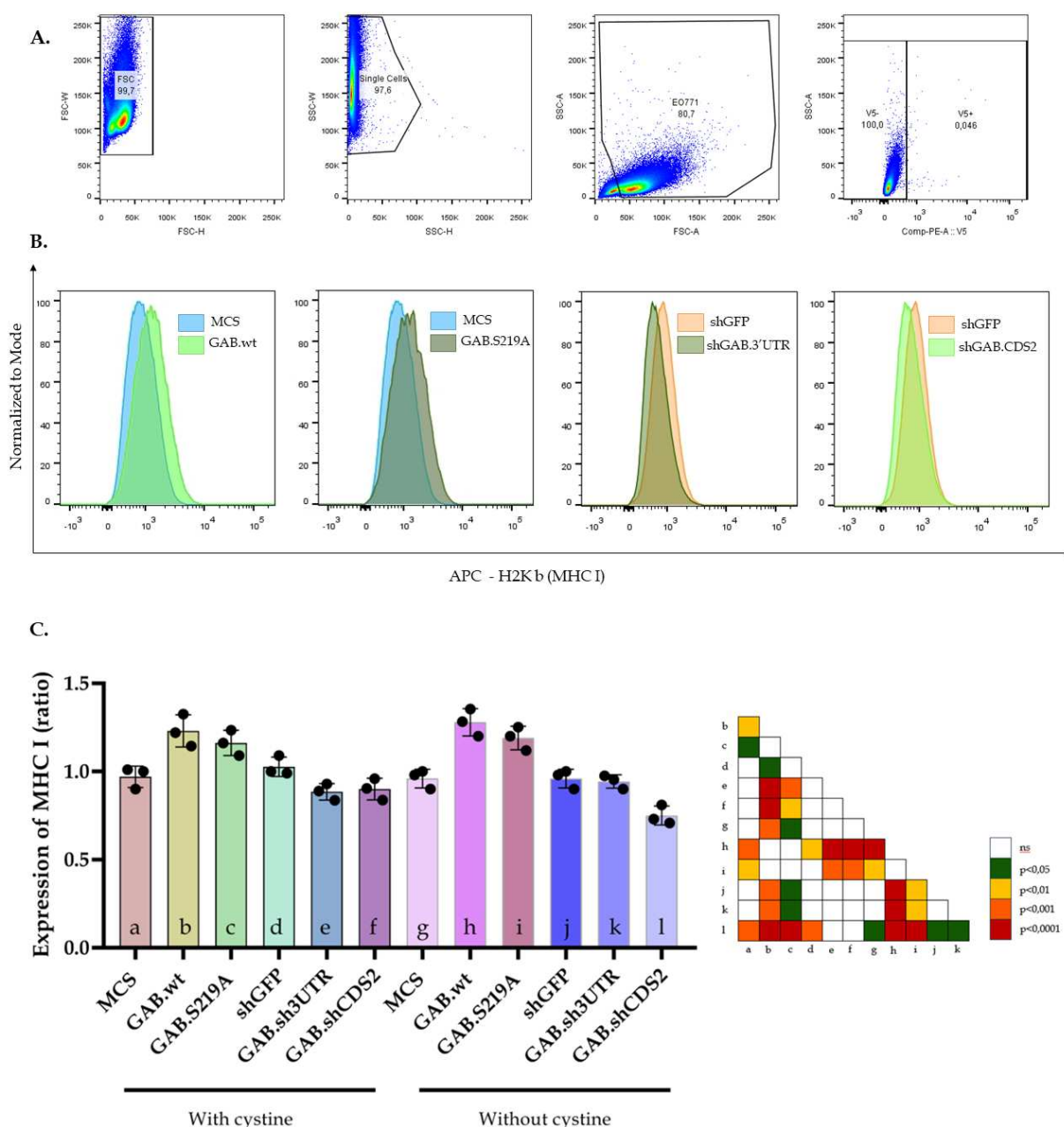


Figura 34. Investigação da expressão de MHC I na superfície de células EO771 GAB^{high} e GAB^{low}

(A) estratégia de *gating* utilizada na análise dos dados e (B) histogramas representativos da aquisição e (C) análise estatística das células com superexpressão ou silenciamento de GAB e seus respectivos controles. As células foram marcadas superficialmente com MHC I (APC) e após permeabilizadas e marcadas com anti-V5 (PE). A análise foi dividida entre células V5- ou V5+ e a marcação de MHC I foi avaliada dentro deste *gate*, seguido de medida média geométrica dos histogramas normalizados pela moda. A aquisição foi feita em citômetro de fluxo *FACS Canto II™* (BD Biosciences, US) e analisadas no software *FlowJo™* v.10 (BD Biosciences, US). *One-way ANOVA* com *post-test* de *Tukey* foi utilizado para a análise estatística utilizando o software *GraphPad Prism* v. 8.0. A análise estatística está representada no quadro de cores ao lado, onde branco é não significativo (ns); verde p<0,05; amarelo p<0,01, laranja p<0,001 e vinho p<0,0001, n=3.

4.7 Consumo de oxigênio e acidificação extracelular por células GAB^{high}

As glutaminases exercem um papel central nas reações anapleróticas para alimentar o TCA e são essenciais para organismos que utilizam a aerobiose (CRUZAT et al., 2018; LI et al., 2023). Nesse sentido, realizamos ensaios preliminares para compreender as alterações que as células possam apresentar quanto a GAB^{high} ou GAB^{low} . Para isso, analisamos a taxa de consumo de oxigênio (OCR) e a taxa de acidificação extracelular do meio de cultivo (ECAR). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens (figura 35). Mais ensaios são necessários para determinar o real efeito de GAB sobre o OCR e ECAR das linhagens derivadas de EO771.

Tumores frequentemente exibem adaptação metabólica sob condições adversas, como a falta de oxigênio e de nutrientes (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). O consumo de oxigênio é um indicador-chave do metabolismo energético celular, onde a atividade de GAB impacta a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e consequentemente na geração de ATP (WANG et al., 2024). Por outro lado, a acidificação do meio de cultivo celular revela a produção de ácido láctico, principal subproduto da glicólise aeróbica, um fenômeno comum em células tumorais conhecido como efeito Warburg (WANG; PATTI, 2023), destacando ainda mais o papel de GAB no TME.

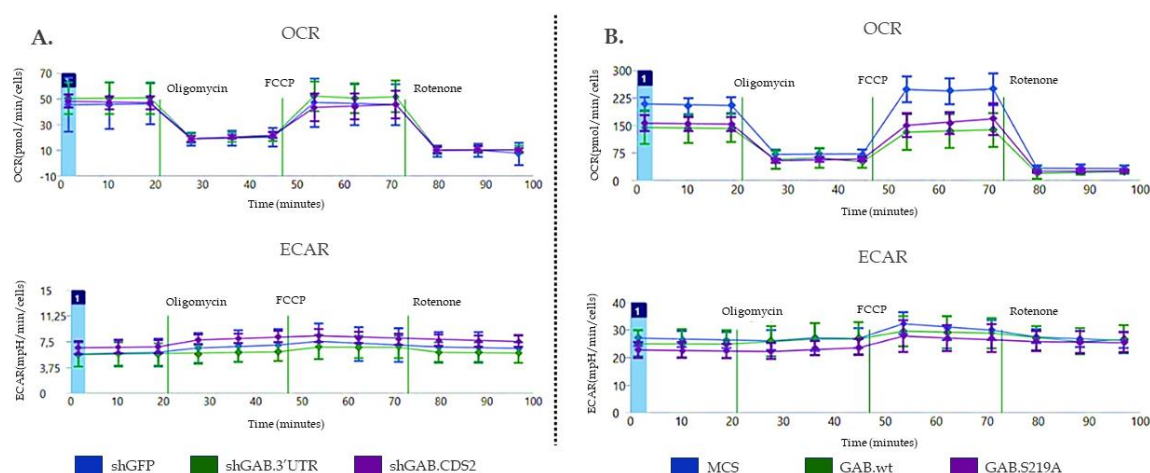


Figura 35. Análise do consumo de oxigênio e acidificação do meio de EO771 GAB^{high} e GAB^{low}

Efeito da inibição da cadeia de transporte de elétrons com oligomicina, FCCP e rotenona sobre a taxa de consumo de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR) de células EO771 (A) GAB^{low} (shGAB.3'UTR, shGAB.CDS2) e controle shGFP e (B) GAB^{high} (GAB.wt e GAB.S219A) e o controle MCS. A aquisição dos dados foi realizada em leitor de placas *Seahorse XF* (Agilent Technologies, US) e os dados normalizados pelo número de células.

5. CONCLUSÕES

A compreensão do papel do GAB no microambiente tumoral foi motivada por dados prévios obtidos em modelo murino que indicaram um aumento do volume tumoral. Através de análises *in sílico*, determinamos que esse efeito poderia estar associado ao processamento e à apresentação de antígenos por MHC I.

Contrariando a hipótese inicial, foi observado de forma inédita que a modulação da expressão de GAB promove um aumento na exposição de moléculas de MHC I em células de câncer de mama GAB^{high}. Em contraste, células GAB^{low} apresentaram redução significativa da expressão de MHC I. Esses achados sugerem um elo entre a atividade metabólica modulada pela GAB e a regulação da apresentação antigênica no contexto tumoral.

Esses resultados abrem novas perspectivas para investigar os mecanismos moleculares que conectam o metabolismo tumoral à modulação de infiltrados imunológicos. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer os processos biológicos responsáveis pela regulação da exposição de MHC I e para determinar se essa modulação está diretamente relacionada ao aumento do volume tumoral observado em camundongos no estudo prévio.

REFERÊNCIAS

- ABBASI KAJANI, A.; HAGHJOOY JAVANMARD, S.; ASADNIA, M.; RAZMJOU, A. Recent Advances in Nanomaterials Development for Nanomedicine and Cancer. **ACS Applied Bio Materials**, vol. 4, no. 8, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00591>.
- ABUBAKAR, M.; FIGUEROA, J.; ALI, H. R.; BLOWS, F.; LISSOWSKA, J.; CALDAS, C.; EASTON, D. F.; SHERMAN, M. E.; GARCIA-CLOSAS, M.; DOWSETT, M.; PHAROAH, P. D. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and KI67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. **Modern Pathology**, vol. 32, no. 9, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0270-4>.
- ADAMOSKI, D.; DIAS, M. M.; QUESÑAY, J. E. N.; YANG, Z.; ZAGORIY, I.; STEYER, A. M.; RODRIGUES, C. T.; DA SILVA BASTOS, A. C.; DA SILVA, B. N.; COSTA, R. K. E.; DE ABREU, F. M. O.; ISLAM, Z.; CASSAGO, A.; VAN HEEL, M. G.; CONSONNI, S. R.; MATTEI, S.; MAHAMID, J.; PORTUGAL, R. V.; AMBROSIO, A. L. B.; DIAS, S. M. G. Molecular mechanism of glutaminase activation through filamentation and the role of filaments in mitophagy protection. **Nature Structural and Molecular Biology**, vol. 30, no. 12, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01118-0>.
- ADASHEK, J. J.; KATO, S.; PABLA, S.; NESLINE, M.; CONROY, J. M.; SUBBIAH, V.; DEPIETRO, P.; KURZROCK, R. LAG3 transcriptomic expression correlates with high levels of PD-1, PD-L1, PD-L2, and CTLA-4 checkpoints and with high tumor mutational burden across cancers. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 40, no. 16_suppl, 2022. https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.2561.
- AFTAB, S.; SHAH, A.; NADHMAN, A.; KURBANOGU, S.; AYSIL OZKAN, S.; DIONYSIOU, D. D.; SHUKLA, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 540, no. 1–2, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.007>.
- ALEIXO, G. F. P.; SHACHAR, S. S.; DEAL, A. M.; NYROP, K. A.; MUSS, H. B.; CHEN, Y. T.; YU, H.; WILLIAMS, G. R. The association of body composition parameters and

adverse events in women receiving chemotherapy for early breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, vol. 182, no. 3, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05731-1>.

