



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

***TAISNARA INGRID GONÇALVES SILVA***

**CONTRIBUIÇÃO DO *lncRNA HOTAIR* NA EXPRESSÃO GÊNICA NO  
CÂNCER DE MAMA**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay  
**Co-Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Stephany Cristiane Corrêa

**RIO DE JANEIRO  
2020**



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

***TAISNARA INGRID GONÇALVES SILVA***

**CONTRIBUIÇÃO DO *lncRNA HOTAIR* NA EXPRESSÃO GÊNICA NO  
CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional  
de Câncer como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Oncologia

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay  
**Co-Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Stephany Cristiane Corrêa

**RIO DE JANEIRO  
2020**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Palavras-chave: HOTAIR, câncer de mama, epigenética, lncRNA.



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

***TAISNARA INGRID GONÇALVES SILVA***

**CONTRIBUIÇÃO DO *lncRNA HOTAIR* NA EXPRESSÃO GÊNICA NO  
CÂNCER DE MAMA**

**ORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

**CO-ORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Stephany Cristiane Corrêa

**Aprovada em:**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Robson de Queiroz Monteiro – Presidente

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Tatiana de Almeida Simão

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Nathália de Oliveira Meireles da Costa

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Sheila Coelho Soares Lima – Suplente Interna

**Prof. Dr.** André Luiz Mencialha – Suplente Externo

**RIO DE JANEIRO  
2020**

A todos os pacientes, com os quais me encontrei diariamente pelos corredores do HC1 – INCA. A força de vocês me fez mais forte e me lembrou, dia após dia, a razão de estar aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que como um bom Pai me cuidou e deu forças para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Eliete e Gerzo, pelo amor e apoio incondicional, por me darem asas para voar, sem nunca me deixar esquecer que eu sempre posso voltar para casa.

À minha orientadora, Dra. Eliana Abdelhay, que tanto fez por mim nesses 4 anos juntas. Por todo apoio e cuidado, principalmente nos últimos meses de mestrado, quando o cansaço falou mais alto. Serei eternamente grata por tudo.

À minha co-orientadora, Dra. Stephany Corrêa, que passou os perrengues da bancada comigo e me ensinou muito sobre o método e a escrita científicos.

À Dra. Renata Binato, por me auxiliar em vários experimentos, pela boa vontade em ajudar e tirar minhas dúvidas e pelas vezes que me socorreu nos momentos de desespero.

Aos amigos do LCT, Andressa, Everton, Mariana e Pedro. Obrigada por serem meu porto seguro, por tornarem meus dias mais leves e felizes. Não foi fácil, mas seria muito mais difícil se eu não tivesse vocês. Ao Bruno, Igor, Patrícia e Taísa, pela ajuda e todas as discussões, científicas ou não.

Aos amigos de Minas Gerais, em especial à Luíza, Melina, Bruna, Danielle, Jean, Nicholas, Ítalo, Raphael e Rodrigo, por todas as conversas, conselhos, risadas e apoio. Vocês são minha saudade diária e eu amo vocês demais da conta.

Aos amigos do Espírito Santo, em especial Priscila e Thaciana, que também seguem na pós-graduação e dividem comigo as dificuldades e as felicidades deste caminho. À Murilo, com quem eu aprendi e cresci muito, que me apoiou e incentivou desde o início.

Aos amigos do Rio, em especial à Cinthia Tanner e Chico Azevedo, que sempre estiveram ao meu lado, cuidando, incentivando e aconselhando. A todos os amigos da Intactus CF: meu eterno Team 6:30 AM e as amigas do “Cross Girls”, obrigada! Vocês me ensinaram muito e me ajudaram tantas vezes, a segurar a barra do *crossfit* e da vida! Agradeço também à Allan Marques e Fabiano Mafra, por ouvirem meus longos áudios sobre os perrengues do mestrado e pela torcida de sempre.

À Amanda e Larissa, “tequila e limão”, com quem eu dividi meus medos, alegrias, tristezas e aventuras. Obrigada por ouvirem meus desabafos e me confortar quando eu não estava bem. Pelas resenhas de sexta-feira e tantos outros momentos que marcaram este último ano. Que

bom que eu encontrei vocês pelo caminho!

À Msc. Luíza Abdo, Dra. Gabriela Nestal e Dr. Gerson Ferreira, pela ajuda com os experimentos de citometria e RT-qPCR.

À Dra. Isabela Guimarães, pela ajuda com a cultura de células.

A todos os alunos e funcionários do Alojamento III do INCA, minha casa no Rio de Janeiro. Em especial, às amigas do 202, Mariana, Priscila e Amanda, com quem dividi a casa e a vida. Agradeço também à Adriana, Ludmila, Edilene, Thais, Anna Clara, Josi, Diego, Igor, Ailton e Valdo, por darem ainda mais cor à minha caminhada.

A todos os amigos do CEMO, por contribuírem com a minha formação profissional e pessoal.

A Pós-Graduação em Oncologia do INCA, secretaria, corpo docente e discente, por todo apoio e aprendizado.

Por fim, agradeço às agências de fomento pelo financiamento concedido, que tornou possível a realização deste trabalho.

“Podemos dizer que o cientista vive em dois mundos. De um lado, o mundo ordinário, o mundo público, que ele divide com os outros seres humanos. De outro, um mundo privado onde a pesquisa transcorre; um mundo com paixões, exaltações, desesperos; mundo onde se pode subir ao céu ou descer ao inferno”.

(François Jacob)





**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **CONTRIBUIÇÃO DO *lncRNA HOTAIR* NA EXPRESSÃO GÊNICA NO CÂNCER DE MAMA**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Taisnara Ingrid Gonçalves Silva**

Os RNAs não-codificantes (ncRNAs) são formados por um grande grupo de transcritos que participam da regulação epigenética da expressão gênica. Dentro deste grupo estão os *lncRNAs*, transcritos com mais de 200pb que podem, de forma direta ou indireta, participar do controle da expressão gênica nos seus diversos níveis. Em câncer de mama (CM), que hoje é a principal causa de morte por câncer no sexo feminino, tem sido reportado contribuições importantes desses *lncRNAs*, tanto no desenvolvimento, quanto na progressão do tumor. O CM é uma doença heterogênea e multifatorial, classificada de acordo com a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e HER2, originando assim cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, luminal-HER, HER-E e triplo-negativo. Este último não possui expressão de nenhum dos receptores. Um dos primeiros *lncRNAs* a ser descrito foi *HOTAIR*, regulando a transcrição de genes *HOX* em *Drosophila melanogaster*. Atualmente, estudos têm demonstrado um significativo papel de *HOTAIR* na tumorigênese da mama. Assim, a fim de avaliar a contribuição do *lncRNA HOTAIR* no CM, realizamos inicialmente uma análise de expressão de *HOTAIR* em linhagens celulares representativas dos subtipos moleculares do CM. As linhagens BT-474 e MDA-MB-468, correspondentes aos subtipos Lum/HER e TN, respectivamente, apresentaram maior expressão de *HOTAIR*. Para avaliar as vias e processos celulares, nos quais *HOTAIR* poderia estar envolvido, realizamos o silenciamento transiente nas linhagens BT-474 e MDA-MB-468. Após o silenciamento, realizamos uma análise do perfil de transcritos, comparando as células silenciadas com as células controle não silenciadas, e identificamos um total de 854 genes diferencialmente expressos (DE) para o modelo Lum/HER e 1207 para TN. As análises *in silico*, revelaram que os genes DE identificados estão relacionados principalmente com ciclo celular, apoptose, transdução de sinal, reprodução, resposta imune, transcrição e dano ao DNA. As análises de enriquecimento das vias celulares demonstraram que as vias de regulação epigenética foi representativa para ambas as linhagens, bem como a via de apoptose para BT-474 e a sinalização de NF- $\kappa$ B, para MDA-MB-468. De um modo geral, observamos que *HOTAIR* pode desempenhar um papel importante na regulação da expressão gênica no CM, atuando em diversos níveis, através de sua associação com outros *lncRNAs* e modificadores de histona/ remodeladores de cromatina, bem como na regulação direta ou indireta de genes e vias de importantes de sinalização associados com o câncer.

**Palavras-chave:** *HOTAIR*, Câncer de mama, Epigenética, *lncRNA*



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **CONTRIBUIÇÃO DO *lncRNA HOTAIR* NA EXPRESSÃO GÊNICA NO CÂNCER DE MAMA**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Taisnara Ingrid Gonçalves Silva**

Non-coding RNAs (ncRNAs) are formed by a large group of non-translated transcripts that participate in the epigenetic regulation of gene expression. Within this group the *lncRNAs* ( $\geq 200$  pair base), can directly or indirectly, participate in the control of gene expression at different levels. In breast cancer (BC), which is today the leading cause of cancer related death in females, important contributions of these *lncRNAs* have been reported, both in tumor development and progression. BC is a heterogeneous and multifactorial disease, classified according to the expression of estrogen receptors, progesterone and HER2, which divide the BC in five molecular subtypes: luminal A, luminal B, luminal-HER, HER-E and triple-negative. The latter has no expression from any of the receptors. One of the first *lncRNAs* to be described was *HOTAIR*, regulating the transcription of HOX genes in *Drosophila melanogaster*. Currently, studies have shown a significant role of *HOTAIR* in breast tumorigenesis. Thus, in order to evaluate the contribution of *HOTAIR lncRNA* in the BC, we initially performed an analysis of expression of *HOTAIR* in cell lines representative of the molecular subtypes of the BC. The lines BT-474 and MDA-MB-468, corresponding to the subtypes Lum / HER and TN, respectively, showed greater expression of *HOTAIR*. In order to evaluate the cellular pathways and processes, in which *HOTAIR* could be involved, we performed transient silencing in the BT-474 and MDA-MB-468 cell lines. After silencing, we performed an analysis of the transcript profile, comparing the silenced cells with the non-silenced control cells, and identified a total of 854 differentially expressed (DE) genes for the Lum / HER model and 1207 for TN. In silico analyzes revealed that the identified DE genes are mainly related to cell cycle, apoptosis, signal transduction, reproduction, immune response, transcription and DNA damage. The enrichment analyzes of the cell pathways showed that the epigenetic regulation pathways were representative for both cell lines, as well as the apoptosis pathway for BT-474 and the NF- $\kappa$ B signaling for MDA-MB-468. In general, we observed that *HOTAIR* can play an important role in the regulation of gene expression in BC, acting at different levels, through its association with other *lncRNAs* and histone modifiers/ chromatin remodelers, as well as in the direct or indirect regulation of genes and important signaling pathways associated with cancer.

**Keywords:** *HOTAIR*, Breast cancer, Epigenetics, *lncRNA*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

°C – graus Celsius

5mC – 5-metilcitosina

AID – citidina desaminase induzida por ativação

ATP – adenosina trifosfato

BLIA – *Basal-Like* imuno ativado

BLIS – *Basal-Like* imuno suprimido

cDNA – DNA complementar

ceRNA – RNA endógeno competidor

circRNAs – RNA circular

Cis-NATs – transcrito natural anti-sentido

CM – Câncer de Mama

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

COMPASS – Complexo de proteínas associadas com SET1

CoREST/REST – Complexo REST corepressor 1

CpG – dinucleotídeo de citosina seguido por guanina

Ct – do inglês *threshold cycle*, ciclo de *threshold*

CTRL – controle

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNase – desoxirribonuclease

DNMT – DNA metil-transferase

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatado

dsRNA – do inglês *double strand RNA*, RNAs de dupla fita

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ENCODE – do inglês *Encyclopedia of DNA Elements*, Enciclopedia de elementos de DNA

eRNAs – do inglês *enhancer RNAs*, RNAs potenciadores

EV – do inglês *extracellular vesicles*, vesícula extracelular

FC – do inglês *fold change*,

fw – do inglês *forward*, senso

g – unidade de aceleração ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )

h – hora (s)

H2A – histona H2A

H2B – histona H2B

H3 – histona H3

H4 – histona H4

HAT – histona acetiltransferase

HDAC – histona desacetilase

HDM – histona demetilase

HER2 – do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*, receptor do fator epidermal humano 2

HMT – histona metiltransferase

HRT – do inglês *hormone replacement therapy*, terapia de reposição hormonal

IDT – do inglês *Integrated DNA Technologies*, Tecnologias integradas de DNA

IHQ – Imunohistoquímica

INCA – Instituto Nacional de Câncer

KCl – cloreto de potássio

LAR – Luminal/ Receptor de Andrógeno

LN – linfonodos negativos

lncRNA – do inglês *long non-coding RNA*, RNA longo não-codificante

LSD1 – demetilase 1 específica de lisina

me – metilação

MES - Mesenquimal

miRNA – micro RNA

mL – mililitro

MLL – *Mixed-lineage leucemia*

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

ncRNA – do inglês *non-coding RNA*, RNA não-codificante

ng – nanograma

NHGRI – do inglês *National Human Genome Research Institute*, Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano

NK – do inglês *Natural Killer*, linfócito natural *Killer*

nm – nanômetro

NURF – do inglês *nucleosome remodeling factor*, fator remodelador do nucleossomo

PBS – do inglês *phosphate-buffered saline*, tampão fosfato-salino

PcG – do inglês *Polycomb Group*, grupo Polycomb

PCR – do inglês *polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

piRNA – do inglês *PIWI-interacting RNAs*, RNA de interação PIWI

PRC1 – do inglês *Polycomb repressive complex 1*, complexo repressivo Polycomb 1

PRC2 – do inglês *Polycomb repressive complex 2*, complexo repressivo Polycomb 2

PR-DUB - Complexo repressivo polycomb deubiquitinase

pRNA – do inglês *promoter RNA*, RNA promotor

RE – receptor de estrógeno

rev – do inglês *reverse*, antissenso

RH – receptores hormonais

RIN – do inglês *RNA integrity*, integridade do RNA

RISC – do inglês *RNA inducing silence complex*, complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA – ácido ribonucleico

RP – receptor de progesterona

rRNA – RNA ribossômico

RT-qPCR – do inglês *real time quantitative PCR*, PCR quantitativo em tempo real

SBF – soro bovino fetal

siRNAs – do inglês *small interfering RNA*, RNA de interferência

snc-RNA – do inglês *small non-coding RNA*, pequenos RNAs não codificantes

snoRNA – do inglês *small nucleolar RNA*, pequeno RNA nucleolar

snRNA – do inglês *small nuclear RNA*, RNA nuclear

SWI/SNF – do inglês *complex SWItch/Sucrose Non-Fermentable*, complexo SWItch/ sacarose não fermentável

TA – Temperatura ambiente

TDG – timina glicosilase de DNA

TETs – do inglês *ten-eleven translocation*, translocação dez-onze

tRNAs – do inglês *transfer RNAs*, RNAs de transferência

TrxG – do inglês *Trithorax group*, grupo Trithorax

U – unidade

UTR – do inglês *untranslated regions*, regiões não traduzidas

WGS – sequenciamento de genoma completo

$\Delta G$  – delta G, energia livre de Gibbs

## LISTA DE GENES E PROTEÍNAS

*ADIPOQ* – do inglês *Adiponectin*, Adiponectina

*AGO* – do inglês *Argonaute*, Argonauta

*AKT* – do inglês *AKT serine/threonine kinase*, AKT serina/treonina quinase

*ARID1A* – do inglês *AT-Rich Interaction Domain 1A*, Domínio de interação rico em AT 1A

*ARID1B* – do inglês *AT-Rich Interaction Domain 1B*, Domínio de interação rico em AT 1A

*ARP7P* – do inglês *ARP7p component of both the SWI/SNF and RSC chromatin remodeling complexes*, componente dos complexos de remodelamento de cromatina *SWI/SNF* e *RSC*

*ARP9* – do inglês *SWI/SNF and RSC complexes subunit arp9*, subunidade dos complexos *SWI/SNF* e *RSC*

*ASH2* – do inglês *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit*, subunidade do complexo *Set1/Ash2* histona metiltransferase

*ASXL* – do inglês *additional sex combs like, transcriptional regulator*, adicional *sex combs like*, regulador transcricional

*B2M* – do inglês *Beta-2-Microglobulin*, Beta-2-Microglobulina

*BAP1* – do inglês *BRCA1 associated protein 1*, proteína 1 associada a BRCA

*BAP18* – do inglês *Chromatin complexes subunit BAP18*, subunidade do complexo de cromatina

*BRCA1* – do inglês *BRCA1, DNA repair associated*, BRCA1, associado ao reparo de DNA

*BRCA2* – do inglês *BRCA2, DNA repair associated*, BRCA2, associado ao reparo de DNA

*CBX* – do inglês *chromobox*

*CCND1* – do inglês *Cyclin D1*, Ciclina D1

*CDH1* – do inglês *Cadherin 1*, Caderina 1

*CFP1* – do inglês *CXXC-type zinc finger protein 1*, Proteína de dedo de zinco tipo CXXC 1

*CHD1* – do inglês *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*, proteína de ligação ao cromodominio-helicase-DNA 1

*CHECK2* – do inglês *checkpoint kinase 2*, quinase de ponto de checagem 2

*CXXC1* – do inglês *CXXC Finger Protein 1*, proteína 1 de dedo de zinco do tipo CXXC

*DGCR8 (PASHA)* – do inglês *DGCR8 microprocessor complex subunit*, subunidade do complexo microprocessador

*DKK-1* – do inglês *Dickkopf-related protein 1*, proteína 1 relacionada ao Dickkopf