ARNOLD, P. K.; FINLEY, L. W. S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 299, no. 2, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102838>.

ARROYO-OLARTE, R. D.; BRAVO RODRÍGUEZ, R.; MORALES-RÍOS, E. Genome editing in bacteria: Crispr-cas and beyond. **Microorganisms**, vol. 9, no. 4, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040844>.

AUSEJO-MAULEON, I.; LABIANO, S.; DE LA NAVA, D.; LASPIDEA, V.; ZALACAIN, M.; MARRODÁN, L.; GARCÍA-MOURE, M.; GONZÁLEZ-HUARRIZ, M.; HERVÁS-CORPIÓN, I.; DHANDAPANI, L.; VICENT, S.; COLLANTES, M.; PEÑUELAS, I.; BECHER, O. J.; FILBIN, M. G.; JIANG, L.; LABELLE, J.; DE BIAGI-JUNIOR, C. A. O.; NAZARIAN, J.; ... ALONSO, M. M. TIM-3 blockade in diffuse intrinsic pontine glioma models promotes tumor regression and antitumor immune memory. **Cancer Cell**, vol. 41, no. 11, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.09.001>.

BAKIR, B.; CHIARELLA, A. M.; PITARRESI, J. R.; RUSTGI, A. K. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. **Trends in Cell Biology**, vol. 30, no. 10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.003>.

BALANÇA, C. C.; SALVIONI, A.; SCARLATA, C. M.; MICHELAS, M.; MARTINEZ-GOMEZ, C.; GOMEZ-ROCA, C.; SARRADIN, V.; TOSOLINI, M.; VALLE, C.; PONT, F.; FERRON, G.; GLADIEFF, L.; VERGEZ, S.; DUPRET-BORIES, A.; MERY, E.; ROCHAIX, P.; FOURNIÉ, J. J.; DELORD, J. P.; DEVAUD, C.; ... AYYOUB, M. PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating, exhausted PD-1hiCD39+ CD4 T cells. **JCI Insight**, vol. 6, no. 2, 2021. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142513>.

BARENHOLZ, Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, vol. 160, no. 2, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.

BARUA, D.; GUPTA, A.; GUPTA, S. Targeting the IRE1-XBP1 axis to overcome endocrine resistance in breast cancer: Opportunities and challenges. **Cancer Letters**, vol. 486, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.020>.

BASSI, M.; SANTINELLO, I.; BEVILACQUA, A.; BASSI, P. Nanotechnology: a big revolution from the small world. **Urologia**, vol. 80, no. 1, 2013. <https://doi.org/10.5301/RU.2013.10620>.

BEŇAČKA, R.; SZABÓOVÁ, D.; GULÁŠOVÁ, Z.; HERTELYOVÁ, Z.; RADOŇÁK, J. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. **Cancers**, vol. 14, no. 21, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14215444>.

BENVENUTO, M.; FOCACCETTI, C.; IZZI, V.; MASUELLI, L.; MODESTI, A.; BEI, R. Tumor antigens heterogeneity and immune response-targeting neoantigens in breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 72, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.023>.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, vol. 235, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

BIGANZOLI, L.; CINIERI, S.; BERARDI, R.; PEDERSINI, R.; MCCARTNEY, A.; MINISINI, A. M.; CAREMOLI, E. R.; SPAZZAPAN, S.; MAGNOLFI, E.; BRUNELLO, A.; RISI, E.; PALUMBO, R.; LEO, S.; COLLEONI, M.; DONATI, S.; DE PLACIDO, S.; ORLANDO, L.; PISTELLI, M.; PAROLIN, V.; ... MOTTINO, G. EFFECT: a randomized phase II study of efficacy and impact on function of two doses of nab-paclitaxel as first-line treatment in older women with advanced breast cancer. **Breast Cancer Research**, vol. 22, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01319-1>.

BILARDO, R.; TRALDI, F.; VDOVCHENKO, A.; RESMINI, M. Influence of surface chemistry and morphology of nanoparticles on protein corona formation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, vol. 14, no. 4, 2022. <https://doi.org/10.1002/wnan.1788>.

BOORJIAN, S. A.; ALEMOZAFFAR, M.; KONETY, B. R.; SHORE, N. D.; GOMELLA, L. G.; KAMAT, A. M.; BIVALACQUA, T. J.; MONTGOMERY, J. S.; LERNER, S. P.; BUSBY, J. E.; POCH, M.; CRISPEN, P. L.; STEINBERG, G. D.; SCHUCKMAN, A. K.; DOWNS, T. M.; SVATEK, R. S.; MASHNI, J.; LANE, B. R.; GUZZO, T. J.; ... DINNEY, C. P. N. Intravesical nadofaragene firadenovec gene therapy for BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: a single-arm, open-label, repeat-dose clinical trial. **The Lancet Oncology**, vol. 22, no. 1, 2021. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30540-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30540-4).

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, no. 13, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>.

BRITO BALEEIRO, R.; LIU, P.; CHARD DUNMALL, L. S.; DI GIOIA, C.; NAGANO, A.; CUTMORE, L.; WANG, J.; CHELALA, C.; NYAMBURA, L. W.; WALDEN, P.; LEMOINE, N.; WANG, Y. Personalized neoantigen viro-immunotherapy platform for triple-negative breast cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, vol. 11, no. 8, 2023. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-007336>.

BRUNO, A.; MORTARA, L.; BACI, D.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A. Myeloid Derived Suppressor Cells Interactions With Natural Killer Cells and Pro-angiogenic Activities: Roles in Tumor Progression. **Frontiers in immunology**, vol. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00771>.

BÜCKER, L.; LEHMANN, U. CDH1 (E-cadherin) Gene Methylation in Human Breast Cancer: Critical Appraisal of a Long and Twisted Story. **Cancers**, vol. 14, no. 18, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14184377>.

BUCZKOWSKA, J.; SZELIGA, M. Two Faces of Glutaminase GLS2 in Carcinogenesis. **Cancers**, vol. 15, no. 23, 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15235566>.

BUDENHOLZER, L.; CHENG, C. L.; LI, Y.; HOCHSTRASSER, M. Proteasome Structure and Assembly. **Journal of Molecular Biology**, vol. 429, no. 22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>.

CAPUOZZO, M.; CELOTTO, V.; SANTORSOLA, M.; FABOZZI, A.; LANDI, L.; FERRARA, F.; BORZACCHIELLO, A.; GRANATA, V.; SABBATINO, F.; SAVARESE, G.; CASCELLA, M.; PERRI, F.; OTTAIANO, A. Emerging treatment approaches for triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, vol. 41, no. 1, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02257-6>.

CARLINO, M. S.; KHATTAK, A.; WEBER, J. S.; MENIAWY, T.; SULLIVAN, R. J.; TAYLOR, M. H.; KIM, K. B.; MCKEAN, M.; FARIES, M. B.; COWEY, C. L.; GIBNEY, G. T.; LUKE, J. J.; THOMAS, S. S.; SEHGAL, V.; FELDMAN, I.; AANUR, P.; BROWN, M.; MEEHAN, R. S.; ROBERT-TISSOT, C.; LONG, G. V. Minimal residual disease by circulating tumor DNA as a biomarker of recurrence free survival in resected high-risk melanoma patients treated with mRNA-4157/V940, a personalized cancer vaccine, and pembrolizumab. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 41, no. 17_suppl, 2023. https://doi.org/10.1200/jco.2023.41.17_suppl.lba9515.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, vol. 407, no. 6801, 2000. <https://doi.org/10.1038/35025220>.

CEDERKVIST, H.; KOLAN, S. S.; WIK, J. A.; SENER, Z.; SKÅLHEGG, B. S. Identification and characterization of a novel glutaminase inhibitor. **FEBS Open Bio**, vol. 12, no. 1, p. 163–174, 1 Jan. 2022. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13319>.

CELIÀ-TERRASSA, T.; KANG, Y. How important is EMT for cancer metastasis? **PLoS Biology**, vol. 22, no. 2 February, 2024. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002487>.

ÇETIN, G.; KLAFAK, S.; STUDENCKA-TURSKI, M.; KRÜGER, E.; EBSTEIN, F. The ubiquitin–proteasome system in immune cells. **Biomolecules**, vol. 11, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11010060>.

CHEN, W.; QIN, Y.; LIU, S. Cytokines, breast cancer stem cells (BCSCs) and chemoresistance. **Clinical and Translational Medicine**, vol. 7, no. 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0205-6>.

CHEN, Y. C.; LOU, X.; ZHANG, Z.; INGRAM, P.; YOON, E. High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photo Dynamic Therapy in 3D Cell Cultures. **Scientific Reports**, vol. 5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep12175>.

CHEN, Z.; WANG, Y.; LU, X.; CHEN, H.; KONG, Y.; RONG, L.; WANG, G. The immune regulation and therapeutic potential of the SMAD gene family in breast cancer. **Scientific Reports**, vol. 14, no. 1, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57189-6>.

CHEUKFAI, L. I.; ZHANG, G.; WANG, Y.; CHEN, B.; LI, K.; CAO, L.; REN, C.; WEN, L.; JIA, M.; MOK, H.; LAI, J.; XIAO, W.; LI, X.; LIAO, N. Spectrum of MAP3K1 mutations in breast cancer is luminal subtype-predominant and related to prognosis. **Oncology Letters**, vol. 23, no. 2, 2022. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13187>.

CHICHIARELLI, S.; ALTIERI, F.; PAGLIA, G.; RUBINI, E.; MINACORI, M.; EUFEMI, M. ERp57/PDIA3: new insight. **Cellular and Molecular Biology Letters**, vol. 27, no. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00315-x>.

CHIRIO, D.; GALLARATE, M.; PEIRA, E.; BATTAGLIA, L.; MUNTONI, E.; RIGANTI, C.; BIASIBETTI, E.; CAPUCCHIO, M. T.; VALAZZA, A.; PANCIANI, P.; LANOTTE, M.; ANNOVAZZI, L.; CALDERA, V.; MELLAI, M.; FILICE, G.; CORONA, S.; SCHIFFER, D. Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 88, no. 3, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.10.017>.

CICIRÒ, Y.; SALA, A. MYB oncoproteins: emerging players and potential therapeutic targets in human cancer. **Oncogenesis**, vol. 10, no. 2, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00309-y>.