*DPF2* – do inglês *Double PHD Fingers 2*, Dedos duplos PHD 2

*DPY30* – do inglês *Dpy-30 histone methyltransferase complex regulatory subunit*, subunidade reguladora do complexo histona metiltransferase Dpy-30

*DROSHA* – Drosha Ribonuclease III

*DVL2* – do inglês *Dishevelled segment polarity protein 2*, proteína 2 de polaridade do segmento *Dishevelled*

*EED* – do inglês *embryonic ectoderm development*, desenvolvimento do ectoderma embrionário

*EMS1* – do inglês *Src substrate cortactin*, Src substrato cortactina

*ERBB2* – do inglês *Human epidermal growth factor receptor 2*, receptor do fator de crescimento epidermal humano 2

*ESR1* – do inglês *estrogen receptor 1*, receptor de estrógeno 1

*EXPORTIN 5* – Exportina-5

*EZH1* – do inglês *enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit*, subunidade do complexo repressivo polycomb 2, *enhancer* de zeste 1

*EZH2* – do inglês *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*, subunidade do complexo repressivo polycomb 2, *enhancer* de zeste 2

*FAM124B* – do inglês *family with sequence similarity 124 member b*, família com semelhança de sequência 124 membro b

*FGF3* – do inglês *fibroblast growth factor 3*, fator de crescimento de fibroblasto 3

*FOXA* – do inglês *forkhead box a*, caixa de forquilha a

*FOXM1* – do inglês *forkhead box M1*, caixa de forquilha a

*FZD4* – do inglês *Frizzled class receptor 4*, receptor 4 da classe frisada

*GAPDH* – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

*GAS5* – do inglês *growth arrest specific 5*, parada de crescimento específico 5

*GATA2* – do inglês *GATA binding protein 2*, Proteína 2 de ligação ao GATA

*GSTP1* – do inglês *glutathione S-transferase Pi 1*, glutationa S-transferase Pi 1

*HCF1* – do inglês *host cell factor C1*, fator da célula hospedeira C1

*HDAC* – do inglês *Histone deacetylases*, histona desacetilase

*HMG2L1* – do inglês *HMG box-containing protein 4*, proteína 4 contendo caixa de HMG



*HMGB1* – do inglês *high mobility group protein B1*, proteína B1 do grupo de alta mobilidade

*HOTAIR* – do inglês *HOX transcript antisense intergenic RNA*, RNA intergênico anti-sentido transcrito HOX

*HOX* – do inglês *homeobox*

*IFNGR2* – do inglês *Interferon gamma receptor 2*, receptor 2 do interferon gama

*IL13RA1* – do inglês *Interleukin 13 receptor subunit alpha 1*, subunidade alfa 1 do receptor da interleucina 13

*IL17RE* – do inglês *Interleukin 17 receptor E*, receptor E da interleucina 17

*IL-20* – interleucina 20

*Ki-67* – do inglês *marker of proliferation Ki-67*, marcador de proliferação Ki-67

*KMT2B* – do inglês *Lysine methyltransferase 2B*, lisina metiltransferase 2B

*MAP3KI* – do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*, proteína quinase quinase quinase 1 ativada por mitogênio

*MENIN* – do inglês *Menin*

*MLL* – do inglês *mixed lineage leukemia*, leucemia linhagem mista

*MYC* – do inglês *MYC proto-oncogene*, proto-oncogene MYC

*NAVI* – do inglês *neuron navigator 1*, neurônio navegador 1

*NF-κB* – do inglês *nuclear factor kappa B*, fator nuclear kappa B

*OGN* – do inglês *osteoglycin*, osteoglicina

*PALB2* – do inglês *partner and localizer of BRCA2*, parceiro e localizador de BRCA2

*PCGF* – do inglês *polycomb group ring finger*, dedo anelar do grupo *polycomb*

*PER1* – do inglês *period circadian regulator 1*, regulador do período circadiano 1

*PGR* – do inglês *progesterone receptor*, receptor de progesterona

*PHC* – do inglês *polyhomeotic-like protein 1*, proteína 1 tipo polifomeótico

*PI3K* – do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*, Fosfoinositida 3-quinase

*PLIN1* – do inglês *perilipin 1*, perilipina 1

*PTEN* – do inglês *phosphatase and tensin homolog*, homólogo de fosfatase e tensina

*PTP1B* – do inglês *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1*, Proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 1

*RAB22* – do inglês *Ras-related protein Rab-22*, proteína relacionada a Ras Rab-22

*RAD51C* – do inglês *RAD51 paralog C*, parólogo c de *RAD51*

*RAN-GTP* – do inglês *GTPase Ran*, proteína nuclear de ligação ao *GTP Ran*

*RBI* – do inglês *RB Transcriptional Corepressor 1*, corepressor Transcricional *RB 1*

*RBBP4* – do inglês *RB binding protein 4*, *chromatin remodeling factor*, proteína 4 de ligação a *RB*, fator remodelador de cromatina

*RBBP5* – do inglês *RB binding protein 5*, *histone lysin methyltransferase complex subunit*, proteína 5 de ligação a *RB*, subunidade do complexo lisina histona metiltransferase

*RING1* – do inglês *ring finger protein 1*, proteína de dedo anelar 1

*RPN12* – do inglês *NIN1 (RPN12) Binding Protein 1 Homolog*, homólogo de proteína 1 de ligação a *NIN1 (RPN12)*

*SCML* – do inglês *sex comb on midleg-like protein*, crista sexual com proteína do tipo perna média

*SETD1A* – do inglês *SET domain containing 1A*, *histone lysine methyltransferase*, domínio *SET* contendo 1A, histona lisina metiltransferase

*SETD1B* – do inglês *SET domain containing 1B*, *histone lysine methyltransferase*, domínio *SET* contendo 1B, histona lisina metiltransferase

*SMARCA1 (SNF2L)* – do inglês *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1*, Regulador de cromatina dependente de actina, relacionado a *SWI/SNF*, subfamília A, membro 1

*SMARCA5 (SNF217)* – do inglês *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 5*, Regulador de cromatina dependente de actina, relacionado a *SWI/SNF*, subfamília A, membro 5

*SMARCB1* – do inglês *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1*, Regulador de cromatina dependente de actina, relacionado a *SWI/SNF*, subfamília B, membro 1

*SMARCC1* – do inglês *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily c member 2*, Regulador de cromatina dependente de actina, relacionado a *SWI/SNF*, subfamília c, membro 1

*SMARCC2* – do inglês *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily c member 2*, Regulador de cromatina dependente de actina, relacionado a *SWI/SNF*, subfamília c, membro 2

*SMARCE1* – do inglês *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily E, member 1*, Regulador de cromatina dependente de actina, relacionado a *SWI / SNF*, subfamília E, membro 1

*SOX* – do inglês *SRY-Box transcription factor*, fator de transcrição SRY-Box

*STAT* – do inglês *signal transducer and activator of transcription*, transdutor de sinal e ativador de transcrição

*SUZ12* – do inglês *SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit*, subunidade do complexo repressivo polycomb 2, SUZ12

*TARBP* – do inglês *RISC-loading complex subunit TARBP*

*TCF* – do inglês *Transcription Factor*, fator de transcrição

*TP53* – do inglês *tumor protein p53*, proteína tumoral p53

*TRAF4* – do inglês *TNF receptor associated factor 4*, fator 4 associado ao receptor de TNF

*WDR5* – do inglês *WD repeat domain 5*, domínio 5 da repetição WD

*WDR82* – do inglês *WD repeat domain 82*, domínio 82 da repetição WD

*WLS* – do inglês *Wnt ligand secretion mediator*, mediador de secreção de ligante Wnt

*XBPI* – do inglês *X-box-binding protein 1*, proteína 1 de ligação a *X-box*

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 – Progressão do câncer de mama.....                                                                                                            | 2  |
| Figura 1.2 – <i>Hallmarks of cancer</i> .....                                                                                                             | 3  |
| Figura 1.3 – Estrutura da cromatina e enzimas modificadoras de histona.....                                                                               | 13 |
| Figura 1.4 – Complexos Polycomb (PcG) e Trithorax (TrxG).....                                                                                             | 14 |
| Figura 1.5 – Complexos SWI/SNF e NURF.....                                                                                                                | 15 |
| Figura 1.6 – Classes de <i>RNA</i> .....                                                                                                                  | 17 |
| Figura 1.7 – Biogênese e função de <i>microRNAs (miRNAs)</i> .....                                                                                        | 19 |
| Figura 1.8 – Classificação do <i>lncRNAs</i> .....                                                                                                        | 21 |
| Figura 1.9 – Mecanismos reguladores de <i>lncRNAs</i> .....                                                                                               | 23 |
| Figura 4.1 – Expressão de <i>HOTAIR</i> em linhagens celulares de CM.....                                                                                 | 36 |
| Figura 4.2 – Padronização da concentração de Lipofectamina 3000 para realização do experimento de transfecção.....                                        | 37 |
| Figura 4.3 – Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da eficiência de transfecção das linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468..... | 38 |
| Figura 4.4 – Silenciamento de <i>HOTAIR</i> após transfecção com <i>siRNA</i> .....                                                                       | 39 |
| Figura 4.5 – Genes diferencialmente expressos nas linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468 após silenciamento de <i>HOTAIR</i> .....                       | 40 |
| Figura 4.6 – Análise comparativa através do Diagrama de Venn das linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468 após silenciamento de <i>HOTAIR</i> .....        | 40 |
| Figura 4.7 – Regulação epigenética da expressão gênica em BT-474.....                                                                                     | 44 |
| Figura 4.8 – Regulação da apoptose através de proteínas mitocondriais em BT-474.....                                                                      | 45 |
| Figura 4.9 – Cascata de sinalização de caspases em BT-474.....                                                                                            | 46 |
| Figura 4.10 – Regulação da apoptose através da cascata de sinalização de FAS em BT-474.....                                                               | 47 |
| Figura 4.11 – Regulação epigenética da expressão gênica em MDA-MB-468.....                                                                                | 52 |
| Figura 4.12 – Regulação epigenética de silenciamento gênico mediada por N-CoR-SMRT em MDA-MB-468.....                                                     | 53 |

Figura 4.13 – Regulação da transcrição pela ação não genômica do ácido retinóico e fosforilação de seus receptores em MDA-MB-468..... 54

Figura 4.14 – Regulação da resposta imune através da sinalização de HMGB1/ TLR, incluindo membros sinalização de NF- $\kappa$ B..... 55

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3.1 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para avaliação por PCR quantitativo em tempo real.....                                                                   | 31 |
| Tabela 4.1 – Ontologia gênica dos processos celulares identificados na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                                     | 41 |
| Tabela 4.2 – Vias celulares enriquecidas identificadas na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                                                  | 41 |
| Tabela 4.3 – Genes diferencialmente expressos da regulação epigenética identificados na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                    | 42 |
| Tabela 4.4 – Genes diferencialmente expressos de vias de apoptose identificados na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                         | 48 |
| Tabela 4.5 – Ontologia gênica dos processos celulares identificados na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                                 | 49 |
| Tabela 4.6 – Vias celulares enriquecidas identificadas na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                                              | 49 |
| Tabela 4.7 – Genes diferencialmente expressos da regulação epigenética identificados na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                | 50 |
| Tabela 4.8 – Genes diferencialmente expressos da via de sinalização de NF- $\kappa$ B identificados na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> ..... | 56 |

## SUMÁRIO

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                         | 1  |
| 1.1 Câncer de Mama .....                                                    | 1  |
| 1.1.1 Epidemiologia e aspectos clínicos.....                                | 1  |
| 1.1.2 Etiologia.....                                                        | 3  |
| 1.1.2.1 Fatores ambientais.....                                             | 3  |
| 1.1.2.2 Fatores genéticos.....                                              | 4  |
| 1.1.2.3 Fatores epigenéticos.....                                           | 5  |
| 1.1.3 Classificação molecular do CM.....                                    | 6  |
| 1.1.4 Heterogeneidade tumoral no CM.....                                    | 8  |
| 1.2 Regulação da expressão gênica .....                                     | 10 |
| 1.2.1 Regulação genética.....                                               | 10 |
| 1.2.2 Regulação epigenética.....                                            | 11 |
| 1.2.2.1 Modificação de histonas.....                                        | 11 |
| 1.2.2.2 Complexos modificadores de histonas/remodeladores de cromatina..... | 13 |
| 1.2.2.3 Metilação do DNA.....                                               | 15 |
| 1.2.2.4 RNAs não codificantes ( <i>nc-RNAs</i> ).....                       | 16 |
| 1.2.2.4.1 micro-RNAs ( <i>miRNAs</i> ).....                                 | 17 |
| 1.2.2.4.2 RNAs longos não codificantes ( <i>lnc-RNAs</i> ).....             | 19 |
| 1.2.3 <i>HOTAIR</i> .....                                                   | 24 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                          | 27 |
| 2.1 Objetivo principal.....                                                 | 27 |
| 2.2 Objetivos secundários.....                                              | 27 |
| 3. METODOLOGIA .....                                                        | 28 |
| 3.1 Cultivo de linhagens celulares.....                                     | 28 |
| 3.2 Análise de expressão gênica.....                                        | 28 |
| 3.2.1 Extração e quantificação do RNA total.....                            | 28 |
| 3.2.2 Digestão com DNase I e Transcrição Reversa (RT).....                  | 29 |
| 3.2.3 Elaboração dos iniciadores.....                                       | 30 |
| 3.2.4 PCR quantitativo em Tempo Real.....                                   | 31 |
| 3.3 Silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                             | 32 |

|       |                                                                                                                                                        |            |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.1 | Quantificação da taxa de silenciamento de <i>HOTAIR</i> .....                                                                                          | 33         |
| 3.4   | Análise do perfil de transcritos por microarranjo.....                                                                                                 | 33         |
| 3.5   | Análise estatística.....                                                                                                                               | 34         |
| 4.    | RESULTADOS .....                                                                                                                                       | 36         |
| 4.1   | <i>HOTAIR</i> está diferencialmente expresso entre os modelos <i>in vitro</i> de CM.....                                                               | 36         |
| 4.2   | Silenciamento gênico de <i>HOTAIR</i> .....                                                                                                            | 37         |
| 4.3   | Os potenciais alvos de <i>HOTAIR</i> são diferentes entre os modelos Lum/HER e TN.....                                                                 | 39         |
| 4.4   | <i>HOTAIR</i> tem influência na regulação epigenética e em vias de apoptose na linhagem BT-474.....                                                    | 40         |
| 4.5   | <i>HOTAIR</i> tem influência na regulação epigenética da transcrição gênica e via de NF-κB na linhagem MDA-MB-468.....                                 | 48         |
| 5.    | DISCUSSÃO .....                                                                                                                                        | 57         |
| 6.    | CONCLUSÃO .....                                                                                                                                        | 68         |
| 7.    | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                       | 69         |
| 8.    | ANEXOS.....                                                                                                                                            | 84         |
|       | <b>Anexo A - Tabela dos genes diferencialmente expressos após silenciamento de <i>HOTAIR</i> na linhagem BT-474 (<i>fold change</i> 2,0) .....</b>     | <b>84</b>  |
|       | <b>Anexo B - Tabela dos genes diferencialmente expressos após silenciamento de <i>HOTAIR</i> na linhagem MDA-MB-468 (<i>fold change</i> 2,0) .....</b> | <b>113</b> |
|       | <b>Anexo C - Legenda dos símbolos apresentados nas análises <i>in silico</i> pelo software Metacore® .....</b>                                         | <b>154</b> |



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer de Mama

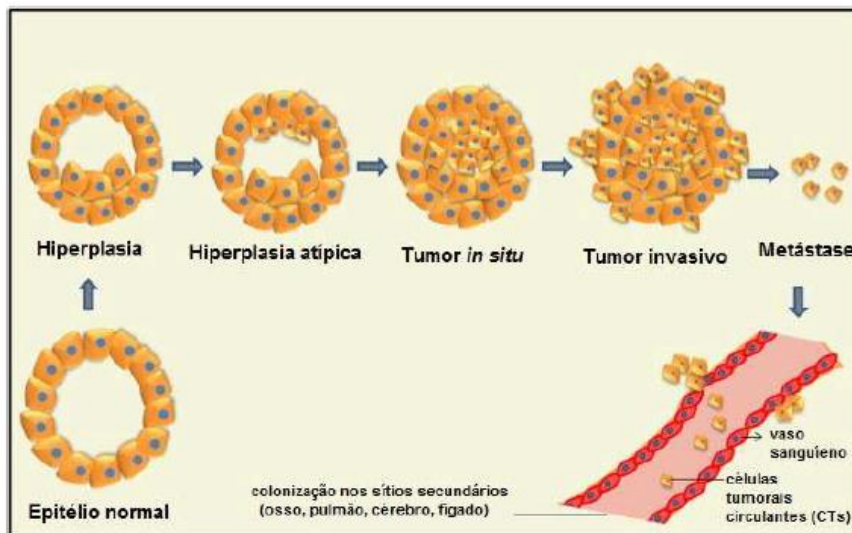
### 1.1.1 Epidemiologia e aspectos clínicos

O câncer de mama (CM), excluindo o câncer de pele não melanoma, é o mais frequente entre mulheres de todo o mundo. Para o ano de 2018, foram estimados mais de 2 milhões de novos casos de CM, com uma taxa de incidência de 46,3% a cada 100 mil mulheres. É a primeira causa de morte por câncer no sexo feminino, sendo estimadas 626,7 mil mortes nesse mesmo ano, representando 15,16% de todos os óbitos. Em 2017, no Brasil, ocorreram 16.927 óbitos por CM (BRASIL, 2017; FERLAY *et al.*, 2019).

Existe uma variabilidade na incidência desse tipo de câncer nas diferentes regiões do mundo. Observa-se que o maior número de mortes relacionadas ao CM ocorre em países em desenvolvimento, como o Brasil. Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, as taxas de incidência e mortalidade apresentaram diminuição, reflexo das melhorias que ocorreram em função da detecção precoce e do tratamento da doença. Em contrapartida, nas regiões em desenvolvimento, as taxas de incidência vêm aumentando e o número de mortes ainda é alto, consequência do diagnóstico em estágios avançados da doença. Segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde, são estimados 66.280 novos casos de CM para cada ano do triênio 2020-2022 e o risco estimado é de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres. Isto coloca o CM, como uma questão importante de saúde pública e nos chama a atenção para a necessidade de modificar o cenário atual, investindo em políticas públicas de prevenção, rastreamento e diagnóstico precoce (STEWART; WILD, 2014; FERLAY *et al.*, 2019; INCA, 2020).

A glândula mamária é um dos poucos órgãos em que o desenvolvimento substancial ocorre apenas após o nascimento, passando por ciclos de crescimento, diferenciação, apoptose, regressão e remodelação durante a vida do organismo (BISSELL; RIZKI; MIAN; 2003). A transformação de um epitélio mamário normal para um epitélio tumoral demanda um longo período de tempo e requer múltiplas alterações moleculares, envolvendo a evolução de populações celulares com características fenotípicas cada vez mais agressivas. A hipótese principal para o desenvolvimento dos tumores de mama, é a progressão gradual da doença, que se inicia com uma displasia benigna seguida de uma hiperproliferação celular, conhecida como hiperplasia ductal atípica, evoluindo para tumores *in situ* e invasivos, e por final, em tumor metastático. Com exceção dos tumores pediátricos, a maioria dos tumores ocorre em idade mais avançada. Esses tumores podem ser esporádicos ou hereditários. Os primeiros,

ocorrem quando não há um componente genético forte associado e emerge mais tardiamente, geralmente pós-menopausa, enquanto que os hereditários, quando o indivíduo herda uma mutação que o predispõe a desenvolver a doença, podem ocorrer mais precocemente (figura 1.1) (RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013; SIBBERING; COURTNEY, 2015).



**Figura 1.1. Progressão do câncer de mama.** Progressão gradual do CM a partir de células epiteliais normais em vários passos até a metástase, onde as células tumorais circulantes podem colonizar sítios secundários, como por exemplo osso e pulmão (Adaptado de SUBRAMANIAN *et al.*, 2015).

As alterações celulares que ocorrem durante a transformação de uma célula saudável para uma célula tumoral e no estabelecimento e manutenção do tumor, são hoje conhecidas como *Hallmarks of Cancer* e foram propostas pela primeira vez nos anos 2000 por Hanahan e Weinberg. No ano de 2011, após uma revisão de diversos estudos, os mesmos autores publicaram novamente os *hallmarks* (figura 1.2), com o acréscimo de novas características relacionadas ao processo de tumorigênese. Foram apresentadas nesse artigo dez características das células tumorais, são elas: 1) sinalização proliferativa sustentada; 2) resistência a sinais supressores de crescimento; 3) resistência à morte celular; 4) imortalidade replicativa; 5) indução da angiogênese; 6) ativação de invasão e metástase; 7) metabolismo energético desregulado; 8) escape do sistema imune; 9) instabilidade genômica e mutações e 10) inflamação (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



**Figura 1.2. Hallmarks of Cancer.** Características celulares adquiridas durante os processos de transformação celular, progressão e manutenção tumoral (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011).

### 1.1.2 Etiologia

O CM é uma doença complexa, heterogênea e multifatorial. Apesar de alguns fatores genéticos terem um impacto forte e bem definido, a maioria das mulheres não apresenta um perfil de risco claramente identificável. Apenas 5–10% de todos os tumores de mama ocorrem devido a mutações herdadas em genes de alta penetrância. O risco de CM tem sido consistentemente associado à idade, história familiar de CM, fatores reprodutivos e hormonais, obesidade (somente para CM pós-menopausa), consumo de álcool, inatividade física, exposição à radiação ionizante e predisposição genética (DI SIBIO *et al.*, 2016). Os fatores de risco associados ao CM podem ser divididos em fatores genéticos e ambientais. Atualmente, sabe-se que alterações epigenéticas também podem contribuir para o desenvolvimento da doença.

#### 1.1.2.1 Fatores ambientais

Um dos fatores de risco mais bem documentados para o CM é a idade. A incidência de CM é extremamente baixa antes dos 30 anos (25 casos por 100.000), e aumenta linearmente até os 80 anos, atingindo um patamar de aproximadamente 500 casos por 100.000. Mulheres com idade igual ou superior a 65 anos, possuem um risco relativo de desenvolver CM de 5,8

quando comparadas com mulheres com idade inferior a 65 (SINGLETARY; GREENE; SOBIN, 2003).

Dentre os fatores reprodutivos e hormonais relacionados ao CM estão a menarca (primeira menstruação antes dos 12 anos) precoce, idade tardia na primeira gestação (após 30 anos), nuliparidade, ausência de períodos de amamentação e a menopausa tardia (após 55 anos). O uso de contraceptivos orais e terapias de reposição hormonal (HRT), especialmente por mais de 5 anos, também se mostram como fatores de risco para esse tipo de tumor (INCA, 2014; BERNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015; DI SIBIO *et al.*, 2016).

Outros fatores ambientais estão relacionados ao estilo de vida, como o consumo de álcool e tabaco, obesidade e sobrepeso, principalmente após a menopausa e sedentarismo. É importante ressaltar que fatores relacionados ao estilo de vida podem e devem ser mudados, no intuito de prevenir o desenvolvimento da doença pelos mesmos. A densidade mamária e a amamentação, parecem ser fatores protetores para o desenvolvimento de CM (INCA, 2014; BERNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015; DI SIBIO *et al.*, 2016).

#### 1.1.2.2 Fatores genéticos

Os fatores genéticos associados ao desenvolvimento de CM podem ser divididos em dois grupos: as alterações genéticas hereditárias e as esporádicas. As alterações genéticas hereditárias são aquelas relacionadas a mutações genéticas herdadas. Situações que podem indicar o risco aumentado de CM hereditário são: mulheres que possuem histórico familiar de CM e câncer de ovário, principalmente em parente de primeiro grau antes dos 50 anos; histórico de CM bilateral ou de ovário em parente de primeiro grau, em qualquer idade e histórico familiar de CM masculino, que representa apenas 1% de todos os casos (INCA, 2014 (2); BERNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015).

Mutações em genes supressores tumorais, como *BRCA1* e *BRCA2*, estão associadas a um risco aumentado (50-80%) de desenvolvimento de CM e de câncer de ovário ao longo da vida. Ambas mutações estão associadas a tumores que aparecem mais precocemente, e são mais comuns em mulheres brancas (DI SIBIO *et al.*, 2016). Além dessas mutações que são comumente relacionadas a esse tumor, outras mutações também podem estar relacionadas ao CM hereditário, como as de *CHEK2*, *PTEN*, *PALB2*, *RAD51C* e *CDH1* (KAMINSKA *et al.*, 2015).

Alterações genéticas esporádicas estão relacionados ao surgimento de tumores mais tardios e resultam de um acúmulo gradual de mutações adquiridas e não corrigidas em diferentes genes, como genes supressores de tumor e proto-oncogenes. Essas mutações estão associadas a exposição a fatores ambientais, como os citados anteriormente. Tumores esporádicos representam a maior parte dos CM. Alguns oncogenes que foram relatados desempenhando um papel precoce no CM esporádico são *MYC*, *CCND1*, *FGF3*, *EMS1* e *ERBB2* (HER2) (KENEMANS; VERSTRAETEN; VERHEIJEN, 2004; LEE; MULLER, 2010; ROMAGNOLO *et al.*, 2016). Outra mutação encontrada com frequência nesse tipo de tumor é do gene supressor tumoral *TP53*, levando a perda de parada do ciclo celular, favorecendo a tumorigênese (SCALIA-WILBUR *et al.*, 2016). No CM esporádico, a inativação mutacional de *BRCA1 / 2* é rara (KENEMANS; VERSTRAETEN; VERHEIJEN, 2004).

### 1.1.2.3 Fatores epigenéticos

As modificações epigenéticas envolvem alterações na expressão de um gene, sem alteração na sequência do *DNA*. Essas modificações incluem metilação do *DNA*, modificações de histona/remodelamento de cromatina e ação de *RNAs* não codificantes, todos melhor discutidos mais à frente. No CM, já foram reportadas diversas alterações dos padrões epigenéticos. Em um estudo, Esteller *et al.* (2001) observaram que os genes supressores de tumor *BRCA1* e *p16* e os genes de reparo de *DNA* *GSTP1* e *CHD1*, que estão todos envolvidos nos processos de invasão e metástase estavam hipermetilados em amostras de tumores de mama. Cho *et al.* (2015) observaram a hipermetilação de *BRCA1* em leucócitos que poderia estar associada com um risco aumentado de CM. Li *et al.* (2010) investigaram o *status* de metilação do *DNA* em 12 pares de amostras de CM receptor de estrógeno (RE) e receptor de progesterona (RP) positivos e ER / PR negativos por perfil genômico e encontraram diferentes perfis de metilação de *FAM124B*, *ST6GALNAC1*, *NAVI* e *PER1* de acordo com o *status* do receptor.

Zong *et al.* (2018) demonstraram em seu estudo que o *microRNA* miR-221/222 suprimiu significativamente a expressão de *GAS5* (um *RNA* longo não codificante, supressor tumoral) e aumentou o crescimento tumoral em um modelo de camundongo xenográfico de CM. Han *et al.* (2018) encontraram em seu estudo que o miR-181c aumenta a quimiosensibilidade e reduz a quimiorresistência a doxorubicina em linhagens de mama através da regulação negativa da osteopontina. Zhao *et al.* (2018) observaram em seu trabalho que a histona desacetilase 3 (HDAC3) foi positivamente regulada nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos

para-tumorais, e os altos níveis de *HDAC3* foram positivamente correlacionados com o estágio avançado de TNM do CM. Além disso, a superexpressão de *HDAC3* promoveu a proliferação e a glicólise aeróbica em células de CM.

### 1.1.3 Classificação molecular do CM

A classificação molecular do CM é feita com base na identificação de biomarcadores moleculares através de Imunohistoquímica (IHQ). São avaliados os receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), o receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), a proteína Ki-67, marcador de proliferação celular e algumas citoqueratinas (VODUC *et al.*, 2010; FOUNTZILAS *et al.*, 2012). Estes biomarcadores estão relacionados a biologia do tumor e são de grande importância para a realização do diagnóstico dos pacientes. Além disso, fornecem informações de prognóstico e auxiliam na escolha da melhor abordagem de tratamento (DE ABREU *et al.*, 2013). De acordo com a expressão gênica desses biomarcadores, o CM é classificado em cinco subtipos moleculares distintos: luminal A, luminal B, luminal-HER, HER-E e triplo-negativo (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001).

- **Luminal A:** Representa de 50-60% dos carcinomas de mama, sendo o subtipo mais comum e de melhor prognóstico. Tem como característica a expressão de receptores hormonais (RE-positivo e/ou RP-positivo), é negativo para HER2 e tem baixo índice Ki-67 (<14%). Apresenta um menor grau histológico e em relação ao diagnóstico, este subtipo é associado com menor envolvimento linfonodal e menores taxas de recorrência (VODUC *et al.*, 2010; LAM *et al.*, 2014; HASHMI *et al.*, 2018).
- **Luminal B:** A prevalência do subtipo Luminal B varia entre 10-30%. Este subtipo apresenta um grau histológico moderado e as taxas de recorrência são ligeiramente mais altas, em relação ao subtipo Luminal A (LAM *et al.*, 2014). Caracteriza-se pela expressão de receptores hormonais (RE-positivo e/ou RP-positivo) e a ausência de expressão de HER2. Entretanto, exibe um alto índice de Ki-67 (14%) (VODUC *et al.*, 2010; HASHMI *et al.*, 2018). Aproximadamente 20% dos CM caracterizados como Luminal B apresentam expressão de HER2, sendo caracterizados como Luminal-HER (HARBECK, 2015).

- **Luminal-HER:** Também chamado de Luminal B-like, é caracterizado por apresentar RE-positivo, podendo ou não apresentar RP, superexpressão ou amplificação de HER2 e alguma taxa de expressão de Ki-67 (VODUC *et al.*, 2010; CHO, 2016).
- **HER2-E (enriquecido):** Este subtipo molecular corresponde a 15% - 25% dos tumores de mama invasivos. Caracteriza-se pela amplificação do gene *ERBB2*, superexpressão da proteína HER2, podendo ou não apresentar expressão dos receptores hormonais. Apresenta um alto índice proliferativo, alto grau histológico e mau prognóstico (VODUC *et al.*, 2010; DE ABREU *et al.*, 2013; CHO, 2016; PRAT *et al.*, 2017).
- **Triplo-negativo:** É definido pela falta de expressão dos receptores hormonais (ER/PR) e a ausência de superexpressão e amplificação do HER2. Representam 10% a 20% de todos os tumores de mama e são caracterizados por um alto índice proliferativo, alto grau histológico, mau prognóstico, aumento da probabilidade de recorrência e morte (BARECHE *et al.*, 2018). Recentemente, os tumores triplo-negativos foram subclassificados em 4 grupos distintos: 1) Luminal / Receptor de andrógeno (LAR); 2) Mesenquimal (MES); 3) *Basal-Like* imuno suprimido (BLIS) e 4) *Basal-Like* imuno ativado (BLIA). O subtipo LAR apresenta expressão de receptor de andrógeno e sinalização de ER, prolactina e *ErbB4*, bem como de outros genes regulados por estrogênio (*PGR*, *FOXA*, *XBPI*, *GATA3*). Já os tumores MES, além de alterações em vias de ciclo celular, reparo de dano ao DNA e vias hereditárias de sinalização conhecidas no CM, apresentam alta expressão genes que normalmente são exclusivos de osteócitos (*OGN*) e adipócitos (*ADIPOQ*, *PLINI*) e importantes fatores de crescimento (*IGF-1*). Foi descrito anteriormente como Mesenquimal *basal-like* ou *Claudin-low*. O terceiro subtipo, chamado de BLIS, apresenta baixa expressão de moléculas que controlam a apresentação de antígenos, diferenciação de células imunes (linfócitos B, T e NK (*Natural Killer*)) e comunicação entre as respostas inata e adaptativa. Expressa exclusivamente vários fatores de transcrição da família *SOX*. Além disso, exhibe piores taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida específica de doença. Ao contrário de BLIS, o subtipo BLIA, apresenta regulação positiva dos genes que controlam as funções das células B, T e NK. Este subtipo tem melhor prognóstico, exhibe ativação das vias mediadas pelo fator de transcrição *STAT* e possui alta expressão dos genes *STAT* (BURSTEIN *et al.*, 2015).

#### 1.1.4 Heterogeneidade tumoral no CM

A heterogeneidade apresentada no CM está relacionada tanto a aspectos fenotípicos e ao perfil de expressão gênica e proteica dentro do tumor (heterogeneidade intra-tumoral) quanto entre tumores de diferentes pacientes (heterogeneidade inter-tumoral) (BADVE *et al.*, 2015). Essas diferenças têm impacto no diagnóstico, prognóstico e na abordagem terapêutica utilizada (KOREN; BENTIREN-ALI, 2015). Há uma controvérsia atual em relação à heterogeneidade tumoral, progressão e resistência terapêutica. Existem dois modelos propostos para explicar a heterogeneidade do CM e a origem dos diferentes subtipos: o primeiro modelo se baseia nas células-tronco tumorais e o segundo na evolução e seleção clonal. Embora ambos concordem que os tumores se originam de uma única célula que adquiriu múltiplas mutações e um potencial proliferativo ilimitado, existem diferenças importantes entre eles (POLYAK, 2007).

O primeiro modelo, propõe que células tumorais diferenciadas são descendentes das células-tronco tumorais e não são capazes de sofrer uma divisão celular auto-renovável. Assim, apenas as células-tronco tumorais podem acumular mudanças genéticas adicionais que podem impulsionar a progressão tumoral e a resistência aos medicamentos. Já o segundo, diz que os fenótipos de células tumorais são determinados com base na combinação do tipo de célula de origem da célula de iniciação tumoral, alterações genéticas e epigenéticas adquiridas e sinais parácrinos das células circundantes. Os fenótipos celulares não são estáveis e podem mudar à medida que o tumor evolui e todas as células tumorais têm a capacidade de sofrer uma divisão de auto-renovação, podendo contribuir para a progressão do tumor e resistência aos medicamentos. Em relação a resistência terapêutica, no modelo de células-tronco tumorais, essas células são inerentemente resistentes a medicamentos, já na evolução e expansão clonal, a terapia seleciona clones resistentes. Os dois modelos não têm que ser mutuamente exclusivos e sua combinação também é plausível (POLYAK, 2007).