CLAIBORNE, M. D.; LEONE, R. Differential glutamine metabolism in the tumor microenvironment – studies in diversity and heterogeneity: A mini-review. **Frontiers in Oncology**, vol. 12, 20 Sep. 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1011191>.

COMPAGNONE, M.; CIFALDI, L.; FRUCI, D. Regulation of ERAP1 and ERAP2 genes and their disfunction in human cancer. **Human Immunology**, vol. 80, no. 5, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.02.014>.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, vol. 339, no. 6121, 2013. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.

CRUZAT, V.; ROGERO, M. M.; KEANE, K. N.; CURI, R.; NEWSHOLME, P. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients**, vol. 10, no. 11, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10111564>.

DARAMY, K.; PUNNABHUM, P.; HUSSAIN, M.; MINELLI, C.; PEI, Y.; RATTRAY, N. J. W.; PERRIE, Y.; RATTRAY, Z. Nanoparticle Isolation from Biological Media for Protein Corona Analysis: The Impact of Incubation and Recovery Protocols on Nanoparticle Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 113, no. 9, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.12.021>.

DAVEY, M. G.; HYNES, S. O.; KERIN, M. J.; MILLER, N.; LOWERY, A. J. Ki-67 as a prognostic biomarker in invasive breast cancer. **Cancers**, vol. 13, no. 17, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13174455>.

DE JESUS, Marcelo B.; RADAIC, A.; HINRICHS, W. L. J.; FERREIRA, C. V.; DE PAULA, E.; HOEKSTRA, D.; ZUHORN, I. S. Inclusion of the helper lipid dioleoyl-

phosphatidylethanolamine in solid lipid nanoparticles inhibits their transfection efficiency. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, vol. 10, no. 2, 2014. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1804>.

DE JESUS, Marcelo Bispo; FERREIRA, C. V.; DE PAULA, E.; HOEKSTRA, D.; ZUHORN, I. S. Design of solid lipid nanoparticles for gene delivery into prostate cancer. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, vol. 148, no. 1, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.065>.

DE JESUS, Marcelo Bispo; RADAIC, A.; ZUHORN, I. S.; DE PAULA, E. Microemulsion extrusion technique: A new method to produce lipid nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, vol. 15, no. 10, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1960-3>.

DE LUCA, A.; ABATE, R. E.; RACHIGLIO, A. M.; MAIELLO, M. R.; ESPOSITO, C.; SCHETTINO, C.; IZZO, F.; NASTI, G.; NORMANNO, N. FGFR fusions in cancer: From diagnostic approaches to therapeutic intervention. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 18, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21186856>.

DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; DELGADO, D.; SOLINÍS, M. A.; GASCÓN, A. R.; PEDRAZ, J. L. Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: Transfection and intracellular trafficking in RPE cells. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 360, no. 1–2, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.023>.

DEL PRETE, A.; SALVI, V.; SORIANI, A.; LAFFRANCHI, M.; SOZIO, F.; BOSISIO, D.; SOZZANI, S. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. **Cellular and Molecular Immunology**, vol. 20, no. 5, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-00990-6>.

DELGADO, D.; GASCÓN, A. R.; DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; ECHEVARRÍA, E.; RUIZ DE GARIBAY, A. P.; RODRÍGUEZ, J. M.; SOLINÍS, M. Á. Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. **International Journal**

of **Pharmaceutics**, vol. 425, no. 1–2, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.052>.

DENG, L.; MENG, T.; CHEN, L.; WEI, W.; WANG, P. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 5, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0107-0>.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. **Nature**, vol. 425, no. 6958, 2003.
<https://doi.org/10.1038/nature02006>.

DHATCHINAMOORTHY, K.; COLBERT, J. D.; ROCK, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568>.

DI SPIRITO, N. A.; GRIZZUTI, N.; LUTZ-BUENO, V.; URCIUOLI, G.; AURIEMMA, F.; PASQUINO, R. Pluronic F68 Micelles as Carriers for an Anti-Inflammatory Drug: A Rheological and Scattering Investigation. **Langmuir**, vol. 40, no. 2, 2024.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03682>.

DIAS, M. M.; ADAMOSKI, D.; DOS REIS, L. M.; ASCENÇÃO, C. F. R.; DE OLIVEIRA, K. R. S.; MAFRA, A. C. P.; DA SILVA BASTOS, A. C.; QUINTERO, M.; DE G. CASSAGO, C.; FERREIRA, I. M.; FIDELIS, C. H. V.; ROCCO, S. A.; BAJGELMAN, M. C.; STINE, Z.; BERINDAN-NEAGOE, I.; CALIN, G. A.; AMBROSIO, A. L. B.; DIAS, S. M. G. GLS2 is protumorigenic in breast cancers. **Oncogene**, vol. 39, no. 3, p. 690–702, 16 Jan. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1007-z>.

DING, X.; XI, W.; JI, J.; CAI, Q.; JIANG, J.; SHI, M.; YU, Y.; ZHU, Z.; ZHANG, J. HGF derived from cancer-associated fibroblasts promotes vascularization in gastric cancer via PI3K/AKT and ERK1/2 signaling. **Oncology Reports**, vol. 40, no. 2, 2018.
<https://doi.org/10.3892/or.2018.6500>.

DIRSCHERL, C.; LÖCHTE, S.; HEIN, Z.; KOPICKI, J. D.; HARDERS, A. R.; LINDEN, N.; KARNER, A.; PREINER, J.; WEGHUBER, J.; GARCIA-ALAI, M.; UETRECHT, C.; ZACHARIAS, M.; PIEHLER, J.; LANZERSTORFER, P.; SPRINGER, S. Dissociation of $\beta 2m$ from MHC class I triggers formation of noncovalent transient heavy chain dimers. **Journal of Cell Science**, vol. 135, no. 9, 2022. <https://doi.org/10.1242/jcs.259498>.

DIZAJ, S. M.; JAFARI, S.; KHOSROUSHAHI, A. Y. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors. **Nanoscale Research Letters**, vol. 9, no. 1, 2014. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-252>.

DOLAI, J.; MANDAL, K.; JANA, N. R. Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. **ACS Applied Nano Materials**, vol. 4, no. 7, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00987>.

DONEPUDI, M. S.; KONDAPALLI, K.; AMOS, S. J.; VENKANTESHAN, P. Breast cancer statistics and markers. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, vol. 10, no. 3, 2014. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.137927>.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, vol. 346, no. 6213, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.

DUFFY, M. J.; SYNNOTT, N. C.; CROWN, J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. **Breast Cancer Research and Treatment**, vol. 170, no. 2, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4753-7>.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, vol. 5, no. OCT, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.

EIRO, N.; GONZÁLEZ, L.; MARTÍNEZ-ORDOÑEZ, A.; FERNANDEZ-GARCIA, B.; GONZÁLEZ, L. O.; CID, S.; DOMINGUEZ, F.; PEREZ-FERNANDEZ, R.; VIZOSO, F.

J. Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. **Cellular Oncology**, vol. 41, no. 4, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>.

FÀBREGAS, A.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, N.; TICÓ, J. R.; GARCÍA-MONTOYA, E.; PÉREZ-LOZANO, P.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; HERNÁNDEZ-MUNAIN, C.; SUÑÉ, C.; MIÑARRO, M. A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 473, no. 1–2, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.022>.

FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A.; FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 5, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.

FARHEEN, J.; HOSMANE, N. S.; ZHAO, R.; ZHAO, Q.; IQBAL, M. Z.; KONG, X. Nanomaterial-assisted CRISPR gene-engineering – A hallmark for triple-negative breast cancer therapeutics advancement. **Materials Today Bio**, vol. 16, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100450>.

FERHAN, A. R.; PARK, S.; PARK, H.; TAE, H.; JACKMAN, J. A.; CHO, N. J. Lipid Nanoparticle Technologies for Nucleic Acid Delivery: A Nanoarchitectonics Perspective. **Advanced Functional Materials**, vol. 32, no. 37, 2022. <https://doi.org/10.1002/adfm.202203669>.

FLEMING, V.; HU, X.; WEBER, R.; NAGIBIN, V.; GROTH, C.; ALTEVOGT, P.; UTIKAL, J.; UMANSKY, V. Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, no. MAR, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00398>.

FLISTER, M. J.; BERGOM, C. Genetic Modifiers of the Breast Tumor Microenvironment. **Trends in Cancer**, vol. 4, no. 6, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.04.003>.

FOROOZANDEH, P.; AZIZ, A. A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, vol. 13, 2018. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>.

FRANGOUL, H.; ALTSHULER, D.; CAPPELLINI, M. D.; CHEN, Y.-S.; DOMM, J.; EUSTACE, B. K.; FOELL, J.; DE LA FUENTE, J.; GRUPP, S.; HANDGRETINGER, R.; HO, T. W.; KATTAMIS, A.; KERNYTSKY, A.; LEKSTROM-HIMES, J.; LI, A. M.; LOCATELLI, F.; MAPARA, M. Y.; DE MONTALEMBERT, M.; RONDELLI, D.; ... CORBACIOGLU, S. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. **New England Journal of Medicine**, vol. 384, no. 3, 2021. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2031054>.

FU, X.; TAN, W.; SONG, Q.; PEI, H.; LI, J. BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, vol. 10, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.813457>.

GAO, M.; YI, J.; ZHU, J.; MINIKES, A. M.; MONIAN, P.; THOMPSON, C. B.; JIANG, X. Role of Mitochondria in Ferroptosis. **Molecular Cell**, vol. 73, no. 2, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.042>.

GARCIA-FOSSA, F.; DE JESUS, M. B. Cationic solid lipid nanoparticles (SLN) complexed with plasmid DNA enhance prostate cancer cells (PC-3) migration. **Nanotoxicology**, vol. 18, no. 1, 2024. <https://doi.org/10.1080/17435390.2024.2307616>.

GARCIA-FOSSA, F.; GAAL, V.; DE JESUS, M. B. PyScratch: An ease of use tool for analysis of scratch assays. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, vol. 193, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2020.105476>.

GATOO, M. A.; NASEEM, S.; ARFAT, M. Y.; MAHMOOD DAR, A.; QASIM, K.; ZUBAIR, S. Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated

toxic manifestations. **BioMed Research International**, vol. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: Applications, advantages and disadvantages. **Research in Pharmaceutical Sciences**, vol. 13, no. 4, 2018. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>.

GILLERON, J.; QUERBES, W.; ZEIGERER, A.; BORODOVSKY, A.; MARSICO, G.; SCHUBERT, U.; MANYGOATS, K.; SEIFERT, S.; ANDREE, C.; STÖTER, M.; EPSTEIN-BARASH, H.; ZHANG, L.; KOTELIANSKY, V.; FITZGERALD, K.; FAVA, E.; BICKLE, M.; KALAIIDZIDIS, Y.; AKINC, A.; MAIER, M.; ZERIAL, M. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. **Nature Biotechnology**, vol. 31, no. 7, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>.

GOKCE, E. H.; KORKMAZ, E.; DELLERA, E.; SANDRI, G.; CRISTINA BONFERONI, M.; OZER, O. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: Evaluation of antioxidant potential for dermal applications. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 7, 2012. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29710>.