Com os avanços nas tecnologias para avaliação de perfis transcricionais, diversos estudos foram feitos na intenção de compreender o perfil de expressão gênica de tumores de mama e deram origem à classificação do CM em subtipos moleculares (PRAT; PEROU, 2011). Com base nesses estudos foram desenvolvidos alguns ensaios de expressão gênica, que fornecem valor prognóstico adicional à informação imunohistoquímica e clínico-patológica padrão e tomada de decisão terapêutica, são eles: OncotypeDX®, MammaPrint®, Prosigna®, EndoPredict (EPclin), Breast Cancer Index<sup>SM</sup> e MapQuantDx<sup>TM</sup> (Genomic Grade Index). A maioria destes ensaios identifica pacientes para os quais o uso da quimioterapia pode ser



evitado. Os critérios de elegibilidade são amplamente semelhantes, incluindo pacientes em estágio inicial (I ou II), linfonodos (LN) negativos ou 1-3 positivos para LN, receptores hormonais (RH) positivos e HER2 negativos (REED *et al.*, 2018).

Estudos utilizando abordagens genômicas, como sequenciamento do genoma completo (WGS), vem sendo utilizados para aumentar a compreensão da expressão gênica no CM. Um estudo recente conduzido por Nik-Zainal e colaboradores (2016), analisou o genoma de completo de 560 tumores de mama, onde foi observado que 93 genes codificadores de proteínas carregavam possíveis mutações *drivers*, que são mutações capazes de guiar o comportamento clínico dos tumores e pelo menos um *driver* foi identificado em 95% dos tumores avaliados. Foi demonstrado também os dez genes mais frequentemente mutados em CM, que são: *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *CCND1*, *PTEN*, *ERBB2*, *chr8:ZNF703/FGFR1 locus*, *GATA3*, *RBI* e *MAP3K1*. Outras alterações genômicas observadas foram assinaturas de substituição de bases e rearranjos, caracterizados por duplicação ou deleção.

Esse tipo de análise é indispensável para uma explicação mais abrangente da base genética do CM e melhor compreensão da diversidade entre seus subtipos e até mesmo dentro do mesmo subtipo molecular. Entretanto, apesar do número crescente de informações a respeito do perfil de expressão gênica no CM, o diagnóstico ainda é realizado com base na caracterização histológica e no perfil de expressão dos biomarcadores RE, RP e HER2 (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001).

Assim como a identificação destes biomarcadores foi fundamental para o desenvolvimento de terapias alvo-específicas mais eficazes no tratamento do CM, estudos que visem identificar novos biomarcadores são de grande importância para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento do CM, bem como na compreensão da biogênese da doença. No contexto atual, os subtipos moleculares de CM que mais se beneficiaram das terapias-alvo foram os Luminais e HER2. Entretanto, com o avanço dos estudos moleculares e o refinamento da classificação dos tumores triplo-negativos, novos métodos de tratamento puderam ser propostos. Tumores triplo-negativos com sistema imune ativo, já possuem imunoterapia disponível e outras drogas estão em fase de teste clínico. Porém, os demais subtipos ainda precisam de mais estudos para terapias mais eficazes (SCHNITT, 2010; VINDULA; BARDIA, 2017; CHANG-QIANG *et al.*, 2019).

## 1.2 Regulação da expressão gênica

As alterações genéticas presentes no câncer estão associadas tanto ao surgimento quanto a progressão da doença e são resultado do desbalanço no fluxo de informações genéticas (*DNA – RNA – PROTEÍNA*) e de alterações nos mecanismos que regulam esse fluxo, afetando os programas transcricionais e traducionais normais da célula e favorecendo o desenvolvimento do tumor. Com o advento de abordagens sistêmicas e de *high throughput*, mais detalhes desse processo regulatório foram sendo elucidados, tornando-o ainda mais complexo (PIRAS; TOMITA; SELVARAJOO, 2012; SCHNEIDER-POETSCH; YOSHIDA, 2018).

Os mecanismos de regulação da expressão gênica compreendem vários passos desde a regulação da estrutura da cromatina até o controle da atividade da proteína, podendo ser divididos em dois grandes grupos: regulação genética e regulação epigenética (DELGADO; LEÓN, 2006; ALBERTS *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Regulação genética

Para a maioria dos genes o início da transcrição é ponto mais importante de controle da expressão gênica. A regulação transcricional é mediada por proteínas que podem ativar ou reprimir este processo, chamadas de fatores de transcrição, que se ligam a região promotora central (*core promoter*) do gene e recrutam a *RNA* polimerase II. Existem outras sequências regulatórias conhecidas como elementos proximais do promotor, que tendem a conter elementos reguladores primários e os elementos distais, que podem conter regiões reguladoras adicionais, tais como *enhancers*, *insulators* e *silencers* (LEVINE; TJIAN, 2003; THOMAS; CHIANG, 2006; KOLOVOS *et al.*, 2012; DANINO *et al.*, 2015).

Os *enhancers* são sequências no *DNA* onde proteínas podem se ligar potencializando a transcrição de um gene. Os *silencers* são sequências onde fatores regulatórios, chamados de repressores, podem se ligar bloqueando a transcrição e impedindo que o gene seja expresso. Já os *insulators*, impedem que *enhancers* associados a um gene regulem inadequadamente os genes vizinhos. Em adição, existe uma ampla classe de proteínas denominadas de co-ativadores e co-repressoras que atuam potencializando o efeito de fatores regulatórios (LEVINE; TJIAN, 2003; KOLOVOS *et al.*, 2012; ALBERTS *et al.*, 2017).

A etapa subsequente na expressão de um gene é a regulação pós-transcricional. A molécula de *RNA* pode passar por diferentes modificações depois que sua transcrição tenha começado.

Um ponto crítico da regulação pós-transcricional é um processo conhecido como *splicing*, que consiste na remoção do íntrons e junção dos éxons da sequência do pré-RNA. A clivagem dos íntrons é feita pelo *spliceossomo* e ocorre em sequências conservadas encontradas nas extremidades 5' e 3' dos íntrons designadas por locais de *splicing* (ALBERTS *et al.*, 2017).

Os éxons também podem ser unidos de maneira diferente, originando diferentes cadeias polipeptídicas a partir de um mesmo RNA. A esse processo dá-se o nome de *splicing* alternativo e tem como resultado a geração de diferentes isoformas de proteínas com diversas funções e / ou localizações (BARALLE; GIUDICE, 2017; RAMANOUSKAYA; GRINEV, 2017). Outros dois pontos importantes dessas regulação, são o capeamento do RNA, que consiste na adição de uma cauda poly-A na extremidade 3' (poliadenilação) e da adição do CAP na extremidade 5' e o seu transporte para o citoplasma, onde o RNA é transcrito, dando origem a uma proteína (SLOMOVIC *et al.*; 2010; ALBERTS *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Regulação epigenética

A regulação epigenética ocorre através de três mecanismos conhecidos como: metilação do DNA, modificação de histonas/remodelamento de cromatina e RNAs não-codificantes. Coerente com a importância desses mecanismos, a desregulação dos estados epigenéticos está intimamente ligada às doenças humanas, como por exemplo o câncer (SAWAN *et al.*, 2008; FEINBERG, 2018).

#### 1.2.2.1 Modificação de histonas

A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, formado por um filamento de DNA envolto em um octâmero de proteínas histonas, composto por dois dímeros de histona (H2A, H2B, H3, H4), enquanto a histona H1 une os nucleossomos adjacentes, empacotando-os. As caudas dessas proteínas se estendem da superfície do nucleossomo e abrigam a maioria dos sítios para modificações pós-traducionais. Essas modificações incluem acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação, e sua combinação dita o *status* de transcrição de um gene (ativa ou reprimida) através da dinâmica estrutura de cromatina (GRANT, 2001; GOLL; BESTOR, 2002; SAWAN; HERCEG, 2010).

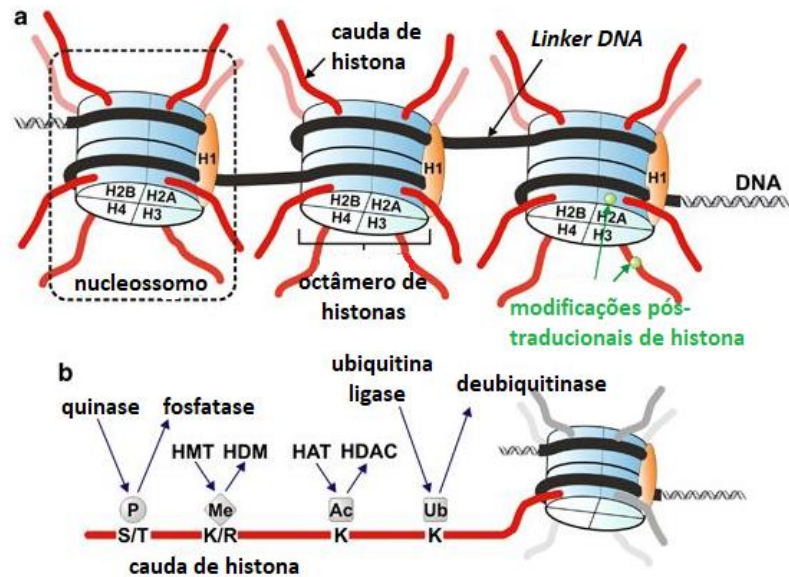
A acetilação consiste na adição de um grupamento acetil (-COCH<sub>3</sub>) aos resíduos de lisina, neutralizando sua carga positiva e enfraquecendo a interação DNA-histona, promovendo a

abertura da cromatina. A transferência desse grupamento é catalisada por enzimas chamadas de histona acetiltransferases (HATs). Essa reação é reversível, e a remoção do grupamento acetil é feita pelas histona desacetilases (HDACs) (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

A metilação de histonas consiste na adição de um radical metil ( $\text{CH}_3$ -) nos resíduos de lisina e arginina. Essa reação é catalisada pelas histona metiltransferases (HMTs) e pode ser desfeita pela ação de histona demetilases (HDMs). A arginina pode ser mono- ou di-metilada, já a lisina pode ser mono- (me), di- (2me) e tri- (3me) metilada (SAWAN; HERCEG, 2010; ALAM; GU; LEE, 2015). A metilação pode promover tanto a ativação quanto a repressão gênica, dependendo do resíduo que for modificado. (SAWAN; HERCEG, 2010; ALAM; GU; LEE, 2015).

A fosforilação é adição de um grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ), usualmente em resíduos de serinas, treonina e tirosina. Essa modificação é controlada por quinases e fosfatases que adicionam e removem a modificação, respectivamente. A fosforilação das histonas está associada normalmente a ativação gênica e também pode estar associada a diferentes processos celulares como o reparo de *DNA* e a condensação cromossômica (SAWAN; HERCEG, 2010; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; ROSSETTO; AVVAKUMOV; CÔTÉ, 2012).

A ubiquitinação envolve a ligação de uma ou mais moléculas de ubiquitina nos resíduos de lisina das caudas das histonas. A reação é catalisada pelas enzimas E1, E2 e E3 e pode promover tanto a ativação quanto a repressão da expressão gênica, dependendo do resíduo que for modificado (WEAKE; WORKMAN, 2008; SAWAN; HERCEG, 2010; CAO; YAN, 2012). A estrutura do nucleossomo e as possíveis modificações nas histonas estão representadas na figura 1.3.



**Figura 1.3. Estrutura da cromatina e enzimas modificadoras de histonas.** (a) A cromatina formada por unidades repetidas de nucleossomos, que consistem em octâmeros de proteínas histonas envoltas por um filamento de DNA. (b) A natureza dinâmica das modificações das histonas. As modificações que ocorrem nas caudas das histonas são mostradas juntamente com as enzimas que estabelecem e removem as marcas (Adaptado de FÜLLGRABE; HAJJI; JOSEPH, 2010).

### 1.2.2.2 Complexos modificadores de histonas/remodeladores de cromatina

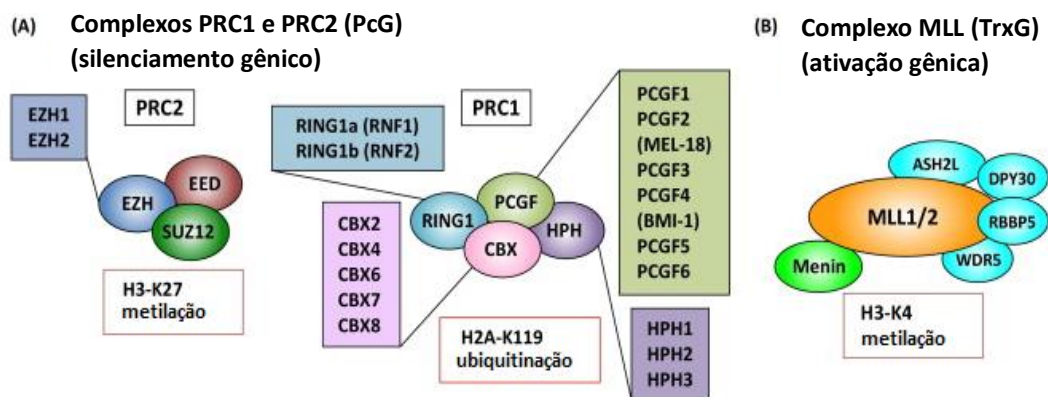
Dois complexos de proteínas bem conhecidos que apresentam função de modificadores de histona são *Polycomb* (PcG) e *Trithorax* (TrxG). Esses complexos são evolutivamente conservados e originalmente foram identificados como parte de um programa epigenético que regula o estado de expressão de genes, reprimindo ou ativando sua transcrição (SCHUETTENGRUBER *et al.*, 2007; SCHUETTENGRUBER *et al.*, 2017).

A família PcG é formado por três grandes grupos de proteínas conhecidos como Complexo repressivo polycomb 1 (PRC1), Complexo repressivo polycomb 2 (PRC2) e Complexo repressivo polycomb deubiquitinase (PR-DUB). Os complexos PcG foram identificados em *Drosophila melanogaster*, reprimindo a transcrição de genes *HOX*. Atualmente, a desregulação de proteínas PcG está relacionada ao desenvolvimento de várias doenças, mais notavelmente o câncer (CHITTOCK *et al.*, 2017).

O *core* do complexo PRC1 inclui as proteínas *PCGF*, *CBX*, *PHC*, *SCML* e *RING1*. A proteína *RING1* possui atividade de ligase E3 promovendo a monoubiquitinação específica da lisina 119 da histona H2A (H2AK119ub), uma marca associada ao silenciamento gênico. O *core* do complexo PRC2 compreende as proteínas *SUZ12*, *EED* e a histona metiltransferase

*EZH1* ou *EZH2*, que catalisam a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), outra típica marca de silenciamento epigenético. O complexo PRC1 reconhece a marca H3K27me3 feita por PRC2, reforçando a sinalização de silenciamento (SAUVAGEAU; SAUVAGEAU, 2010; MORITZ; TRIEVEL, 2018). O *core* do complexo PR-DUB é formado pelas proteínas *BAP1*, *ASXL* (1 e 2), bem como as proteínas *UCH-L5* e *Rpn13*. PR-DUB é um complexo histona deubiquitinase que remove a marca H2AK119ub1 depositada por PRC1 (CHITTOCK *et al.*, 2017).

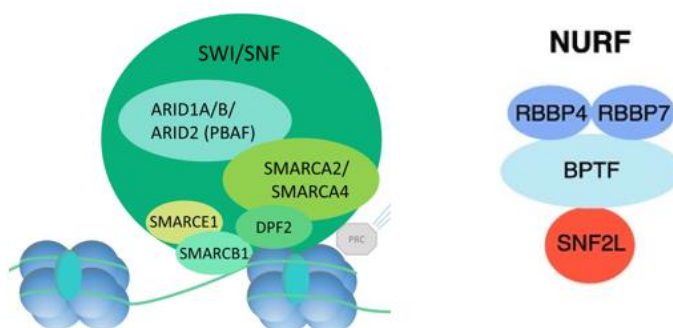
A família TrxG compreende um grupo heterogêneo de proteínas que desempenham um papel na ativação transcricional. O complexo MLL (*Mixed-lineage leukemia*) é responsável por catalisar a reação de trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3). A atividade de metiltransferase de MLL (figura 1.4) e de outros membros da família (SETD1A, SETD1B, MLL2, MLL3 e MLL4) depende da sua participação em complexos macromoleculares denominados COMPASS (Complexo de proteínas associadas com SET1). O *core* de todos os complexos COMPASS é bem conservado e inclui as proteínas *WDR5*, *ASH2*, *RBBP5* e *DPY30* (WARD). O complexo SET1/COMPASS contém adicionalmente as proteínas HCF1, WDR82 e a proteína de ligação ao DNA, CXXC1 (CFP1) e catalisa a trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) (SCHUETTENGROBER *et al.*, 2017; MEEKS; SHILATIFARD, 2017).



**Figura 1.4. Complexos PRC1 e PRC2, da família Polycomb (PcG) e Complexo MLL, da família Trithorax (TrxG).** (A) Dois tipos canônicos do complexo Polycomb, PRC1 e PRC2, são mostrados na figura. PRC2 é formado por *EZH1* e 2 (metiltransferase para H3K27), *EED* e *SUZ12*. *RING1a* e *RING1b* são responsáveis pela ubiquitinação H2AK119. PRC1 consiste em proteínas CBX (CBX2, 4, 6, 7 e 8), a família PCGF (PCGF1-6), a família RING1 e a família HPH (HPH1-3). (B) O complexo Trithorax, representado por MLL, é responsável pela metilação da H3K4. MLL é composto pelas proteínas MLL (1 e 2), ASH2L, DPY30, RBBP5, WDR5 e Menin (Adaptado de ONODERA; NAKAYAMA, 2015).