GÓMEZ-AGUADO, I.; RODRÍGUEZ-CASTEJÓN, J.; VICENTE-PASCUAL, M.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; POZO-RODRÍGUEZ, A. Del; ASPIAZU, M. Á. S. Nucleic Acid Delivery by Solid Lipid Nanoparticles Containing Switchable Lipids: Plasmid DNA vs. Messenger RNA. **Molecules**, vol. 25, no. 24, 2020. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245995>.

GOROVITS, B.; AZADEH, M.; BUCHLIS, G.; FISCELLA, M.; HARRISON, T.; HAVERT, M.; JANETZKI, S.; JAWA, V.; LONG, B.; MAHNKE, Y. D.; MCDERMOTT, A.; MILTON, M.; NELSON, R.; VETTERMANN, C.; WU, B. Evaluation of Cellular Immune Response to Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy. **AAPS Journal**, vol. 25, no. 3, 2023. <https://doi.org/10.1208/s12248-023-00814-5>.

GRICE, G. L.; NATHAN, J. A. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 73, no. 18, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2255-5>.

GURI, Y.; NORDMANN, T. M.; ROSZIK, J. mTOR at the transmitting and receiving ends in tumor immunity. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, no. MAR, 27 Mar. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00578>.

GUTTERY, D. S.; PAGE, K.; HILLS, A.; WOODLEY, L.; MARCHESE, S. D.; RGHEBI, B.; HASTINGS, R. K.; LUO, J.; PRINGLE, J. H.; STEBBING, J.; COOMBES, R. C.; ALI, S.; SHAW, J. A. Noninvasive detection of activating estrogen receptor 1 (ESR1) mutations in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. **Clinical Chemistry**, vol. 61, no. 7, 2015. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.238717>.

HAN, M.; YAMAGUCHI, S.; ONISHI, M.; FUJII, T.; HOSOYA, M.; WEN, X.; KIDO, H.; KATO, S. The MDM2 and CDKN2A Copy-number-variation Influence the TP53-signature-score in Wild-type TP53 Luminal Type Breast Cancer. **Anticancer Research**, vol. 42, no. 5, 2022. <https://doi.org/10.21873/anticanres.15707>.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, vol. 21, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, vol. 12, no. 1, 2022. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, vol. 144, no. 5, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer**. [S. l.: s. n.], 2000.

HINTON, K.; KIRK, A.; PAUL, P.; PERSAD, S. Regulation of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Osteosarcoma. **Biomolecules**, vol. 13, no. 2, 2023. <https://doi.org/10.3390/biom13020398>.

HOUSE, I. G.; SAVAS, P.; LAI, J.; CHEN, A. X. Y.; OLIVER, A. J.; TEO, Z. L.; TODD, K. L.; HENDERSON, M. A.; GIUFFRIDA, L.; PETLEY, E. V.; SEK, K.; MARDIANA, S.; GIDE, T. N.; QUEK, C.; SCOLYER, R. A.; LONG, G. V.; WILMOTT, J. S.; LOI, S.; DARCY, P. K.; BEAVIS, P. A. Macrophage-derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumor immune responses following immune checkpoint blockade. **Clinical Cancer Research**, vol. 26, no. 2, 2020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1868>.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, vol. 157, no. 6, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.

HUANG, B.; HUANG, M.; LI, Q. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma by VEGF-Mediated EZH2/VASH1 Pathway. **Technology in Cancer Research and Treatment**, vol. 18, 2019. <https://doi.org/10.1177/1533033819879905>.

HUYNH, L. K.; HIPOLITO, C. J.; DIJKE, P. Ten. A perspective on the development of TGF- β inhibitors for cancer treatment. **Biomolecules**, vol. 9, no. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9110743>.

JIN, L.; ALES, G. N.; KANG, S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. **Oncogene**, vol. 35, no. 28, 2016. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.447>.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, vol. 337, no. 6096, 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.

JOHNSON, K. S.; CONANT, E. F.; SOO, M. S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. **Journal of Breast Imaging**, vol. 3, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1093/jbi/wbaa110>.

JOHNSON, M. O.; WOLF, M. M.; MADDEN, M. Z.; ANDREJEVA, G.; SUGIURA, A.; CONTRERAS, D. C.; MASEDA, D.; LIBERTI, M. V.; PAZ, K.; KISHTON, R. J.; JOHNSON, M. E.; DE CUBAS, A. A.; WU, P.; LI, G.; ZHANG, Y.; NEWCOMB, D. C.; WELLS, A. D.; RESTIFO, N. P.; RATHMELL, W. K.; ... RATHMELL, J. C. Distinct Regulation of Th17 and Th1 Cell Differentiation by Glutaminase-Dependent Metabolism. **Cell**, vol. 175, no. 7, p. 1780-1795.e19, 13 Dec. 2018. DOI 10.1016/j.cell.2018.10.001. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867418313096/fulltext>. Accessed on: 18 Mar. 2023.

JONCKHEERE, S.; ADAMS, J.; DE GROOTE, D.; CAMPBELL, K.; BERX, G.; GOOSSENS, S. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) as a Therapeutic Target. **Cells Tissues Organs**, vol. 211, no. 2, 2022. <https://doi.org/10.1159/000512218>.

KAMBER KAYA, H. E.; RADHAKRISHNAN, S. K. Trash Talk: Mammalian Proteasome Regulation at the Transcriptional Level. **Trends in Genetics**, vol. 37, no. 2, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.09.005>.

KATT, W. P.; LUKEY, M. J.; CERIONE, R. A. A tale of two glutaminases: Homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. **Future Medicinal Chemistry**, vol. 9, no. 2, 2017. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0190>.

KHALIQ, N. U.; LEE, J.; KIM, S.; SUNG, D.; KIM, H. Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, vol. 15, no. 8, 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082102>.

KHRAMTSOV, V. V.; GILLIES, R. J. Janus-Faced Tumor Microenvironment and Redox. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 21, no. 5, p. 723–729, 10 Aug. 2014. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5864>.

KOCABAS, A.; DUARTE, T.; KUMAR, S.; HYNES, M. A. Widespread Differential Expression of Coding Region and 3' UTR Sequences in Neurons and Other Tissues. **Neuron**, vol. 88, no. 6, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.048>.

KONDO, M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. **Immunological Reviews**, vol. 238, no. 1, p. 37–46, 1 Nov. 2010. DOI 10.1111/J.1600-065X.2010.00963.X. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x>. Accessed on: 18 Mar. 2023.

KUO, T. C.; CHEN, C. K.; HUA, K. T.; YU, P.; LEE, W. J.; CHEN, M. W.; JENG, Y. M.; CHIEN, M. H.; KUO, K. T.; HSIAO, M.; KUO, M. L. Glutaminase 2 stabilizes Dicer to repress Snail and metastasis in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Letters**, vol. 383, no. 2, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.012>.

KUO, Y. C.; KO, H. F. Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles. **Biomaterials**, vol. 34, no. 20, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.013>.

KUO, Y. C.; WANG, I. H. Enhanced delivery of etoposide across the blood–brain barrier to restrain brain tumor growth using melanotransferrin antibody- and tamoxifen-conjugated solid lipid nanoparticles. **Journal of Drug Targeting**, vol. 24, no. 7, 2016. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1132223>.

KWOK, G.; YAU, T. C. C.; CHIU, J. W.; TSE, E.; KWONG, Y. L. Pembrolizumab (Keytruda). **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, vol. 12, no. 11, 2016. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1199310>.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor- α gene (ESR1) in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 219, no. 1–2, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.02.021>.

LAM, S. T. T.; LIM, C. J. Cancer Biology of the Endoplasmic Reticulum Lectin Chaperones Calreticulin, Calnexin and PDIA3/ERp57. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**. [S. l.: s. n.], 2021. vol. 59, . https://doi.org/10.1007/978-3-030-67696-4_9.

LAMB, Y. N. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. **Drugs**, vol. 81, no. 4, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01480-7>.

LE TOURNEAU, C.; HOFFMANN, C.; TAKACSI-NAGY, Z.; LIEM, X.; SALAS, S.; DEBARD, A.; FINZI, L.; FARBER, L. A.; GOGISHVILI, M.; KRISTESASHVILI, G.; MAKHARADZE, T.; YOM, S. S. NANORAY-312: A phase III pivotal study of NBTXR3 activated by investigator's choice of radiotherapy alone or radiotherapy in combination with cetuximab for platinum-based chemotherapy-ineligible elderly patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 40, no. 16_suppl, 2022. https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.tps6110.

LEE, Y. Z.; YANG, C. W.; CHANG, H. Y.; HSU, H. Y.; CHEN, I. S.; CHANG, H. S.; LEE, C. H.; LEE, J. chy; KUMAR, C. R.; QIU, Y. Q.; CHAO, Y. S.; LEE, S. J. Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. **Oncotarget**, vol. 5, no. 15, 2014. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2173>.

LEU, J. S.; CHANG, S. Y.; MU, C. Y.; CHEN, M. L.; YAN, B. S. Functional domains of SP110 that modulate its transcriptional regulatory function and cellular translocation. **Journal of Biomedical Science**, vol. 25, no. 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0434-4>.

LI, H.; HAN, Y.; GUO, Q.; ZHANG, M.; CAO, X. Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1. **The Journal of Immunology**, vol. 182, no. 1, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.240>.

LI, H. L.; ZHAO, X. Bin; MA, Y. K.; ZHAI, G. X.; LI, L. B.; LOU, H. X. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, vol. 133, no. 3, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.002>.

LI, S.; ZENG, H.; FAN, J.; WANG, F.; XU, C.; LI, Y.; TU, J.; NEPHEW, K. P.; LONG, X. Glutamine metabolism in breast cancer and possible therapeutic targets. **Biochemical Pharmacology**, vol. 210, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115464>.

LI, Z. H.; HU, P. H.; TU, J. H.; YU, N. S. Luminal B breast cancer: Patterns of recurrence and clinical outcome. **Oncotarget**, vol. 7, no. 40, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11344>.

LIU, B.; ZHOU, H.; TAN, L.; SIU, K. T. H.; GUAN, X. Y. Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 9, no. 1, 1 Dec. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01856-7>.

LIU, Sanhong; WANG, Z.; LIU, Z.; SHI, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, J.; LIN, H.; LU, H. MiR-221/222 activate the Wnt/ β -catenin signaling to promote triple-negative breast cancer. **Journal of Molecular Cell Biology**, vol. 10, no. 4, 2018. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy041>.

LIU, Shu; HUANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZUO, S.; LI, R. MAP2K4 interacts with Vimentin to activate the PI3K/AKT pathway and promotes breast cancer pathogenesis. **Aging**, vol. 11, no. 22, 2019. <https://doi.org/10.18632/aging.102485>.

LIU, Y.; NENUTIL, R.; APPLEYARD, M. V.; MURRAY, K.; BOYLAN, M.; THOMPSON, A. M.; COATES, P. J. Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. **British journal of cancer**, vol. 110, no. 8, 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.105>.