O complexo SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*), também conhecido como BAF, foi originalmente descrito em leveduras. É um complexo de remodelamento da cromatina, composto pela ATPase Swi2/Snf2p, duas proteínas relacionadas à actina (Arp7p e Arp9) e outras subunidades envolvidas nas interações com *DNA* e proteína-proteína. Atua promovendo o deslizamento dos nucleossomos ao longo do *DNA*, de maneira dependente de ATP, abrindo a cromatina e permitindo que genes alvo sejam transcritos. Também desempenha um papel importante em outros processos, como diferenciação celular e reparo de *DNA* (SANTEN; KRIEK; ATTIKUM, 2012; TANG; NOGALES; CIFERRI, 2010; LU; ALLIS, 2017).

Outro complexo remodelador de cromatina é o NURF (Fator de remodelamento de nucleossomo). Esse complexo foi identificado pela primeira vez em *Drosophila Melanogaster* e compreende as proteínas BPTF, a subunidade ATPásica SNF2L (SMARCA1) e RBBP4, podendo também conter outras proteínas como SNF2H (SMARCA5), BAP18 e HMG2L1. O complexo NURF, assim como SWI/SNF, promove o deslizamento do nucleossomo de maneira ATP-dependente permitindo assim a transcrição gênica (figura 1.5) (ALKHATIB; LANDRY, 2011; KOLUDROVIC *et al.*, 2015).



**Figura 1.5. Complexos SWI/SNF e NURF.** Os complexos SWI/SNF e NURF ligam-se ao *DNA* e histonas e efetuam o deslocamento do nucleossomo a fim de melhorar a acessibilidade do *DNA* e, assim, possibilitar a instalação da maquinaria de transcrição. Ambos atuam de maneira ATP-dependente (Adaptado de BÖGERSHAUSEN; WOLLNIK, 2018 e KATO; KOMATSU, 2015).

### 1.2.2.3 Metilação do *DNA*

A metilação do *DNA* é uma modificação covalente que consiste na adição de um radical metil (CH<sub>3</sub>-) na citosina que antecede a guanina nos chamados dinucleotídeos CpG, entretanto, todas as citosinas CpGs e CpHs (H = A, T, C) podem se tornar metiladas, mas

geralmente a 5-metilcitosina (5mC) é enriquecida em dinucleotídeos CpG. Esses dinucleotídeos estão espalhados por todo o genoma em regiões conhecidas como Ilhas CpG e são frequentemente encontrados em promotores gênicos. A reação é catalisada por um grupo de enzimas chamadas de *DNA* metiltransferases (DNMTs) e pode ser revertida pela ação de outros grupos enzimáticos, como as TETs (do inglês, *ten-eleven translocation*) metilcitosina dioxigenases, a citidina desaminase induzida por ativação (AID) e a timina glicosilase de *DNA* (TDG) (GUO *et al.*, 2011; CHEN; DZITOEVA; MANEV, 2012; JONES, 2012; PASTOR; ARAVIND; RAO, 2013; CHENG *et al.*, 2015).

A metilação do *DNA* pode reprimir diretamente a transcrição gênica, formando uma barreira física que impede a ligação de fatores de transcrição ao promotor do gene (LIM; MAHER, 2010; SMITH; MEISSNER, 2013). As marcas de metilação do *DNA* são passadas de forma estável durante a divisão celular e permite uma forma de "memória" epigenética (JONES, 2012; UNNIKRIISHNAN *et al.*, 2018).

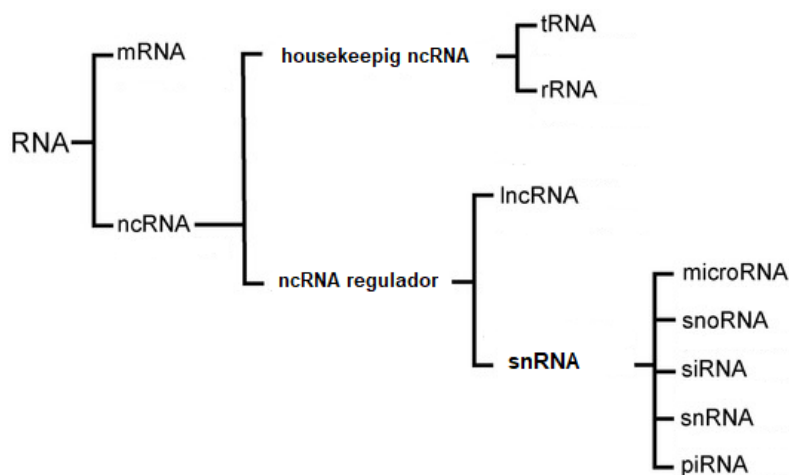
#### 1.2.2.4 RNAs não codificantes (*nc-RNAs*)

Podemos dividir os *RNAs* em dois grupos: codificantes e não-codificantes. Os *RNAs* codificantes são aqueles que serão transcritos e traduzidos dando origem a uma proteína, já os não-codificantes são transcritos, mas não originam proteínas. Sabe-se hoje que aproximadamente 2% do genoma humano codifica proteínas, e durante muito tempo os 98% restantes, foram considerados material inativo, regiões de vários megabases sem qualquer função, o chamado "*DNA* lixo". No entanto, com os avanços no desenvolvimento de técnicas para avaliação de transcritos, como *microarrays* e sequenciamento de última geração (*RNAseq*), bem como de análises de bioinformática, observou-se que o genoma é amplamente transcrito. A transcrição generalizada de genomas eucarióticos produz milhares de transcritos não-codificantes, que são agora reconhecidos como principais reguladores envolvidos em diversos processos celulares que incluem diferenciação e desenvolvimento celular, *imprinting* genômico, regulação da expressão gênica, controle do ciclo celular e adaptação a mudanças ambientais (BEERMANN *et al.*, 2016; ANDRES-PABLO; MORILLON; WERY, 2017; BUNCH *et al.*, 2018).

Os *RNAs* não codificantes (*ncRNAs*) são divididos em duas classes: *housekeeping ncRNAs* e *ncRNAs* reguladores. Os *housekeeping ncRNAs* incluem *RNAs* de transferência (*tRNAs*) e ribossômicos (*rRNAs*). Os *ncRNAs* reguladores podem ser divididos em duas subclasses em função de seu tamanho: os pequenos *RNAs* não codificantes (*snc-RNA*), com menos de 200



nucleotídeos e *RNAs* longos não codificantes (*lnc-RNA*), como tamanho superior a 200 nucleotídeos. *snc-RNA* incluem *microRNAs*, pequenos *RNAs* nucleolares (*snoRNAs*), pequenos *RNAs* de interferência (*siRNAs*), *RNAs* nucleares (*snRNAs*) e *PIWI-iinteracting RNAs* (*piRNAs*) (figura 1.6) (INAMURA, 2017).



**Figura 1.6. Classes de RNA.** Os RNAs são divididos em duas classes principais: RNA mensageiro (*mRNA*), codificador de proteína e RNA não codificante (*ncRNA*). Os *ncRNAs* incluem são divididos em *housekeeping ncRNAs* e *ncRNA* reguladores. Esse último grupo, é dividido em *lncRNAs* e *snRNAs*. Os *snRNAs* são subclassificados em *snc-RNA* incluem *microRNAs*, pequenos *RNAs* nucleolares (*snoRNAs*), pequenos *RNAs* de interferência (*siRNAs*), *RNAs* nucleares (*snRNAs*) e *PIWI-iinteracting RNAs* (*piRNAs*) (Adaptado de INAMURA, 2017).

#### 1.2.2.4.1 *micro-RNAs* (*miRNAs*)

Os *miRNAs* são definidos como *ncRNAs* de fita simples com aproximadamente 20 nucleotídeos de comprimento, endogenamente expressos e que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional. Desde a sua primeira descrição no verme *Caenorhabditis elegans* (LEE *et al.*, 1993), milhares de *miRNAs* foram identificados e compreendem o grupo mais bem estudado dentro da classe de *snRNAs*.

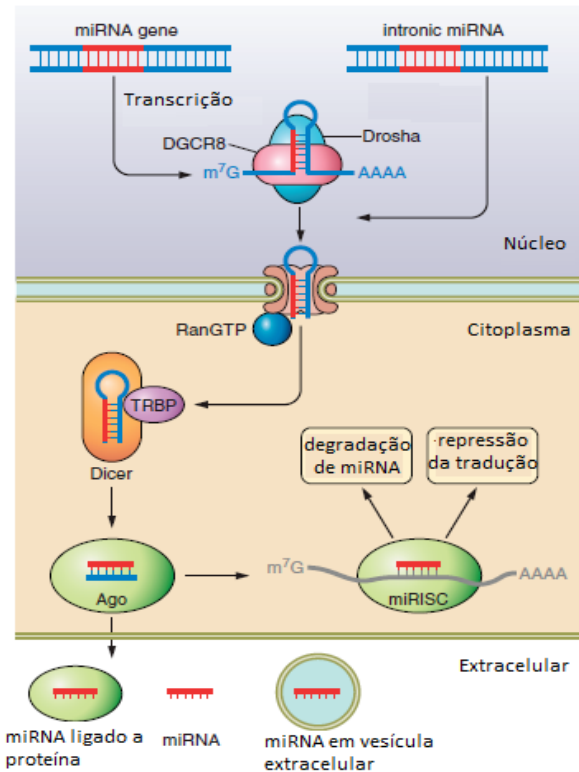
Os genes codificadores dos *miRNAs* estão localizados em todo o genoma e uma grande proporção é encontrada organizada dentro *clusters* compreendendo vários *miRNAs*. Os *miRNAs* são codificados dentro ou se sobrepõem a genes que codificam proteínas ou não-codificantes, estando sua expressão ligada à transcrição e processamento de tais genes hospedeiros (SAINI; GRIFFITHS-JONES; ENRIGHT, 2007; OZSOLAK *et al.*; 2008).

Na maioria dos casos, os *miRNAs* são transcritos pela RNA polimerase II (RNA Pol II), mas também podem ser transcritos pela RNA polimerase III (RNA Pol III). Após a transcrição são formados precursores chamados de pri-miRNA, que assim como o *mRNA*,

sofrem modificações pós-transcricionais que incluem o capeamento da extremidade 5' e a poliadenilação em 3'. Os pri-miRNA apresentam uma estrutura em grampo, que é processada por dois eventos: o primeiro é mediado por um complexo nuclear microprocessador, formado pela proteína DGCR8 (também conhecida como PASHA) e pela endonuclease Drosha, que reconhece e faz a clivagem do pri-miRNA, originando o pré-miRNA. Esse pré-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma pelas proteínas Exportin-5 e a RAN-GTP. O segundo evento é mediado pela endonuclease Dicer que, interagindo com TARBP, cliva o pré-miRNA perto do loop terminal liberando duplexes de RNA. Este duplex se associa com proteínas Argonata (AGO) e formam o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). A fita guia do *miRNA* maduro fica retida no complexo, enquanto a outra fita é degradada (MACFARLANE; MURPHY, 2010; CULLEN, 2004; DENLI *et al.*; 2004; LEE *et al.*, 2003)

Em uma rota alternativa (não-canônica) de biogênese, os *miRNAs* são derivados de pequenos grampos de íntrons, chamados mirtrons. Nessa rota, o passo de processamento por Drosha é substituído pela maquinaria de *splicing*. Este evento de clivagem gera um intermediário que é dobrado antes da formação de estrutura do grampo. Os pré-miRNAs resultantes são processados de acordo com a via de biogênese canônica (citada acima) (figura 1.7) (OKAMURA *et al.*, 2007; HA; KIM, 2014; ENDER *et al.*, 2008; BABIARZ *et al.*, 2008).

A interação entre o *miRNA-RISC* leva à repressão da tradução por dificultar a instalação da maquinaria de tradução ou favorecendo a degradação do *mRNA*. A degradação do *mRNA* alvo, se dá pela retirada do cap 5' e da cauda poli-A em 3'. Os *miRNAs* também podem induzir a tradução de alvos por recrutamento de complexos de ribonucleoproteínas, influenciar a biogênese de outros *miRNAs* ou outras espécies de *RNAs*, podem ser incorporados em vesículas ou micropartículas, atuando como moléculas de sinalização para transferência de informação genética entre células ou tecidos (BEERMANN *et al.*, 2016).



**Figura 1.7. Biogênese e função de *microRNAs* (*miRNAs*).** Os *miRNAs* são transcritos como precursores (*pre-miRNA*) ou derivados de introns, e amadurecem via processamento endonucleolítico. Os *miRNAs* maduros são incorporados ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC) e regulam a expressão do gene alvo por degradação ou repressão da tradução de seu *mRNA*. Os *miRNAs* também podem ser secretados para o meio extracelular interagindo com proteínas ou através de vesículas, atuando como moléculas de sinalização (Adaptado de BEERMANN *et al.*, 2016).

#### 1.2.2.4.2 RNAs longos não codificantes (*lnc-RNAs*)

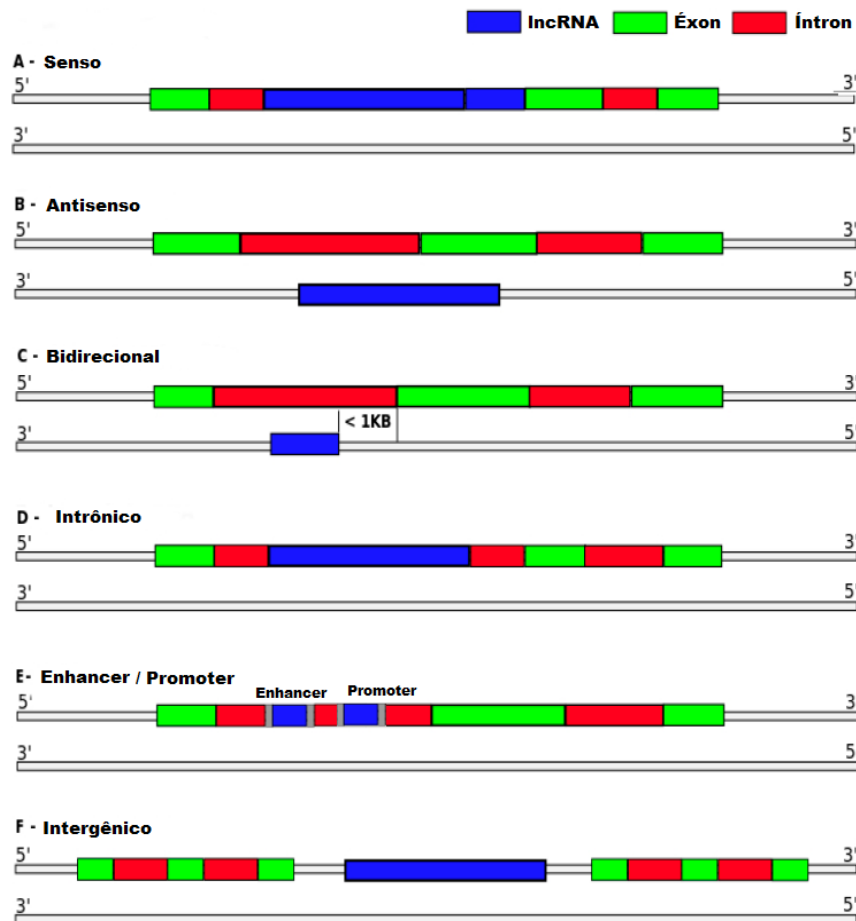
*RNAs* longos não codificantes (*lncRNAs*) compreendem diferentes classes de moléculas de *RNA* com tamanhos maiores que 200 nucleotídeos. Atualmente, este grupo de *ncRNAs* tem sido alvo de vários estudos visto que desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica tanto na transcrição quanto na pós-transcrição. Estão envolvidos em diversos contextos celulares e processos biológicos: são responsáveis pela integridade da estrutura nuclear, podem regular a expressão de genes próximos (atuando em *cis* no núcleo) ou genes em outro lugar da célula (atuando em *trans* no núcleo ou citoplasma) interagindo com proteínas, *RNAs* e *DNAs* (CHEN, 2016; FANG; FULLWOOD, 2016).

A biogênese dos *lncRNAs* ocorre no núcleo e podem ser transcritos pelas RNA Pol II ou III. Suas regiões promotoras podem ser epigeneticamente reguladas por modificações de histonas/remodelamento de cromatina bem como por ligação e regulação de fatores de transcrição que favorecem ou dificultam a expressão gênica. O processamento pós-transcricional é outra característica que os *lncRNAs* compartilham com genes codificadores de

proteínas: uma grande proporção de *lncRNAs* é capeada e poliadenilada, também podem sofrer *splicing* (normal ou alternativo), processos de edição de *RNA* e padrões de ativação transcricional. Alguns *lncRNAs* apresentam estrutura secundária, no entanto ainda não se sabe bem como ela se forma e qual sua relação com a função deles. Os *lncRNAs* podem ser encontrados em diferentes compartimentos da célula, podendo permanecer no núcleo, serem transportados para o citoplasma ou até mesmo exportados para fora das células por vesículas (KHANDELWAL *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2016; QUINN; CHANG, 2016).

Os *loci* genômicos nos quais os *lncRNAs* são transcritos, incluem regiões intergênicas e as orientações sentido (*sense*) e anti-sentido (*antisense*) de genes codificadores. Os sítios de início de transcrição estão localizados em íntrons, exons, regiões promotoras, *enhancers*, ou regiões não traduzidas (UTRs). Como resultado, os *lncRNAs* são classificados como senso, antisense, bidirecional, intrônicos, *enhancers RNAs*, *promoters RNAs* e intergênicos (figura 1.8) (VIEIRA *et al.*, 2017; DAHARIYA *et al.*, 2019).

- A) **Sense**: se sobrepõem parcial ou totalmente a um ou mais éxons de um gene codificador;
- B) **Antisense**: assim como os *sense*, podem se sobrepor parcial ou totalmente a um ou mais éxons de um gene codificador, mas na fita oposta;
- C) **Intrônicos**: são produzidos a partir de um íntron de um gene e não se sobrepõem a nenhum éxon;
- D) **Bidirecionais**: compartilham o mesmo promotor com genes codificadores de proteínas, mas são transcritos na direção oposta;
- E) **Intergênicos**: localizados entre genes codificadores de proteínas e podem ser transcritos em ambas as direções;
- F) **Enhancer RNAs** (*eRNAs*): são produzidos a partir de regiões *enhancer* de genes codificadores.
- G) **Promoter RNAs** (*pRNAs*): são produzidos a partir de regiões promotoras de genes codificadores.



**Figura 1.8. Classificação do lncRNAs.** (A) **senso:** se sobrepõem parcial ou totalmente a um ou mais éxons de um gene codificador; (B) **antisense:** se sobrepõem parcial ou totalmente a um ou mais éxons de um gene codificador na fita oposta; (C) **bidirecional:** compartilham o mesmo promotor com genes codificadores de proteínas, mas são transcritos na direção oposta; (D) **intrônico:** são produzidos a partir de um íntron de um gene e não se sobrepõem a nenhum éxon; (E) **enhancer/ promoter:** são produzidos a partir de regiões *enhancer* ou promotoras de genes codificadores; (F) **intergênico:** localizados entre genes codificadores de proteínas e podem ser transcritos em ambas as direções (Adaptado de VIEIRA *et al.*, 2017).

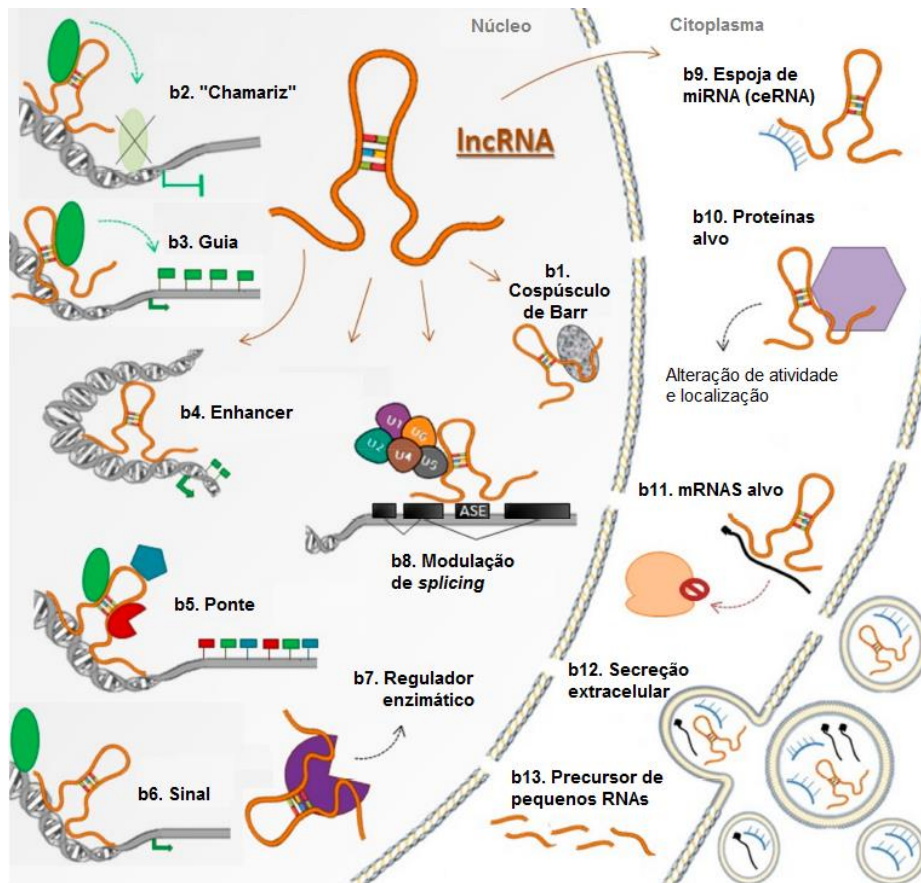
Outras duas classes de *lncRNAs* são conhecidas como *circRNAs* e *Cis-NATs*. Os *circRNAs* se originam de eventos de *splicing* de genes codificadores e formam loops covalentemente fechados e contínuos (perdem o cap 5' e a cauda poli A na extremidade 3'), formando um círculo. *Cis-NATs* (transcrito natural anti-sentido) podem ser transcritos em *cis* a partir de cadeias de *DNA* opostas no mesmo locus genômico ou em *trans* em *loci* separados. Diferem em seus tamanhos dependendo da região do gene em que se inserem e podem incluir combinações de éxon (s), íntron (s) ou a região completa dos genes codificadores de proteínas. Portanto, os NATs e seus respectivos *mRNAs* produzem pares de transcritos sense-antisense (ZHANG *et al.*, 2006; KHANDELWAL *et al.*, 2015; SOSLAU, 2018).

Em relação aos seus mecanismos de ação, os *lncRNAs* podem agir de forma *cis* ou *trans*. Os *lncRNAs* que atuam em *cis* regulam a estrutura da cromatina e/ou a expressão gênica no local onde são transcritos, já os que atuam em *trans* deixam seu local de transcrição e

desempenham funções em outros locais (VANCE; PONTING, 2014; KOPP; MENDELL, 2018).

Para *lncRNAs* de ação *cis*, é mais difícil distinguir funções da própria molécula de RNA do DNA do qual é transcrita. Foram propostos pelo menos três mecanismos potenciais, através dos quais um *locus* de *lncRNA* pode regular localmente a cromatina ou a expressão de um gene: 1) o próprio transcrito do *lncRNA* regula a expressão de genes vizinhos por meio de sua capacidade de recrutar fatores reguladores para o *locus* e / ou modular sua função; 2) o processo de transcrição e / ou *splicing* do *lncRNA* confere uma funcionalidade de regulação de genes que é independente da sequência do transcrito de RNA; ou 3) a regulação em *cis* depende unicamente dos elementos de DNA no promotor *lncRNA* ou no *locus* gênico e é completamente independente do RNA codificado ou de sua produção. Já os de ação *trans* podem ser classificados em pelo menos três subgrupos principais: 1) *lncRNAs* que regulam os estados da cromatina e a expressão gênica em regiões distantes do local da transcrição; 2) *lncRNAs* que influenciam a estrutura e organização nucleares e 3) *lncRNAs* que interagem e regulam o comportamento de proteínas e/ou outras moléculas de RNA (KOPP; MENDELL, 2018).

Sobre sua função, de acordo com os mecanismos reguladores da expressão de genes alvo ou de outras moléculas, os *lncRNAs* podem atuar como "chamariz" (*decoy*), atraindo proteínas reguladoras, como fatores de transcrição e modificadores de cromatina, bloqueando sua ligação ao DNA; como guia de proteínas (em geral, modificadores de cromatina) para locais específicos; como *enhancers* induzindo a transcrição em *cis* ou em *trans* de genes alvo; como ponte ligando diferentes proteínas e formando complexos de ribonucleoproteína (RNP), que também afetam a expressão gênica, como sinalizadores moleculares, ativando ou silenciando a expressão gênica através de sinalização para vias regulatórias; interagindo com enzimas (ex: quinases) regulando / intensificando sua atividade catalítica e alterando sua sinalização, na modulação de *splicing* alternativo de transcritos primários; como RNA endógeno competidor (*ceRNA*), servindo como uma esponja para *miRNAs*, bloqueando seu efeito; formando complexos moleculares com proteínas alvo que podem bloquear ou induzir efeitos funcionais, ou até mesmo alterar sua localização na célula; se ligando a *mRNAs* alvo, inibindo sua tradução pelos ribossomos. Além disso, os *lncRNAs* podem ser transferidos para outras células por vesículas extracelulares (EVs), e apesar de não ser exatamente uma característica regulatória, a liberação desses *lncRNAs* funcionais através de EVs é uma forma de regular genes, RNAs ou proteínas em outros tecidos (figura 1.9) (QUINN; CHANG, 2016; SALVIANO-SILVA *et al.*, 2018).



**Figura 1.9. Mecanismos reguladores de *lncRNAs*.** Um *lncRNA* pode atuar por múltiplos mecanismos reguladores, tanto no núcleo quanto no citoplasma. A figura sumariza todos os possíveis mecanismos através dos quais os *lncRNAs* podem atuar (Adaptado de SALVIANO-SILVA *et al.*, 2018).

Evolutivamente os *lncRNAs* apresentam semelhanças em sua sequência e função nas diferentes espécies. São propostas 4 dimensões para essa conservação. A primeira se baseia na homologia de sua sequência dando origem a transcritos altamente semelhantes. A segunda é referente ao nível estrutural, onde os *lncRNAs* de diferentes espécies podem se dobrar em estruturas secundárias ou terciárias semelhantes, apesar da falta de homologia de sequência. A terceira dimensão está a nível funcional, onde mesmo com diferentes sequências e estruturas, os *lncRNAs* podem executar funções semelhantes. Por fim, a nível transcricional, os *lncRNAs* podem ser transcritos de um *locus* sintênico em diferentes espécies, com genes vizinhos idênticos. Nesse caso, apenas o *locus* de transcrição é conservado e pode mediar funções em *cis*, onde como os transcritos do *lncRNA* podem diferir ou mesmo ter pouca relevância funcional (ULITSKY *et al.*, 2011; DIEDERICHS, 2014; IYER *et al.*, 2015).

Em 2010, Jia e colaboradores através de um estudo de bioinformática, identificaram 5446 genes de *lncRNAs* no genoma humano. Fazendo o alinhamento das sequências de seus achados com as disponíveis em bancos de dados, eles observaram que 62% dos genes descritos como “genes hipotéticos codificadores de proteínas” são na verdade *lncRNAs*. Outro

dado interessante observado foi que os genes putativos de *lncRNA* podem hospedar genes que são processados biologicamente em *RNAs* funcionais mais curtos, como *microRNAs*, *piRNAs*, *snoRNAs* ou *snRNAs*.

A modulação de atividades celulares por *lncRNAs* está documentada em diversos bancos de dados. Entre estes, o NONCODE v5.0 apresenta 172.216 transcritos e 96.038 genes de *lncRNAs* para espécie humana, na lista da LNCipedia são listados 127.802 transcritos de *lncRNA* em humanos, e na lista do GENCODE v29 estão 29.566 transcrições de *lncRNA* e 56.946 genes. Outros bancos de dados existentes como o NRED, LncRNAdb, lncRNome, fRNAdb, lncRNAtor, lncRNAMap, PLncDB, ChiPBase, NPInter, miRcode, DIANA-LncBase, LncRNA2Target, StarBase, lncRNADisease, Linc2go e lncRNASNP também apresentam informações sobre dados de expressão dos *lncRNAs*, seus papéis biológicos e alvos contendo *miRNA* (KHANDELWAL *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2016).

Além do seu importante papel na regulação da expressão gênica, os *lncRNAs* tem sido frequentemente associados ao desenvolvimento de diversas doenças, a destacar-se o câncer. A expressão aberrante dos *lncRNAs* pode ter repercussões no desenvolvimento e progressão do tumor, nos mecanismos de metástase e na resistência a drogas utilizadas para a terapia anti-tumoral. Alguns exemplos de *lncRNAs* que já foram descritos envolvidos em processos tumorigênicos são *H19*, *HOTAIR*, *MALAT1* e *XIST*. A investigação das propriedades e função dos *lncRNAs* na carcinogênese é de grande importância para melhor compreensão da biologia do tumor, bem como para a identificação de possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos (BARTONICEK *et al.*, 2016; CALLE *et al.*, 2018; DIAMANTOPOULOS *et al.*, 2018, MORLANDO; FATICA, 2018).

### 1.2.3 *HOTAIR*

O *lncRNA HOTAIR* (*Hox transcript antisense intergenic RNA*) foi descrito pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* regulando a transcrição de genes *HOX*, através do recrutamento de PRC2, inibindo assim sua expressão. Assim como os genes codificadores de proteínas, é transcrito pela RNA pol II, passa pelo processo de *splicing*, poliadenilação e capeamento. *HOTAIR* está localizado na direção antisense a 2.2 kb do *locus* gênico de *HOXC* no cromossomo 12, flanqueado por *HOXC11* e *HOXC12*. Mecanicamente, além de PRC2, *HOTAIR* também interage com o Complexo CoREST/REST, que coordena o direcionamento de PRC2 e LSD1 (demetilase 1 específica de lisina) à cromatina para a metilação de histonas



H3K27 e desmetilação da lisina K4 (MULLARD, 2007; GUPTA *et al.*, 2010; TSAI *et al.*, 2010; BHAN *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2017; GUTSCHNER *et al.*, 2018).

*HOTAIR* tem sido frequentemente associado ao desenvolvimento de tumores. Já foi relacionado a progressão, metástase e conseqüentemente a um pior prognóstico em câncer colorretal e carcinoma hepatocelular (KOGO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014). Em câncer cervical a superexpressão de *HOTAIR* foi associada a proliferação celular, migração, invasão, metástase e redução da sobrevida global (KIM *et al.*, 2015). Em câncer da tireóide, *HOTAIR* foi relacionado a proliferação, invasão e migração (DI *et al.*, 2017). Foi encontrado altamente expresso em câncer gástrico, estando relacionado com quimioresistência, apoptose, proliferação, invasão e metástase (FENG; HUANG, 2017).

Em leucemia mieloide aguda, a alta expressão de *HOTAIR* foi correlacionada com pior prognóstico (HAO; SHAO, 2015). Em osteossarcoma, foi descrito promovendo proliferação e metástase (LI *et al.*, 2017). Em glioma, foi demonstrado que *HOTAIR* atua como esponja do miR-126-5p promovendo a progressão deste tipo de tumor (LIU *et al.*, 2018), o mesmo foi visto para miR-152-3p em melanoma (LUAN *et al.*, 2017). Em leucemia mieloide crônica, *HOTAIR* foi associado a aquisição de resistência ao mesilato de imatinib, droga utilizada como primeira linha de tratamento (WANG *et al.*, 2017).

Zhang e colaboradores (2020), observaram o enriquecimento de *HOTAIR* em exossomos de pacientes e linhagens celulares de câncer de pulmão e que a expressão elevada de *HOTAIR* nesses exossomos promoveu a proliferação, migração e invasão das células tumorais. Foi observado em câncer de próstata, que o polimorfismo rs4759314 localizado no promotor de *HOXC11*, aumenta a expressão de *HOTAIR* e que isto está associado a um risco elevado de carcinogênese, o que poderia afetar o prognóstico, modulando a atividade da via de sinalização *HOTAIR* / miR-22 / HMGB1 (DENG *et al.*, 2020).

O envolvimento de *HOTAIR* em CM já foi reportado na literatura. Bhan e colaboradores (2013) observaram que a transcrição de *HOTAIR* pode ser induzida por estradiol via receptores de estrogênio (RE) e seus coreguladores e este mecanismo pode potencialmente contribuir para a progressão do CM, em modelo Luminal. Deng *et al.* (2017) demonstraram em seu trabalho que *HOTAIR* é um regulador chave da proliferação, formação de colônias, invasão e capacidade de auto-renovação em linhagens celulares semelhantes às células tronco tumorais da mama (*stem-like cell* - CSC), nos subtipos Luminal e Triplo-negativo e que isto ocorre em parte através da regulação do *Sox2* e *TP53*.

Foi observado por Han *et al.* (2018) que a regulação negativa de *HOTAIR* e *EZH2* induz a apoptose e inibe a proliferação, invasão e migração em linhagens celulares representantes dos subtipos Luminal, HER2 positiva e Triplo-negativo de CM. Milevskiy *et al.* (2016) demonstraram que a combinação da expressão de *HOTAIR* e *FOXM1*, permite maior discriminação de respondedores e não respondedores à terapia endócrina em pacientes com CM receptor de estrógeno positivo. Zhang *et al.* (2016) e Jiao *et al.* (2018) encontraram *HOTAIR* aumentado no plasma de pacientes com CM, indicando que ele possa ser um potencial marcador de diagnóstico. Sorensen *et al.* (2013) sugeriram em seu estudo que a expressão de *HOTAIR* pode servir como um biomarcador independente para a previsão do risco de metástase em pacientes com CM receptor de estrógeno positivo. Zhou *et al.* (2017) observaram que *HOTAIR* aumentou a radiorresistência em linhagem triplo-negativa de CM e acelerou a proliferação através da via de *Akt*.