LOCATELLI, F.; LANG, P.; LI, A.; CORBACIOGLU, S.; DE LA FUENTE, J.; WALL, D. A.; LIEM, R.; MEISEL, R.; MAPARA, M. Y.; SHAH, A. J.; CAPPELLINI, M. D. D.; KATTAMIS, A.; SHETH, S.; BOBRUFF, Y.; BOWER, L.; ZHANG, L.; SHARMA, A.; SONG, Y.; HOBBS, W.; FRANGOUL, H. Efficacy and Safety of a Single Dose of Exagamglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent β -Thalassemia. **Blood**, vol. 140, no. Supplement 1, 2022. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-166881>.

LUKEY, M. J.; CLUNTUN, A. A.; KATT, W. P.; LIN, M. chong J.; DRUSO, J. E.; RAMACHANDRAN, S.; ERICKSON, J. W.; LE, H. H.; WANG, Z. E.; BLANK, B.; GREENE, K. S.; CERIONE, R. A. Liver-Type Glutaminase GLS2 Is a Druggable Metabolic Node in Luminal-Subtype Breast Cancer. **Cell Reports**, vol. 29, no. 1, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.076>.

LV, D.; LAN, B.; ZHANG, L.; SUN, X.; YANG, M.; MA, F. Association between depression and anxiety status of breast cancer patients before adjuvant chemotherapy and chemotherapy-induced adverse events. **Cancer Medicine**, vol. 12, no. 4, 2023. <https://doi.org/10.1002/cam4.5283>.

MACKINNON, E.; STONE, S. L. The Ubiquitin Proteasome System and Nutrient Stress Response. **Frontiers in Plant Science**, vol. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.867419>.

MAFRA, A. C. P. **Entendimento do papel de glutaminase 2 para a progressão tumoral**. 2021. 103 f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2021. Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1250>. Accessed on: 28 Nov. 2024.

MAGUIRE, A. M.; RUSSELL, S.; WELLMAN, J. A.; CHUNG, D. C.; YU, Z. F.; TILLMAN, A.; WITTES, J.; PAPPAS, J.; ELCI, O.; MARSHALL, K. A.; MCCAGUE, S.; REICHERT, H.; DAVIS, M.; SIMONELLI, F.; LEROY, B. P.; WRIGHT, J. F.; HIGH, K. A.; BENNETT, J. Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation–Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. **Ophthalmology**, vol. 126, no. 9, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.opththa.2019.06.017>.

MAO, J. J.; PILLAI, G. G.; ANDRADE, C. J.; LIGIBEL, J. A.; BASU, P.; COHEN, L.; KHAN, I. A.; MUSTIAN, K. M.; PUTHIYEDATH, R.; DHIMAN, K. S.; LAO, L.; GHELMAN, R.; CÁCERES GUIDO, P.; LOPEZ, G.; GALLEG0-PEREZ, D. F.; SALICRUP, L. A. Integrative oncology: Addressing the global challenges of cancer prevention and treatment. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 72, no. 2, 2022. <https://doi.org/10.3322/caac.21706>.

MARGULIES, D. H.; JIANG, J.; NATARAJAN, K. Structural and dynamic studies of TAPBPR and Tapasin reveal the mechanism of peptide loading of MHC-I molecules. **Current Opinion in Immunology**, vol. 64, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.04.004>.

MASSAGUE, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, vol. 134, no. 2, 2008. .

MATÉS, J. M.; CAMPOS-SANDOVAL, J. A.; DE LOS SANTOS-JIMÉNEZ, J.; MÁRQUEZ, J. Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. **Archives of Toxicology**, vol. 94, no. 8, p. 2603–2623, 1 Aug. 2020. DOI 10.1007/S00204-020-02838-8/TABLES/1. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-020-02838-8>. Accessed on: 17 Mar. 2023.

MATÉS, J. M.; CAMPOS-SANDOVAL, J. A.; MÁRQUEZ, J. Glutaminase isoenzymes in the metabolic therapy of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, vol. 1870, no. 2, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.007>.

MATES, J. M.; SEGURA, J. A.; MARTIN-RUFIAN, M.; CAMPOS-SANDOVAL, J. A.; ALONSO, F. J.; MARQUEZ, J. Glutaminase Isoenzymes as Key Regulators in Metabolic and Oxidative Stress Against Cancer. **Current Molecular Medicine**, vol. 13, no. 4, 2013. <https://doi.org/10.2174/1566524011313040005>.

MCHUGH, A.; FERNANDES, K.; SOUTH, A. P.; MELLERIO, J. E.; SALAS-ALANÍS, J. C.; PROBY, C. M.; LEIGH, I. M.; SAVILLE, M. K. Preclinical comparison of

proteasome and ubiquitin E1 enzyme inhibitors in cutaneous squamous cell carcinoma: The identification of mechanisms of differential sensitivity. **Oncotarget**, vol. 9, no. 29, 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24750>.

MIATMOKO, A.; ASMORO, F. H.; AZHARI, A. A.; ROSITA, N.; HUANG, C. S. The effect of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) Addition on the physical characteristics of β -ionone liposomes. **Scientific Reports**, vol. 13, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31560-5>.

MIHAILESCU, M.; WORCESTER, D. L.; CARROLL, C. L.; CHAMBERLIN, A. R.; WHITE, S. H. DOTAP: Structure, hydration, and the counterion effect. **Biophysical Journal**, vol. 122, no. 6, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.01.031>.

MILLER, D. S. J.; HILL, C. S. TGF- β Family Signaling. **Encyclopedia of Cell Biology: Volume 1-6, Second Edition**. [S. l.: s. n.], 2022. vol. 4, . <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00242-X>.

MISHRA, A. K.; DAS, R.; SAHOO, S.; BISWAL, B. Global regulations and legislations on nanoparticles usage and application in diverse horizons. **Comprehensive Analytical Chemistry**. [S. l.: s. n.], 2022. vol. 99, . <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2021.12.004>.

MISHRA, R. K.; AHMAD, A.; VYAWAHARE, A.; ALAM, P.; KHAN, T. H.; KHAN, R. Biological effects of formation of protein corona onto nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 175, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.152>.

MISSAOUI, W. N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 295, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.015>.

MIYAZAWA, K.; ITOH, Y.; FU, H.; MIYAZONO, K. Receptor-activated transcription factors and beyond: multiple modes of Smad2/3-dependent transmission of TGF- β

signaling. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 300, no. 5, 1 May 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107256>.

MORE, S.; BAMPIDIS, V.; BENFORD, D.; BRAGARD, C.; HALLDORSSON, T.; HERNÁNDEZ-JEREZ, A.; HOUGAARD BENNEKOU, S.; KOUTSOUMANIS, K.; LAMBRÉ, C.; MACHERA, K.; NAEGELI, H.; NIELSEN, S.; SCHLATTER, J.; SCHRENK, D.; SILANO, V.; TURCK, D.; YOUNES, M.; CASTENMILLER, J.; CHAUDHRY, Q.; ... SCHOONJANS, R. Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health. **EFSA Journal**, vol. 19, no. 8, 2021. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6768>.

MOTOSUGI, R.; MURATA, S. Dynamic regulation of proteasome expression. **Frontiers in Molecular Biosciences**, vol. 6, no. MAY, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00030>.

MOUSTAKAS, A.; SOUCHELNYTSKYI, S.; HELDIN, C. H. Smad regulation in TGF- β signal transduction. **Journal of Cell Science**, vol. 114, no. 24, 2001. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.24.4359>.

MUSIELAK, E.; FELICZAK-GUZIŁ, A.; NOWAK, I. Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. **Materials**, vol. 15, no. 2, 2022. <https://doi.org/10.3390/ma15020682>.

NASR, S.; RADY, M.; GOMAA, I.; SYROVET, T.; SIMMET, T.; FAYAD, W.; ABDEL-KADER, M. Ethosomes and lipid-coated chitosan nanocarriers for skin delivery of a chlorophyll derivative: A potential treatment of squamous cell carcinoma by photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 568, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118528>.

OBLEUKHOVA, I.; KIRYISHINA, N.; FALALEEVA, S.; LOPATNIKOVA, J.; KURILIN, V.; KOZLOV, V.; VITSIN, A.; CHERKASOV, A.; KULIKOVA, E.; SENNIKOV, S. Use of antigen-primed dendritic cells for inducing antitumor immune responses in vitro in

patients with non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, vol. 15, no. 1, 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7403>.

ODA, H.; HEDAYATI, E.; LINDSTRÖM, A.; SHABO, I. GATA-3 expression in breast cancer is related to intratumoral M2 macrophage infiltration and tumor differentiation. **PLoS ONE**, vol. 18, no. 3 March, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283003>.

OH, M. H.; SUN, I. H.; ZHAO, L.; LEONE, R. D.; SUN, I. M.; XU, W.; COLLINS, S. L.; TAM, A. J.; BLOSSER, R. L.; PATEL, C. H.; ENGLERT, J. M.; ARWOOD, M. L.; WEN, J.; CHAN-LI, Y.; TENORA, L.; MAJER, P.; RAIS, R.; SLUSHER, B. S.; HORTON, M. R.; POWELL, J. D. Targeting glutamine metabolism enhances tumor-specific immunity by modulating suppressive myeloid cells. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 130, no. 7, 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI131859>.

OLSEN, B. R.; SVENNEBY, G.; KVAMME, E.; TVEIT, B.; ESKELAND, T. Formation and ultrastructure of enzymically active polymers of pig renal glutaminase. **Journal of Molecular Biology**, vol. 52, no. 2, 1970. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90028-8).

PALAKURTHI, B.; FROSS, S. R.; GULDNER, I. H.; ALEKSANDROVIC, E.; LIU, X.; MARTINO, A. K.; WANG, Q.; NEFF, R. A.; GOLOMB, S. M.; LEWIS, C.; PENG, Y.; HOWE, E. N.; ZHANG, S. Targeting CXCL16 and STAT1 augments immune checkpoint blockade therapy in triple-negative breast cancer. **Nature Communications**, vol. 14, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37727-y>.

PANSY, K.; UHL, B.; KRSTIC, J.; SZMYRA, M.; FECHTER, K.; SANTISO, A.; THÜMINGER, L.; GREINIX, H.; KARGL, J.; PROCHAZKA, K.; FEICHTINGER, J.; DEUTSCH, A. J. Immune regulatory processes of the tumor microenvironment under malignant conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, no. 24, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222413311>.

PANTELIDOU, C.; SONZOGNI, O.; TAVEIRA, M. D. O.; MEHTA, A. K.; KOTHARI, A.; WANG, D.; VISAL, T.; LI, M. K.; PINTO, J.; CASTRILLON, J. A.; CHENEY, E. M.;

BOUWMAN, P.; JONKERS, J.; ROTTENBERG, S.; GUERRIERO, J. L.; WULF, G. M.; SHAPIRO, G. I. Parp inhibitor efficacy depends on CD8+ T-cell recruitment via intratumoral sting pathway activation in brca-deficient models of triple-negative breast cancer. **Cancer Discovery**, vol. 9, no. 6, 2019. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1218>.