Recentemente, Chen e colaboradores (2019) demonstraram que o bloqueio da expressão de *HOTAIR* sensibiliza células tumorais resistentes ao tratamento com Trastuzumab® em linhagem celular HER2 positiva. Neste mesmo ano, um grupo da Itália observou que a superexpressão de *HOTAIR* em pacientes, está correlacionada com metástase em linfonodos e tem forte associação com a expressão de receptores de andrógeno, confirmando seu papel prognóstico (COLLINA *et al.*, 2019). Tang e colaboradores (2019), observaram em seu trabalho que *HOTAIR* está superexpresso em linhagens celulares (modelos Luminal e Triplo-negativo). Neste mesmo trabalho, foi observado que *HOTAIR* também está superexpresso em exossomos de pacientes (subtipo Luminal) e que isso está relacionado a baixa sobrevida e uma pior resposta a quimioterapia com tamoxifeno, demonstrando o potencial papel de *HOTAIR* como marcador de diagnóstico e prognóstico no CM.

Apesar dos estudos envolvendo *HOTAIR* e o CM, é de grande importância continuar investigando seus mecanismos de atuação na doença, uma vez que os subtipos moleculares do CM diferem muito entre si e *HOTAIR* pode atuar de diferentes formas entre eles. Elucidar tais mecanismos, além de melhorar a compreensão do processo carcinogênico do CM, irá contribuir para o desenvolvimento de novas terapias bem como auxiliar no diagnóstico e prognóstico da doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo principal

Avaliar a contribuição do *lncRNA HOTAIR* na expressão gênica no câncer de mama.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar o silenciamento gênico de *HOTAIR* nas linhagens que apresentam sua superexpressão;
- Avaliar o perfil de expressão gênica de transcritos nas linhagens silenciadas para *HOTAIR* e comparar com o controle não silenciado;
- Verificar as vias de sinalização e os processos biológicos alterados com o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Cultivo de linhagens celulares

Neste trabalho, foram utilizadas linhagens celulares representativas dos subtipos moleculares do CM: MCF-7 (Luminal - LUMA), BT-474 (luminal/HER – Lum/HER) SKBR-3 e HCC-1954 (HER/neu positivas), MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (triplo negativas - TN). Todas as linhagens utilizadas neste estudo foram certificadas pelo laboratório do biobanco do Banco de Células do Rio de Janeiro (BRCJ) – Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM), a fim de garantir sua identidade.

O cultivo das linhagens, foi realizado em estufa sob condições de saturação de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>, na temperatura de 37°C. As linhagens MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific®), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 Unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 10% de Soro Fetal Bovino (SBF- Gibco®). As linhagens HCC-1954 e BT-474 foram cultivadas nas mesmas condições, porém com uma concentração final de 15% e 20% de SBF, respectivamente.

Todas as linhagens celulares utilizadas apresentam morfologia epitelioide aderente com crescimento em monocamada, sendo mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. Ao atingirem uma densidade de 70-80% de confluência de cultivo, foram submetidas à expansão. Para isso, o meio de cultura foi retirado e foram realizadas duas lavagens com Tampão Fosfato-Salino (PBS - NaCl 138 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de 7.4 a 25 °C - SIGMA-ALDRICH®). Posteriormente, as células foram submetidas à enzima tripsina (*Trypsin-EDTA 0,5%, no phenol red* (Gibco®) diluída em PBS 1X estéril. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos à 1500 rpm em temperatura ambiente (TA) e distribuídas novamente em garrafas de cultura para expansão. Este mesmo procedimento foi realizado nos experimentos posteriores para obtenção da densidade celular necessária a cada um deles.

#### 3.2 Análise de expressão gênica

##### 3.2.1 Extração e quantificação do RNA total

A extração e purificação do RNA total das linhagens celulares MCF-7, BT-474, SKBR-3, HCC-1954, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 foi realizada através do kit RNeasy (Qiagen®), seguindo o protocolo do fabricante.

Para isso foi utilizada uma densidade celular de  $1 \times 10^6$  células de cada linhagem. Os citocentrifugados foram ressuspensos em 350  $\mu\text{L}$  do tampão RLT (Qiagen®) acrescido de  $\beta$ -mercaptoethanol (SIGMA®) na proporção 1:100, para lise celular. A seguir, foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (diluídos em água RNase free). O volume final das amostras após a homogeneização (700  $\mu\text{L}$ ) foi aplicado nas colunas de purificação fornecidas no *kit*. As colunas foram então centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos, e o eluído da coluna foi descartado. Todas as centrifugações foram feitas em temperatura ambiente (TA).

Em seguida as membranas foram lavadas com 700  $\mu\text{L}$  do tampão RW1 e centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos, o eluído foi desprezado. Uma nova lavagem foi feita com 500  $\mu\text{L}$  do tampão RPE, repetindo a centrifugação. Uma terceira lavagem foi realizada com 500  $\mu\text{L}$  do tampão RPE, seguida da centrifugação por 2 minutos a 8000 x g. Posteriormente, as colunas foram centrifugadas à velocidade máxima (20238 x g) por um minuto, para total descarte do volume das colunas.

Para a eluição das amostras de RNA, foram adicionadas as membranas das colunas 50  $\mu\text{L}$  de água RNase free, seguida de centrifugação a 8000 x g por 1 minuto. Para a quantificação dos RNAs obtidos, foi utilizado o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop Technologies®) através do software NanoDrop ND-1000®, no comprimento de onda de 260 nm. Como controle de qualidade, para avaliação de integridade e qualidade, foram considerados os RNAs com razão de absorvância 260/280 no intervalo de  $1.8 \geq 2.2$ . Os RNAs extraídos e quantificados foram estocados em tubos de 1.5 mL a  $-80^\circ\text{C}$  até a sua utilização.

### 3.2.2 Digestão com DNase I e Transcrição Reversa (RT)

Após a extração e quantificação, as amostras de RNA foram submetidas à digestão com a enzima Ambion™ DNase I (RNase-free) (Invitrogen®), a fim de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Utilizou-se para essa reação 2  $\mu\text{g}$  do RNA total obtido de cada amostra. Foi adicionada água RNase free as amostras para obtenção de um volume final de 7,6  $\mu\text{L}$ , em seguida foram adicionou-se 0,9  $\mu\text{L}$  da enzima 2 U/ $\mu\text{L}$  e 0,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X DNase I Buffer. As reações foram incubadas por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , no termociclador MyCycler (BioRad). Para inativação da enzima, adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA 25  $\mu\text{M}$ , com incubação por 10 minutos a  $70^\circ\text{C}$  no termociclador.

A transcrição reversa, visando produção do *DNA* complementar (*cDNA*) foi realizada utilizando a enzima *SuperScript II* (Invitrogen®). À solução de *RNAs* tratados com DNase, adicionou-se 1 µL de Oligo(dt)<sub>12-18</sub> 500 µg/µL e 1 µL de dNTP Mix 10 mM. Esta solução foi incubada por 15 minutos a 65°C no termociclador, seguida de rápido resfriamento no gelo (0°C).

A cada microtubo (200 µL), foram adicionados 4 µL de tampão *First-Strand buffer 5X*, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL da enzima RNase OUT 40 U/µL para inibição de RNases. Após homogeneização, as reações foram incubadas por 2 minutos a 42°C no termociclador.

Em seguida, adicionou-se a cada microtubo 1 µL enzima *SuperScript II*, transcriptase reversa, com incubação no termociclador por 50 minutos a 42°C, para a síntese do *cDNA*, seguido de 15 minutos a 70°C, para inativação da mesma. Os *cDNAs* foram armazenados a -20°C até sua utilização.

### 3.2.3 Elaboração dos iniciadores

Os iniciadores (*primers*), senso (*forward* – fw) e *antisense* (reverse – rev), para cada um dos genes de interesse foram desenhados a partir da sequência do *RNA* mensageiro (*RNA<sub>m</sub>*) de cada gene. Essas sequências foram obtidas no banco de dados do genoma humano ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)), no formato FASTA. A visualização dos éxons foi feita a partir do site Emsenbl ([www.emsenbl.org](http://www.emsenbl.org)).

Para avaliação dos primers desenhados, foi utilizada a ferramenta online Oligo Analyzer ([www.idtdna.com/calc/analyzer](http://www.idtdna.com/calc/analyzer)), da IDT (*Integrated DNA Technologies*) seguindo os parâmetros: tamanho de 18 a 22 pares de base (pb); conteúdo de guanina ou citosina próximo ou igual a 50%; temperatura de dissociação (*melting*) entre 55°C e 60°C; temperatura de formação de grampo (*hairpin*) de no máximo 40°C, e  $\Delta G \geq -10$  kcal/mole para *self-dimer* (dímero entre dois *primers* iguais) e *hetero-dimer* (dímero entre *primers* senso e antissenso).

As sequências de cada um dos primers desenhados foram submetidas à análise pela ferramenta BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), para verificar se são complementares exclusivamente a sequência correspondente ao gene de interesse. Abaixo segue a tabela com a lista dos genes avaliados e seus respectivos *primers*.

**Tabela 3.1.** Sequência dos *primers* utilizados para avaliação por PCR quantitativo em tempo real.

| Gene          | Sequência dos iniciadores 5'-3'                                         | Temperatura de anelamento |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>HOTAIR</i> | (fw) GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC<br>(rev) ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC         | 60°C                      |
| <i>GAPDH</i>  | (fw) GTC AAC GGA TTT GGT CGT ATT G<br>(rev) TGG AAG ATG GTG ATG GGA TTT | 60°C                      |
| <i>B2M</i>    | (fw) TTC CTT CCT GGG CAT GGA GTC<br>(rev) AGA CAG CAC TGT GTT GGC GTA   | 60°C                      |

### 3.2.4 PCR quantitativo em Tempo Real

Para as análises da expressão gênica diferencial (*RNAm*), foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) associada ao sistema SYBR Green® (BIO-RAD), que consiste em um intercalante de *DNA* capaz de se ligar as novas duplas fitas de *DNA*, formadas pela ação da polimerase durante a extensão, resultando na emissão de fluorescência, permitindo quantificação e acompanhamento da reação em tempo real.

Primeiramente, foram construídas curvas padrão dos genes de interesse, para determinar o corte (*threshold*) de cada par de *primers*. Para isso, foram utilizadas concentrações seriadas de *cDNA* (40 ng, 4 ng, 0,4 ng, 0,04 ng e 0,004 ng) das linhagens K562 e MDA-MB-468 (controles positivos).

As reações para análise quantitativa foram realizadas nas linhagens celulares MCF-7, BT-474, SKBR-3 HCC-1954, MDA-MB-231 e MDA-MB-468, em triplicatas experimentais e consistiram de 2.5 µL da mistura de iniciadores a 2 µM, 2.5 µL de *cDNA* (10 ng/µL) e 5 µL do reagente Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD). As reações foram submetidas à incubação inicial no termociclador *Rotor-Gene Q* (Qiagen®) de 95°C por 10 min, seguidos por uma série de 60 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, resultando em uma curva de dissociação (*melting*) ao final de cada reação. Os *primers* tiveram o anelamento testado entre as temperaturas de 58°C e 64°C, com o intuito de otimizar a reação.

Para análise da quantificação relativa, foi obtido a partir das curvas padrão, um valor *threshold* para cada par de *primers* e uma equação de relação entre massa e fluorescência, fornecidas pelo *software* do termociclador (*Rotor-Gene Q Series Software* - Qiagen®). O

valor do *threshold* foi aplicado em cada experimento, para obtenção do valor de Ct (*cycle threshold*, ciclo no qual a fluorescência ultrapassa o valor do *threshold*). Para cada gene, o Ct foi aplicado na equação gerada pela curva padrão, originando um valor de massa. A expressão de cada gene de interesse foi normalizada pela média das massas dos genes endógenos *GAPDH* e *B2M*.

### 3.3 Silenciamento gênico de *HOTAIR*

Para reduzir os níveis de *HOTAIR* nas linhagens BT-474 e MDA-MB-468, foi utilizada a abordagem de silenciamento gênico por *RNA* de interferência (*siRNA*). Este mecanismo consiste em pequenos *RNAs* de dupla fita (*dsRNAs*) capazes de reconhecer uma sequência de específica de *RNA*, e como consequência levar a sua degradação ou repressão traducional. As linhagens celulares foram plaqueadas nas concentrações de  $6 \times 10^4$  em placas de 24 poços para BT-474 e  $2 \times 10^4$  em placas de 12 poços para MDA-MB-468 e mantidas sobre as condições descritas no item 3.1.

A concentração ideal do reagente de transfecção - Lipofectamine® 3000 *Transfection Reagent* (Invitrogen®), foi definida a fim de evitar efeitos de citotoxicidade celular. Para isto, foi realizado um controle (MOCK), onde as células foram submetidas ao processo de transfecção na ausência de *siRNA*. Desta forma, as células foram cultivadas com meio de transfecção (meio de cultura RPMI-1640 sem antibiótico, 4% de SFB e 1% de glutamina) e foram tratadas com diferentes doses (0,75; 1,0; 1,25 e 1,5  $\mu\text{g}$ ) do reagente de transfecção por 24h. A seguir, os citocentrifugados de cada condição foram obtidos como descrito no item 3.1 e ressuspendidos em 300 $\mu\text{L}$  de PBS 1X (SIGMA-ALDRICH®). A viabilidade celular foi avaliada através da contagem das células em Câmara de Neubauer e as 4 condições de MOCK foram comparadas com o controle de transfecção não tratado (células cultivadas apenas com o meio de transfecção).

Para determinar a melhor concentração de *siRNA* a ser utilizada a fim de obter uma eficiência de transfecção maior que 60%, as células foram submetidas às seguintes condições: (1) células cultivadas apenas com o meio de transfecção (controle não tratado); (2) células cultivadas com o meio de transfecção e suplementadas com reagente de transfecção (MOCK) e (3) células cultivadas com o meio de transfecção e suplementadas com reagente de transfecção e 50 nM do *siRNA* Silencer™ Cy™3 (Thermo Fisher®) por 24 h. O do *siRNA* Silencer™ Cy™3 (Thermo Fisher®) é um duplex de *RNA* conjugado a um fluoróforo, que emite luz de acordo com suas características fluorescentes (excitação máx.= 547 nm; emissão



máx.= 563 nm), utilizado para monitorar a eficiência de transfecção e que não afeta nenhum *RNA*, sendo assim a eficiência de transfecção e viabilidade celular foram analisadas através de citometria de fluxo. Para tais análises, os centrifugados celulares de cada condição foram obtidos como descrito no item 3.1, seguidos de duas lavagens com 1 mL de PBS 1X (SIGMA-ALDRICH®) e centrifugações a 1500 rpm por 10 min cada. O sobrenadante foi retirado e as células foram fixadas com 300 µL de paraformaldeído 4% diluídos em PBS 1X (SIGMA-ALDRICH®). Foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Biosciences®), e as avaliações de eficiência de transfecção e viabilidade celular foram realizadas através do software FlowJo v10.0.7.

Para o silenciamento transiente de *HOTAIR*, as linhagens BT-474 e MDA-MB-468 foram incubadas com meio de transfecção, em três condições: (1) apenas com meio de transfecção (CTRL) (2) dois duplexes de *siRNA* para *HOTAIR* (n272222 e n272225; Silencer® Select *siRNA*, Thermo Fisher®) e (3) *siRNA Scramble* (Silencer® Select Negative Control No. 1, Thermo Fisher®). Após 24 h, todas as células foram incubadas com o meio de cultura usual descrito no item 3.1.

### 3.3.1 Quantificação da taxa de silenciamento de *HOTAIR*

Para avaliar a redução dos transcritos de *HOTAIR* nas linhagens BT-474 e MDA-MB-468, o *RNA* total das condições CTRL, *Scramble* e *siRNA HOTAIR*, foram extraídos nos tempos de 24, 48 e 72h após o silenciamento. A extração dos *RNAs* foi feita utilizando o kit *RNeasy* (Qiagen), seguindo o protocolo descrito no item 3.2.1. Os *RNAs* foram quantificados, tratados com DNase e submetidos a transcrição reversa como descrito no item 3.2.2. Os *cDNAs* resultantes foram utilizados para avaliação da expressão gênica de *HOTAIR* por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR).

### 3.4 Análise do perfil de transcritos por microarranjo

Com o intuito de identificar possíveis genes relacionados com a expressão e atividade *HOTAIR*, foi realizada uma análise global do perfil de transcritos das linhagens BT-474 e MDA-MB-468 silenciadas para *HOTAIR* (*siHOTAIR*) comparada com controle não silenciado (*Scramble*). Essa técnica permite a identificação e quantificação dos transcritos gênicos por meio de complementariedade de bases entre a sequência dos genes e a das sondas presentes no chip de microarranjo.

Inicialmente, avaliamos a integridade e qualidade dos *RNAs* oriundos das linhagens celulares silenciadas e não-silenciadas, através do kit RNA Nano Chip (Agilent Technologies®) de acordo com o protocolo do fabricante. Para análise do chip foi utilizado o equipamento BioAnalyser® (Agilent Technologies®). A matriz do gel aplicada nos capilares do chip contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular, que se ligam às amostras de *RNA* resultando na emissão de fluorescência. A quantificação dessa fluorescência permite a separação dos *RNAs* ribossomais 18S e 28S, através dos quais é feita a verificação da integridade do *RNA* total. Atribui-se um número de integridade do *RNA* (RIN) que varia de 1 a 10. Foi considerado para este trabalho, *RNAs* com valor de RIN maiores ou iguais a 8.