PARAJULI, P.; SINGH, P.; WANG, Z.; LI, L.; ERAGAMREDDI, S.; OZKAN, S.; FERRIGNO, O.; PRUNIER, C.; RAZZAQUE, M. S.; XU, K.; ATFI, A. TGIF 1 functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma . **The EMBO Journal**, vol. 38, no. 13, 2019. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018101067>.

PARIDA, P. K.; MARQUEZ-PALENCIA, M.; NAIR, V.; KAUSHIK, A. K.; KIM, K.; SUDDERTH, J.; QUESADA-DIAZ, E.; CAJIGAS, A.; VEMIREDDY, V.; GONZALEZ-ERICSSON, P. I.; SANDERS, M. E.; MOBLEY, B. C.; HUFFMAN, K.; SAHOO, S.; ALLURI, P.; LEWIS, C.; PENG, Y.; BACHOO, R. M.; ARTEAGA, C. L.; ... MALLADI, S. Metabolic diversity within breast cancer brain-tropic cells determines metastatic fitness. **Cell Metabolism**, vol. 34, no. 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.001>.

PARUMS, D. V. Editorial: First Regulatory Approvals for CRISPRCas9 Therapeutic Gene Editing for Sickle Cell Disease and Transfusion-Dependent b-Thalassemia. **Medical Science Monitor**, vol. 30, 2024. <https://doi.org/10.12659/MSM.944204>.

PATRI, S. V; RAVULA, V.; MURIPITI, V.; KUMAR, A.; WANG, L.-F.; PATRI, S. V.; VEMULA, P. K. DOTAP Modified Formulations of Aminoacid Based Cationic Liposomes for Improved Gene Delivery and Cell Viability. **ChemMedChem**, 21 Oct. 2024. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202400324>.

PATTI, A.; LECOCQ, H.; SERGHEI, A.; ACIERNO, D.; CASSAGNAU, P. The universal usefulness of stearic acid as surface modifier: applications to the polymer formulations and composite processing. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, vol. 96, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.01.024>.

PAUSCH, T. M.; AUE, E.; WIRSIK, N. M.; FREIRE VALLS, A.; SHEN, Y.; RADHAKRISHNAN, P.; HACKERT, T.; SCHNEIDER, M.; SCHMIDT, T. Metastasis-associated fibroblasts promote angiogenesis in metastasized pancreatic cancer via the CXCL8 and the CCL2 axes. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62416-x>.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, vol. 23, no. 1, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.

PETERSON, C.; DENLINGER, N.; YANG, Y. Recent Advances and Challenges in Cancer Immunotherapy. **Cancers**, vol. 14, no. 16, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14163972>.

PLITAS, G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T Cells in Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, vol. 4, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033428>.

PORTER, K. M.; HERMANN, C.; TRAHERNE, J. A.; BOYLE, L. H. TAPBPR isoforms exhibit altered association with MHC class I. **Immunology**, vol. 142, no. 2, 2014. <https://doi.org/10.1111/imm.12253>.

PUCCI, C.; MARTINELLI, C.; CIOFANI, G. Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. **ecancermedicalsecience**, vol. 13, 2019. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>.

RAČKOVÁ, L.; CSEKES, E. Proteasome biology: Chemistry and bioengineering insights. **Polymers**, vol. 12, no. 12, 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12122909>.

RADAIC, A.; DE JESUS, M. B. Solid lipid nanoparticles release DNA upon endosomal acidification in human embryonic kidney cells. **Nanotechnology**, vol. 29, no. 31, 2018. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aac447>.

RADAIC, Allan; DE PAULA, E.; DE JESUS, M. B. Factorial design and development of solid lipid nanoparticles (SLN) for gene delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, vol. 15, no. 2, 2015. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9002>.

RAMMENSEE, H. G.; FALK, K.; RÖTZSCHKE, O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. **Annual Review of Immunology**, vol. 11, 1993. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001241>.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, vol. 8, no. 11, 2013. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.

RASSU, G.; SODDU, E.; POSADINO, A. M.; PINTUS, G.; SARMENTO, B.; GIUNCHEDI, P.; GAVINI, E. Nose-to-brain delivery of BACE1 siRNA loaded in solid lipid nanoparticles for Alzheimer's therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 152, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.031>.

RAZZAQUE, M. S.; ATFI, A. TGIF function in oncogenic Wnt signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, vol. 1865, no. 2, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.10.003>.

RAZZAQUE, M. S.; ATFI, A. TGIF1-Twist1 axis in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, vol. 18, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.023>.

REINFELD, B. I.; MADDEN, M. Z.; WOLF, M. M.; CHYTIL, A.; BADER, J. E.; PATTERSON, A. R.; SUGIURA, A.; COHEN, A. S.; ALI, A.; DO, B. T.; MUIR, A.; LEWIS, C. A.; HONGO, R. A.; YOUNG, K. L.; BROWN, R. E.; TODD, V. M.; HUFFSTATTER, T.; ABRAHAM, A.; O'NEIL, R. T.; ... RATHMELL, W. K. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment. **Nature** **2021 593:7858**, vol. 593, no. 7858, p. 282–288, 7 Apr. 2021. DOI 10.1038/s41586-021-03442-1. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03442-1>. Accessed on: 26 Mar. 2023.

RIBOVSKI, L.; JOSHI, B. S.; GAO, J.; ZUHORN, I. S. Breaking free: endocytosis and endosomal escape of extracellular vesicles. **Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids**, vol. 4, no. 2, 2023. <https://doi.org/10.20517/evcna.2023.26>.

RIGGINS, G. J.; THIAGALINGAM, S.; ROZENBLUM, E.; WEINSTEIN, C. L.; KERN, S. E.; HAMILTON, S. R.; WILLSON, J. K. V.; MARKOWITZ, S. D.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Mad-related genes in the human. **Nature Genetics**, vol. 13, no. 3, 1996. <https://doi.org/10.1038/ng0796-347>.

RUIZ DE GARIBAY, A. P.; SOLINÍS, M. A.; DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; APAOLAZA, P. S.; SHEN, J. S.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A. Solid lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene transfection in a cell model of fabry disease. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, vol. 11, no. 3, 2015. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1968>.

SAKAI-KATO, K.; YOSHIDA, K.; IZUTSU, K. ichi. Effect of surface charge on the size-dependent cellular internalization of liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 224, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.01.004>.

SALATIN, S.; MALEKI DIZAJ, S.; YARI KHOSROUSHAHI, A. Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. **Cell Biology International**, vol. 39, no. 8, 2015. <https://doi.org/10.1002/cbin.10459>.

SANTOS, M. de O.; LIMA, F. C. da S. de; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M. de; CANCELA, M. de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 69, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2023v69n1.3700>.

SAPIO, L.; NAVIGLIO, S. Innovation through Tradition: The Current Challenges in Cancer Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 10, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23105296>.

SARKAR, P.; GHOSH, S.; SARKAR, K. Folic acid based carbon dot functionalized stearic acid-g-polyethyleneimine amphiphilic nanomicelle: Targeted drug delivery and imaging for triple negative breast cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 197, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111382>.

SAVAGE, C.; DAS, P.; FINELLI, A. L.; TOWNSEND, S. R.; SUN, C. Y.; BAIRD, S. E.; PADGETT, R. W. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, no. 2, 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.790>.

SCHETTINI, F.; PRAT, A. Dissecting the biological heterogeneity of HER2-positive breast cancer. **Breast**, vol. 59, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.07.019>.

SEALE, K. N.; TKACZUK, K. H. R. Circulating Biomarkers in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, vol. 22, no. 3, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.09.006>.

SEKELSKY, J. J.; NEWFELD, S. J.; RAFTERY, L. A.; CHARTOFF, E. H.; GELBART, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, vol. 139, no. 3, 1995. <https://doi.org/10.1093/genetics/139.3.1347>.

SEO, S. R.; FERRAND, N.; FARESSE, N.; PRUNIER, C.; ABÉCASSIS, L.; PESSAH, M.; BOURGEADE, M. F.; ATFI, A. Nuclear Retention of the Tumor Suppressor cPML by the Homeodomain Protein TGIF Restricts TGF- β Signaling. **Molecular Cell**, vol. 23, no. 4, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.018>.

SERRANO-LOTINA, A.; PORTELA, R.; BAEZA, P.; ALCOLEA-RODRIGUEZ, V.; VILLARROEL, M.; ÁVILA, P. Zeta potential as a tool for functional materials development. **Catalysis Today**, vol. 423, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2022.08.004>.

SHALEM, O.; SANJANA, N. E.; HARTENIAN, E.; SHI, X.; SCOTT, D. A.; MIKKELSEN, T. S.; HECKL, D.; EBERT, B. L.; ROOT, D. E.; DOENCH, J. G.; ZHANG, F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. **Science**, vol. 343, no. 6166, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.

SHANKAR, S.; RAMACHANDRAN, S.; TULSIAN, N.; RADHAKRISHNAN, S.; JOBICHEN, C.; SIVARAMAN, J. A novel allosteric site employs a conserved inhibition mechanism in human kidney-type glutaminase. **The FEBS Journal**, 2022. DOI 10.1111/FEBS.16658. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.16658>. Accessed on: 17 Mar. 2023.

SHEEHAN, K.; SCHALPER, K. A. Tumor Microenvironment: Immune Effector and Suppressor Imbalance. **Current Cancer Research**. [S. l.: s. n.], 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-74028-3_1.

SHI, L.; LIU, Y.; LI, M.; LUO, Z. Emerging roles of ferroptosis in the tumor immune landscape: from danger signals to anti-tumor immunity. **FEBS Journal**, vol. 289, no. 13, 2022. <https://doi.org/10.1111/febs.16034>.

SHIN, D.; LEE, J.; YOU, J. H.; KIM, D.; ROH, J. L. Dihydrolipoamide dehydrogenase regulates cystine deprivation-induced ferroptosis in head and neck cancer. **Redox Biology**, vol. 30, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101418>.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; WAGLE, N. S.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 73, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 21, no. 7, p. 363–383, 1 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.

SINGH, K.; GAUTAM, P. K. Macrophage infiltration in 3D cancer spheroids to recapitulate the TME and unveil interactions within cancer cells and macrophages to modulate chemotherapeutic drug efficacy. **BMC Cancer**, vol. 23, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11674-9>.

SOBHANI, N.; TARDIEL-CYRIL, D. R.; DAVTYAN, A.; GENERALI, D.; ROUDI, R.; LI, Y. CTLA-4 in regulatory T cells for cancer immunotherapy. **Cancers**, vol. 13, no. 6, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13061440>.

SONG, X.; LIU, Z.; YU, Z. EGFR promotes the development of triple negative breast cancer through JAK/STAT3 signaling. **Cancer Management and Research**, vol. 12, 2020. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S225376>.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 98, no. 19, 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.

STADTMAUER, E. A.; FRAIETTA, J. A.; DAVIS, M. M.; COHEN, A. D.; WEBER, K. L.; LANCASTER, E.; MANGAN, P. A.; KULIKOVSKAYA, I.; GUPTA, M.; CHEN, F.; TIAN, L.; GONZALEZ, V. E.; XU, J.; JUNG, I. young; JOSEPH MELENHORST, J.; PLESA, G.; SHEA, J.; MATLAWSKI, T.; CERVINI, A.; ... JUNE, C. H. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. **Science**, vol. 367, no. 6481, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>.

STEWART, M. D.; RITTERHOFF, T.; KLEVIT, R. E.; BRZOVIC, P. S. E2 enzymes: More than just middle men. **Cell Research**, vol. 26, no. 4, 2016. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.35>.

STOCKIS, J.; ROYCHOUDHURI, R.; HALIM, T. Y. F. Regulation of regulatory T cells in cancer. **Immunology**, vol. 157, no. 3, 2019. <https://doi.org/10.1111/imm.13064>.

SUÑÉ-POU, M.; PRIETO-SÁNCHEZ, S.; EL YOUSFI, Y.; BOYERO-CORRAL, S.; NARDI-RICART, A.; NOFRERIAS-ROIG, I.; PÉREZ-LOZANO, P.; GARCÍA-MONTOYA, E.; MIÑARRO-CARMONA, M.; TICÓ, J. R.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; MUNAIN, H.; SUÑÉ, C. Cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles as carriers for efficient gene-silencing therapy. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 13, 2018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S158884>.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 71, no. 3, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

SUZUKI, S.; TANAKA, T.; POYUROVSKY, M. V.; NAGANO, H.; MAYAMA, T.; OHKUBO, S.; LOKSHIN, M.; HOSOKAWA, H.; NAKAYAMA, T.; SUZUKI, Y.; SUGANO, S.; SATO, E.; NAGAO, T.; YOKOTE, K.; TATSUNO, I.; PRIVES, C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 107, no. 16, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002459107>.

SUZUKI, S.; VENKATESH, D.; TANAKA, T.; PRIVES, C. GLS2 shapes ferroptosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, vol. 14, 2023. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.28526>.

TAI, H. C.; BESCHE, H.; GOLDBERG, A. L.; SCHUMAN, E. M. Characterization of the brain 26S proteasome and its interacting proteins. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, vol. 3, 2010. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2010.00012>.

TANG, Y.; SONG, G.; LIU, H.; YANG, S.; YU, X.; SHI, L. Silencing of long non-coding rna hotair alleviates epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer via the

wnt/ β -catenin signaling pathway. **Cancer Management and Research**, vol. 13, 2021. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S265578>.

THAKUR, C.; QIU, Y.; FU, Y.; BI, Z.; ZHANG, W.; JI, H.; CHEN, F. Epigenetics and environment in breast cancer: New paradigms for anti-cancer therapies. **Frontiers in Oncology**, vol. 12, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.971288>.

TIAN, J.; QUEK, C. Understanding the Tumor Microenvironment in Melanoma Patients with In-Transit Metastases and Its Impacts on Immune Checkpoint Immunotherapy Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 25, no. 8, 1 Apr. 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25084243>.

TORRES-VANEGAS, J. D.; CRUZ, J. C.; REYES, L. H. Delivery systems for nucleic acids and proteins: Barriers, cell capture pathways and nanocarriers. **Pharmaceutics**, vol. 13, no. 3, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030428>.

TOSCANO, F.; TORRES-ARIAS, M. Nanoparticles cellular uptake, trafficking, activation, toxicity and in vitro evaluation. **Current Research in Immunology**, vol. 4, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2023.100073>.

TRAXLER, E. A.; YAO, Y.; WANG, Y. D.; WOODARD, K. J.; KURITA, R.; NAKAMURA, Y.; HUGHES, J. R.; HARDISON, R. C.; BLOBEL, G. A.; LI, C.; WEISS, M. J. A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. **Nature Medicine**, vol. 22, no. 9, 2016. <https://doi.org/10.1038/nm.4170>.

TUPAL, A.; SABZICHI, M.; RAMEZANI, F.; KOUHSOLTANI, M.; HAMISHEHKAR, H. Dermal delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of skin cancer. **Journal of Microencapsulation**, vol. 33, no. 4, 2016. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1200150>.

TYCHHON, B.; ALLEN, J. C.; GONZALEZ, M. A.; OLIVAS, I. M.; SOLECKI, J. P.; KEIVAN, M.; VELAZQUEZ, V. V.; MCCALL, E. B.; TAPIA, D. N.; RUBIO, A. J.;

JORDAN, C.; ELLIOTT, D.; EIRING, A. M. The prognostic value of 19S ATPase proteasome subunits in acute myeloid leukemia and other forms of cancer. **Frontiers in Medicine**, vol. 10, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1209425>.

VERMARE, A.; GUÉRIN, M. V.; PERANZONI, E.; BERCOVICI, N. Dynamic CD8+ T Cell Cooperation with Macrophages and Monocytes for Successful Cancer Immunotherapy. **Cancers**, vol. 14, no. 14, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14143546>.

WALCHER, L.; KISTENMACHER, A. K.; SUO, H.; KITTE, R.; DLUCZEK, S.; STRAUSS, A.; BLAUDSZUN, A. R.; YEVSIA, T.; FRICKE, S.; KOSSATZ-BOEHLERT, U. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>.

WANG, B.; PEI, J.; XU, S.; LIU, J.; YU, J. A glutamine tug-of-war between cancer and immune cells: recent advances in unraveling the ongoing battle. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, vol. 43, no. 1, 2024. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02994-0>.

WANG, P.; ZHANG, L.; PENG, H.; LI, Y.; XIONG, J.; XU, Z. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. **Materials Science and Engineering C**, vol. 33, no. 8, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.047>.

WANG, Q.; XIONG, F.; WU, G.; WANG, D.; LIU, W.; CHEN, J.; QI, Y.; WANG, B.; CHEN, Y. SMAD Proteins in TGF- β Signalling Pathway in Cancer: Regulatory Mechanisms and Clinical Applications. **Diagnostics**, vol. 13, no. 17, 2023. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13172769>.

WANG, R.; HUSSAIN, A.; GUO, Q. Q.; JIN, X. W.; WANG, M. M. Oxygen and Iron Availability Shapes Metabolic Adaptations of Cancer Cells. **World Journal of Oncology**, vol. 15, no. 1, 2024. <https://doi.org/10.14740/wjon1739>.

WANG, Wei; GUO, M.; BAI, Z.; BAI, W.; CHEN, W.; SU, Y.; WU, J. Dysfunction of Cytotoxic T Lymphocyte Induced by Hepatoma Cells through the Gln-GLS2-Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, vol. 27, no. 8, 2022. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2708243>.

WANG, Wenrui; CHEN, T.; XU, H.; REN, B.; CHENG, X.; QI, R.; LIU, H.; WANG, Y.; YAN, L.; CHEN, S.; YANG, Q.; CHEN, C. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles enhanced anticancer efficiency in breast cancer. **Molecules**, vol. 23, no. 7, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23071578>.

WANG, Yadong; LI, L.; WANG, H.; LI, J.; YANG, H. Silencing TGIF suppresses migration, invasion and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Oncology Reports**, vol. 39, no. 2, 2018. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6133>.

WANG, Yahui; PATTI, G. J. The Warburg effect: a signature of mitochondrial overload. **Trends in Cell Biology**, vol. 33, no. 12, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.03.013>.

WEBER, J. S.; CARLINO, M. S.; KHATTAK, A.; MENIAWY, T.; ANSSTAS, G.; TAYLOR, M. H.; KIM, K. B.; MCKEAN, M.; LONG, G. V.; SULLIVAN, R. J.; FARIES, M.; TRAN, T. T.; COWEY, C. L.; PECORA, A.; SHAHEEN, M.; SEGAR, J.; MEDINA, T.; ATKINSON, V.; GIBNEY, G. T.; ... ZAKS, T. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study. **The Lancet**, vol. 403, no. 10427, 2024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02268-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02268-7).

WEHMER, M.; SAKATA, E. Recent advances in the structural biology of the 26S proteasome. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 79, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.08.008>.

WEYHERS, H.; EHLERS, S.; HAHN, H.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) - Effects of lipid composition on in vitro degradation and in vivo toxicity. **Pharmazie**, vol. 61, no. 6, 2006. .

WOTTON, D.; LO, R. S.; LEE, S.; MASSAGUÉ, J. A Smad transcriptional corepressor. **Cell**, vol. 97, no. 1, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80712-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80712-6).

WOTTON, D.; LO, R. S.; SWABY, L. A. C.; MASSAGUÉ, J. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, no. 52, 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37105>.

WU, Q.; BA-ALAWI, W.; DEBLOIS, G.; CRUICKSHANK, J.; DUAN, S.; LIMA-FERNANDES, E.; HAIGHT, J.; TONEKABONI, S. A. M.; FORTIER, A. M.; KUASNE, H.; MCKEE, T. D.; MAHMOUD, H.; KUSHIDA, M.; CAMERON, S.; DOGAN-ARTUN, N.; CHEN, W. J.; NIE, Y.; ZHANG, L. X.; VELLANKI, R. N.; ... ARROWSMITH, C. H. GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer. **Nature Communications**, vol. 11, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18020-8>.

WU, W. C.; SUN, H. W.; CHEN, J.; OUYANG, H. Y.; YU, X. J.; CHEN, H. T.; SHUANG, Z. Y.; SHI, M.; WANG, Z.; ZHENG, L. Immunosuppressive immature myeloid cell generation is controlled by glutamine metabolism in human cancer. **Cancer Immunology Research**, vol. 7, no. 10, 2019. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0902>.

WU, X.; CHEN, H.; WU, C.; WANG, J.; ZHANG, S.; GAO, J.; WANG, H.; SUN, T.; YANG, Y. G. Inhibition of intrinsic coagulation improves safety and tumor-targeted drug delivery of cationic solid lipid nanoparticles. **Biomaterials**, vol. 156, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.040>.

XIANG, H.; YANG, R.; TU, J.; XI, Y.; YANG, S.; LV, L.; ZHAI, X.; ZHU, Y.; DONG, D.; TAO, X. Metabolic reprogramming of immune cells in pancreatic cancer progression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 157, 1 Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113992>.

XIANG, L.; XIE, G.; LIU, C.; ZHOU, J.; CHEN, J.; YU, S.; LI, J.; PANG, X.; SHI, H.; LIANG, H. Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, vol. 1833, no. 12, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.003>.

XIAO, D.; REN, P.; SU, H.; YUE, M.; XIU, R.; HU, Y.; LIU, H.; QING, G. Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. **Oncotarget**, vol. 6, no. 38, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5821>.

XU, X.; ZHANG, L.; HE, X.; ZHANG, P.; SUN, C.; XU, X.; LU, Y.; LI, F. TGF- β plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 502, no. 1, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.139>.

XUE, W.; YANG, L.; CHEN, C.; ASHRAFIZADEH, M.; TIAN, Y.; SUN, R. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 81, no. 1, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05099-7>.

YANG, L.; LI, A.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Intratumoral microbiota: roles in cancer initiation, development and therapeutic efficacy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 8, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01304-4>.

YANG, Q.; ZHAO, J.; CHEN, D.; WANG, Y. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. **Molecular Biomedicine**, vol. 2, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43556-021-00043-2>.

YE, X.; ZHOU, Q.; MATSUMOTO, Y.; MORIYAMA, M.; KAGEYAMA, S.; KOMATSU, M.; SATOH, S.; TSUCHIDA, M.; SAIJO, Y. Inhibition of glutaminolysis inhibits cell growth via down-regulating Mtorc1 signaling in lung squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, vol. 36, no. 11, 2016. <https://doi.org/10.21873/anticanres.11191>.

YIN, L.; DUAN, J. J.; BIAN, X. W.; YU, S. C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, vol. 22, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.

YU, F.; YU, C.; LI, F.; ZUO, Y.; WANG, Y.; YAO, L.; WU, C.; WANG, C.; YE, L. Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 6, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00701-5>.

ZHANG, E.; DING, C.; LI, S.; ZHOU, X.; AIKEMU, B.; FAN, X.; SUN, J.; ZHENG, M.; YANG, X. Roles and mechanisms of tumour-infiltrating B cells in human cancer: a new force in immunotherapy. **Biomarker Research**, vol. 11, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00460-1>.

ZHANG, M. Z.; FERRIGNO, O.; WANG, Z.; OHNISHI, M.; PRUNIER, C.; LEVY, L.; RAZZAQUE, M.; HORNE, W. C.; ROMERO, D.; TZIVION, G.; COLLAND, F.; BARON, R.; ATFI, A. TGIF governs a feed-forward network that empowers wnt signaling to drive mammary tumorigenesis. **Cancer Cell**, vol. 27, no. 4, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.002>.

ZHANG, S.; WANG, Y.; MAO, D.; WANG, Y.; ZHANG, H.; PAN, Y.; WANG, Y.; TENG, S.; HUANG, P. Current trends of clinical trials involving CRISPR/Cas systems. **Frontiers in Medicine**, vol. 10, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1292452>.

ZHANG, Z.; YU, Y.; ZHANG, Z.; LI, D.; LIANG, Z.; WANG, L.; CHEN, Y.; LIANG, Y.; NIU, H. Cancer-associated fibroblasts-derived CXCL12 enhances immune escape of bladder cancer through inhibiting P62-mediated autophagic degradation of PDL1. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, vol. 42, no. 1, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02900-0>.

ZHU, H.; GU, Y.; XUE, Y.; YUAN, M.; CAO, X.; LIU, Q. CXCR2+ MDSCs promote breast cancer progression by inducing EMT and activated T cell exhaustion. **Oncotarget**, vol. 8, no. 70, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23020>.

ZHU, K.; WU, Y.; HE, P.; FAN, Y.; ZHONG, X.; ZHENG, H.; LUO, T. PI3K/AKT/mTOR-Targeted Therapy for Breast Cancer. **Cells**, vol. 11, no. 16, 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11162508>.

ZHU, S.; ZHANG, T.; ZHENG, L.; LIU, H.; SONG, W.; LIU, D.; LI, Z.; PAN, C. xian. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy. **Journal of Hematology and Oncology**, vol. 14, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01164-5>.

ZOU, Z.; LIN, H.; LI, M.; LIN, B. Tumor-associated macrophage polarization in the inflammatory tumor microenvironment. **Frontiers in Oncology**, vol. 13, 2023. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1103149>.

ANEXOS

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2020-16

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: **Investigação dos mecanismos moleculares induzidos por vetores nanoestruturados para transfecção de genes em culturas tumorais esferoides**

2. Pesquisador responsável: **Sandra Martha Gomes Dias**

3. Experimentador(es): **Raquel Bester Liszbinski**

Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☐ -mestrado, ☒ -doutorado, ☐ -doutorado direto, ☐ -pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique:

4. Unidade operativa: ☐ LNLS ☐ LNNano ☐ LNBR ☒ LNBio

5. Maior Classe de risco de OGM deste projeto: ☒ Risco I ☐ Risco II ☐ Risco III ☐ Risco IV

6. O projeto é confidencial? ☒ não ☐ sim

7. No caso de projeto confidencial, o título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? ☐ não ☐ sim

8. Qual é o objetivo do projeto?

Produção de esferoides (3D) a partir de linhagens tumorais de câncer de mama triplo negativo bem como co-culturas com macrófagos. Realizaremos edição de gene por CRISPR/Cas9 com *knockout* de TGIF, avaliando a entrega do sistema por vetores não-virais (nanopartículas lipídicas sólidas), observando a eficiência de entrega, assim como os diversos efeitos biológicos sobre as culturas em 3D. Serão realizadas transduções de proteínas fluorescentes em linhagens celulares que serão utilizadas para caracterização e aquisição de imagens dos modelos 3D.

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM.

(1) Transfecção de genes fluorescentes - OR: diversas linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo [MDA-MB-(231; 436; 157; 453; 468); HCC (1143; 38; 1937; 70); BT549; Hs578T]; OD: *E. coli*; Transgene: eGFP ou mCherry/RFP; Risco I.

(2) Expressão de CRISPR/Cas9 - OR: diversas linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo [MDA-MB-(231; 436; 157; 453; 468); HCC (1143; 38; 1937; 70); BT549; Hs578T]; OD: *E. coli*; Transgene: *Knockout* de TGIF; Risco I.

(3) *Knockout* de TGIF - OR: diversas linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo [MDA-MB-(231; 436; 157; 453; 468); HCC (1143; 38; 1937; 70); BT549; Hs578T]; OD: O sistema CRISPR/Cas9 será entregue por vetores não-virais (Nanopartículas lipídicas sólidas); Transgene: *Knockout* de TGIF; Risco I

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM:

(1) GFP: proteína fluorescente verde usada como repórter;

(2) mCherry/RFP: proteína fluorescente vermelha usada como repórter;

(3) CRISPR/Cas9 sistema de edição genética para *knockout* de genes específicos (TGIF).

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? O sistema CRISPR-Cas9 será utilizado como *knockout*. Nosso gene de interesse é o TGIF e ele está envolvido na sinalização celular da Wnt/ β -catenina. Sua deleção possivelmente provocará a permanência da β -catenina no núcleo celular o que terá implicações na transição epitélio-mesenquimal e adesão célula-célula. Além disso, a transformação de linhagens com genes que expressam fluorescência como GFP ou mCherry/RFP conferem coloração às células de interesse.

12. Algum OGM é agente patogênico esporulante? ☒ Não ☐ Sim: _____

13. Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar? ☒ Não ☐ Sim: _____

14. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2020-16

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

O *knockout* de 'TGIF' por CRISPR/Cas9 pode ter impactos na transição epitélio mesenquimal e adesão celular. Esse gene tem sido reportado como superexpresso em câncer de mama triplo negativo e ao desliga-lo esperamos que a via de sinalização Wnt/ β -catenina seja interrompida. Todos os OGMs apresentam resistência aos antibióticos puromicina ou kanamicina. Dessa forma, tanto a transformação para linhagens fluorescentes quanto o sistema CRISPR/Cas9 não conferem infectividade ou patogenicidade aos OGMs.

15. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma avaliação médica periódica para experimentadores? [☒] Não [☐] Sim. Que tipo de avaliação? (Ex: consulta com médico, exames laboratoriais etc...) Qual periodicidade? Onde será realizada esta avaliação?

16. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma vacinação preventiva para experimentadores? [☒] Não [☐] Sim. Qual periodicidade? Onde será realizada esta vacinação?

17. No caso de uma eventual contaminação com organismos patogênicos ou toxinas, descreva medidas emergenciais para tratamento de pessoas envolvidas, descontaminação de equipamentos, instalações e meio ambiente. Os organismos não causam patogenicidade e nem liberam toxinas. Para descontaminação de superfícies e equipamentos utiliza-se hipoclorito por 20 minutos e álcool 70%. As nanopartículas utilizadas nesse estudo terão descarte apropriado a fim de evitar impactos ambientais, caso tenhamos contaminação por elas, será adicionado detergente comum por 20 minutos, pois sua base é produzida a partir de lipídeos sólidos a temperatura ambiente, essa medida é o suficiente para eliminar as nanoestruturas.

18. Projetos que façam uso de organismos ou genes associados ao patrimônio genético brasileiro precisam de cadastro na plataforma SISGEN (www.sisgen.gov.br). É de total responsabilidade do pesquisador responsável esse cadastramento e cumprimento da legislação. O projeto envolve manipulação, transferência, modificação, armazenamento, coleta de Organismos e derivados relativos ao patrimônio genético brasileiro? (☐) SIM, (☒) Não. No caso de responder sim, mencionar a seguir quais os códigos de acesso do cadastro no SISGEN, caso já tenha realizado _____.

O pesquisador principal tem conhecimento de que conforme a RDC 50 de 21/02/2002 da Anvisa, é responsável por determinar a classificação de riscos de seu projeto, assim como determinar EPIs e medidas de segurança necessárias para prevenir a contaminação de experimentadores, equipamentos, instalações, terceiros e meio ambiente. O pesquisador responsável também precisará providenciar rotina para realização de exames médicos e laboratoriais para sua equipe, bem como vacinações quando aplicável. Todos os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados pelo pesquisador principal, que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

Uso exclusivo da CIBio:

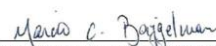
Número de projeto / processo: 2020-16

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 29/10/2020 .

Parecer final: [x]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências.

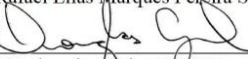
comentários da CIBio:

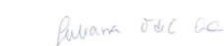

 Presidente da CIBio CNPEM
 Marcio Chaim Bajgelman

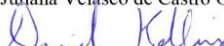

 Membro da CIBio CNPEM
 Celso Eduardo Benedetti

Ausente

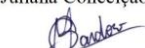
Membro da CIBio CNPEM
 Rafael Elias Marques Pereira Silva


 Membro da CIBio CNPEM
 Douglas Galante


 Membro da CIBio CNPEM
 Juliana Velasco de Castro Oliveira


 Membro da CIBio CNPEM
 Daniel Kolling


 Membro da CIBio CNPEM
 Juliana Conceição Teodoro


 Membro da CIBio CNPEM
 Mateus Borba Cardoso



Campinas, 01 de março de 2023

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Ref. Declaração de Biossegurança

Prezada coordenação, declaramos para fins do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular que **Raquel Bester Liszbinski**, desenvolveu seu projeto de pesquisa associado à sua tese, intitulada **"Investigação dos mecanismos moleculares induzidos por vetores nanoestruturados para transfecção de genes em culturas tumorais esferoides"**, sob orientação da **Dra. Sandra Martha Gomes Dias**. O projeto utilizou organismos classe de risco **II**, cumprindo os requisitos de biossegurança necessários, que integra o protocolo CIBio **2017-09**, o qual foi **APROVADO** para execução no CNPEM.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Martha Gomes Dias
Orientadora

Dr. Marcio Chaim Bajgelman
Presidente da CIBio - CNPEM

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ESTUDO DE NOVAS ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO: NANOTECNOLOGIA, METABOLISMO E MICROAMBIENTE TUMORAL**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18 de dezembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL BESTER LISZBINSKI**
Data: 18/12/2024 22:53:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Raquel Bester Liszbinski**

RG n.º 1107318881

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): **Sandra Martha Gomes Dias**

RG n.º M7854719