Neste trabalho, utilizamos o *kit* de microarranjo Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Para realização do ensaio de microarranjo, foram utilizados 200 ng de *RNA* total de cada condição e um *RNA* de referência fornecido pelo *kit*. Os *RNAs* foram marcados com auxílio do *kit* Low Input quick Amp Labeling (Agilent Technologies), sendo o *RNA* de referência marcado com Cy3 e os *RNAs* das amostras marcados com Cy5. Estes *RNAs* foram reversamente transcritos em *cDNA*, seguido de transcrição e amplificação, para obtenção de um *cRNA*. Os *cRNAs* foram purificados em colunas RNeasy (Qiagen) e quantificados utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop Technologies®). Em seguida, os *cRNAs* foram hibridizados em lâmina HD Human GE 4x44 V2 (Agilent Technologies), por 17 h a 65°C em rotação de 60 rpm, no forno de hibridização SHO1 (Shel Lab). A lâmina de microarranjo foi então lavada com soluções fornecidas no *kit* e digitalizada no Sure Scan Microarray Scanner (Agilent Technologies). As listas brutas dos genes identificados e seus respectivos valores de expressão, foram obtidas pelo *software* Agilent Feature Extraction e os dados foram analisados no *software* GeneSpring GX 11.5 (Agilent Technologies).

Os genes diferencialmente expressos foram classificados como aumentados ou diminuídos obedecendo como critério um *fold-change*  $\pm 2$  com o auxílio do *software online* METACORE® (Clarivate Analytics, disponível em portal.genego.com).

### 3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism v6® (GraphPad Software Inc.). O teste utilizado foi *t* de *Student*. Foram considerados estatisticamente significativos experimentos cujo valor de *P* foi menor ou igual a 0,05 após a análise de, no

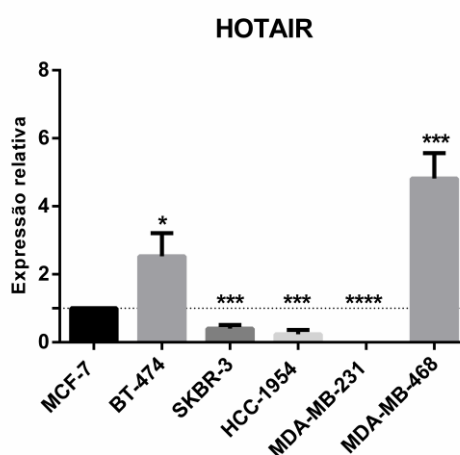
mínimo, três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Barras de erro nos gráficos são referentes ao desvio padrão.

## 4. RESULTADOS

Sendo o CM um tumor que apresenta características distintas entre seus subtipos moleculares relacionados a diagnóstico, prognóstico, resposta à terapia, expressão de receptores e agressividade, e que apresenta várias alterações moleculares a níveis genéticos e epigenéticos, como os *lncRNAs*, estudos que visem trazer informações sobre mecanismos de regulação gênica tanto relacionados com a progressão tumoral quanto a resposta a drogas tem se tornado fundamentais. Por esse motivo, escolhemos avaliar neste trabalho o papel do *lncRNA HOTAIR* na regulação da expressão gênica no CM.

### 4.1 *HOTAIR* está diferencialmente expresso entre os modelos *in vitro* de CM

Para avaliar os transcritos de *HOTAIR*, comparamos as linhagens HCC-1954, SKBR-3, BT-474, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 com a linhagem MCF-7, subtipo menos agressivo da doença. Como resultado, observamos que as linhagens BT-474 e MDA-MB-468, apesar de pertencerem a subtipos com agressividades diferentes, possuem maior expressão de *HOTAIR*, com um *fold change* de 3 e 5, respectivamente, quando comparadas com a linhagem MCF-7 (figura 4.1). Entretanto, as linhagens SKBR-3 e HCC-1954 possuem menor expressão de expressão de *HOTAIR* quando comparadas à MCF-7. Para a linhagem MDA-MB-231, não foi observada expressão de *HOTAIR*. Isto demonstra que dentre os modelos *in vitro* de CM existe um perfil diferente de expressão de *HOTAIR*.

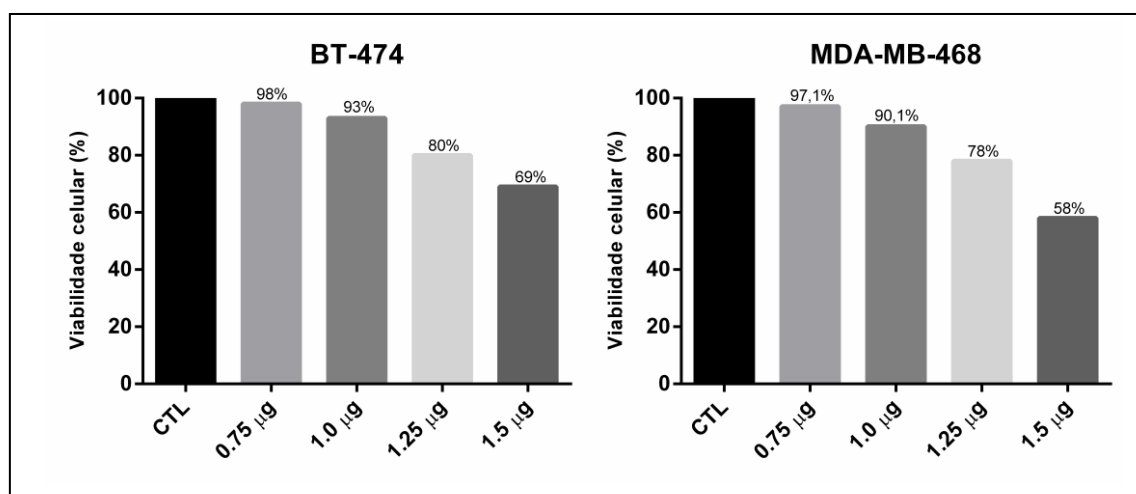


**Figura 4.1. Expressão de *HOTAIR* em linhagens celulares de CM.** Expressão gênica relativa do transcrito de *HOTAIR* por RT-qPCR, com resultados normalizados pela média dos genes endógenos *B2M* e *GAPDH*, em linhagens celulares representativas dos subtipos de CM: MCF-7 (LUMA), BT-474 (Lum-HER), SKBR-3 e HCC-1954 (HER), MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (TN). Os valores de expressão encontrado para cada linhagem foi comparado com expressão na linhagem menos agressiva MCF-7 (n=3). \*p<0,05. \*\*p<0,01. \*\*\*p<0,001. \*\*\*\* p<0,0001. Barras de erro indicativas de desvio padrão.

## 4.2 Silenciamento gênico de *HOTAIR*

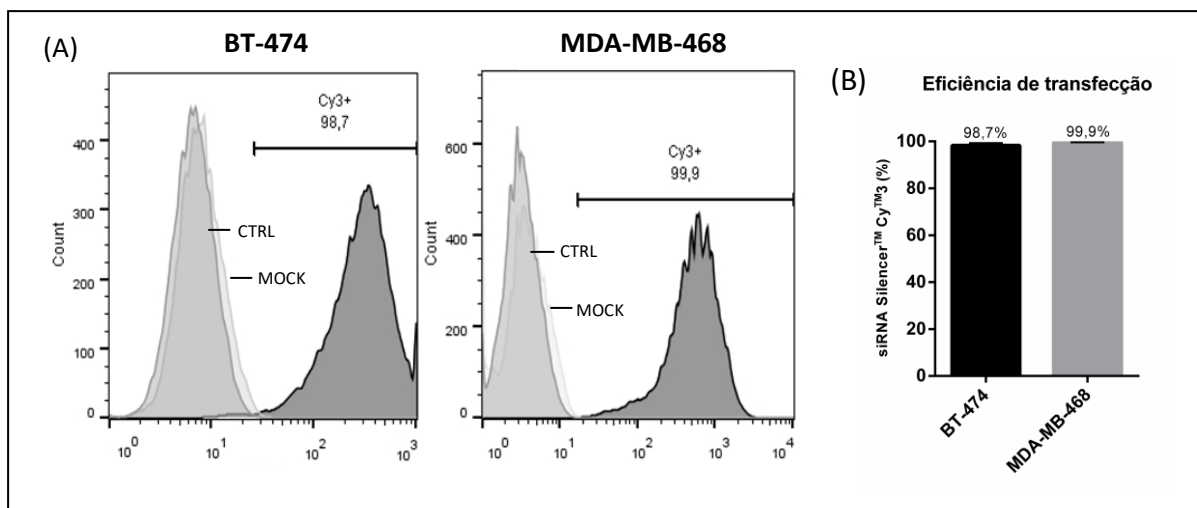
Com o intuito de avaliar as vias, sinalizações e processos celulares relacionados a *HOTAIR* e possíveis diferenças em seus mecanismos de regulação nos subtipos Luminal/HER e Triplo Negativo, realizamos o silenciamento transiente de *HOTAIR* nas linhagens BT-474 e MDA-MB-468, representantes destes subtipos.

Inicialmente, a fim de garantir que os efeitos observados após a transfecção com siRNA para *HOTAIR* eram decorrentes somente da ação do RNA de interferência, foram testadas diferentes concentrações do reagente de transfecção (Lipofectamina 3000). Para isso foi realizada uma curva com as seguintes doses do reagente: 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 µg. Após 24 horas de plaqueamento, a contagem celular das 4 doses testadas foram comparadas ao controle. Em ambas as linhagens, foi possível verificar uma redução de viabilidade celular nas doses 1,25 µg e 1,5 µg (figura 4.2). Optamos por utilizar a dose de 1,0 µg do reagente de transfecção, sendo a taxa de viabilidade celular superior ou igual à 90% nesta concentração.



**Figura 4.2. Padronização da concentração de Lipofectamina 3000 para realização do experimento de transfecção.** A viabilidade celular das células incubadas com lipofectamina nas concentrações de 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 µg das linhagens BT-474 e MDA-MB-468 (n=3) foi avaliada através da contagem de células em câmara de Neubauer e comparada com a viabilidade das células controle (CTRL).

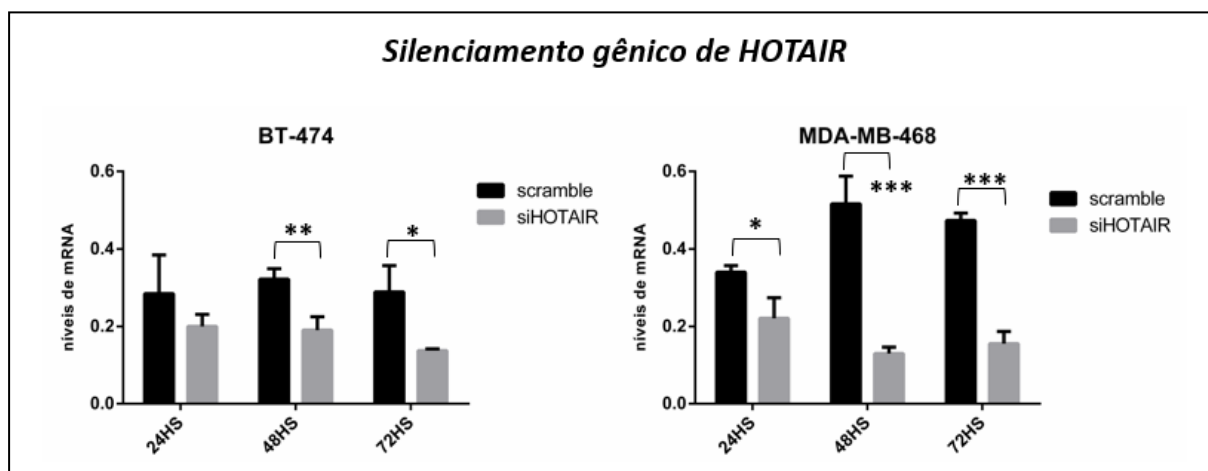
Após definir a dose de lipofectamina a ser utilizada, realizamos o teste de eficiência da transfecção com uma concentração de 50 nM do siRNA Silencer™ Cy™3 (Thermo Fisher®), com o objetivo de garantir que o siRNA esteja em uma concentração celular adequada capaz de exercer o efeito biológico desejado nas células. Após a incubação das células em cada uma das condições descritas acima, foi observada para a linhagem BT-474, uma taxa de eficiência de transfecção de 98,7%, enquanto que para a linhagem MDA-MB-468 foi de 99,9%, ambos comparados com o MOCK (figura 4.3).



**Figura 4.3. Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo da eficiência de transfecção das linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468.** (A) Valores da fluorescência emitida das células marcadas representados em porcentagem em ambos os histogramas. (B) Gráfico representativo da eficiência de transfecção em ambas as linhagens comparadas com o *mock*, utilizando 1,0  $\mu\text{g}$  de lipofectamina e 50 nM de siRNA Silencer™ Cy™3 (n=3).

Após a padronização das concentrações dos reagentes de transfecção e *siRNA*, as linhagens BT-474 e MDA-MB-468 foram submetidas ao silenciamento gênico transitente de *HOTAIR*. Avaliamos as taxas de silenciamento através do tratamento das células com 50 nM dos *siRNAs* nos tempos de 24, 48 e 72h.

Não foram observadas alterações significativas na expressão de *HOTAIR* entre controle e *scramble* após normalização com os genes endógenos *GAPDH* e *B2M*. Assim, comparamos as taxas de silenciamento entre as células *scramble* e as células tratadas com *siRNA HOTAIR*. Para a linhagem BT-474 decidimos por utilizar o tempo de 72h, pois o desvio padrão das replicatas experimentais das amostras silenciadas foi menor, com taxa de silenciamento de 53,5%. Já para a linhagem MDA-MB-468, optamos por utilizar o tempo de 48h, uma vez que novamente o experimento das células silenciadas teve menor desvio e obteve uma alta taxa de silenciamento (76,47%). Definido o tempo de silenciamento a ser utilizado para cada linhagem, prosseguimos com as análises de microarranjo.



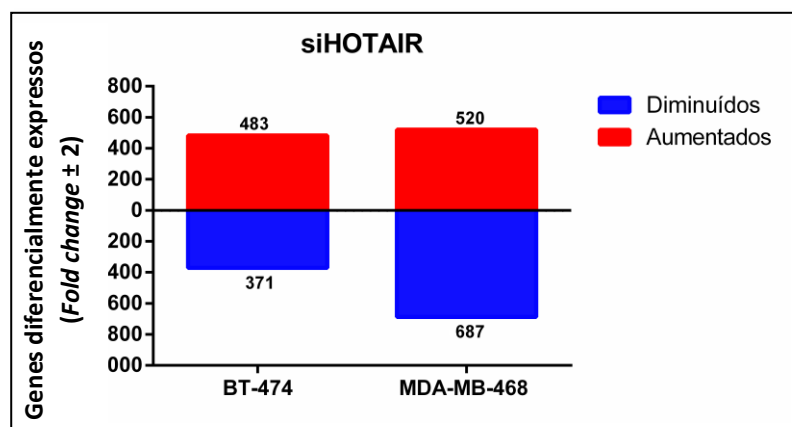
**Figura 4.4. Silenciamento de *HOTAIR* após transfecção com *siRNA*.** Taxas de silenciamento gênico dos transcritos de *HOTAIR*, avaliadas por RT-qPCR após transfecção com *siRNA* nas linhagens BT-474 e MDA-MB-468, nos tempos de 24h, 48h e 72h. Os valores obtidos foram normalizados pela média dos genes endógenos *B2M* e *GAPDH* e a taxa de silenciamento foi avaliada comparando a amostra *siHOTAIR* com seu respectivo *scramble*.

#### 4.3 Os potenciais alvos de *HOTAIR* são diferentes entre os modelos Lum/HER e TN

Inicialmente, as amostras de RNA total utilizadas no experimento de microarranjo foram avaliadas em relação à sua integridade. Todas obtiveram valor de RIN superior a 9, garantindo assim sua qualidade.

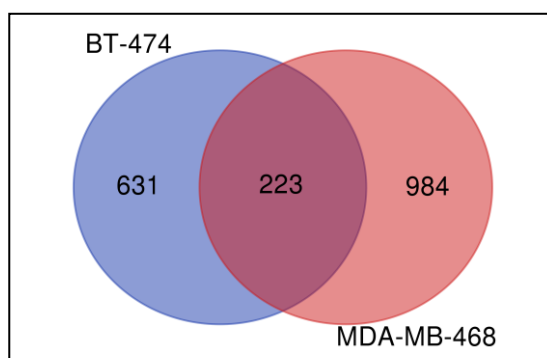
Seguimos então com o experimento de microarranjo, com o intuito de identificar os genes diferencialmente expressos (DE) na condição de silenciamento de *HOTAIR* (*siHOTAIR*) comparado com o *scramble*, nas duas linhagens estudadas e logo após, relacionar as diferenças encontradas nos perfis de expressão gênica de cada linhagem com as vias de sinalização e processos celulares potencialmente envolvidos com o papel de *HOTAIR* no CM.

Utilizamos o ponto de corte de 2 vezes (*fold change*  $\geq \pm 2$ ) para selecionar os genes DE na condição de *siHOTAIR* versus *scramble*. Sendo assim, encontramos para BT-474 um total de 854 genes DE após o silenciamento de *HOTAIR*, onde 483 genes estavam com expressão aumentada e 371 com expressão diminuída. Para a linhagem MDA-MB-468, 1207 genes apresentaram diferenças de expressão após o silenciamento, sendo 520 com expressão aumentada e 687 com expressão diminuída (figura 4.5). As listas com os genes diferencialmente expressos encontram-se nos Anexos A e B.



**Figura 4.5.** Genes diferencialmente expressos nas linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468 após silenciamento de *HOTAIR*. Foram identificados 854 genes diferencialmente expressos na linhagem BT-474, sendo 483 aumentados e 371 diminuídos. Para a linhagem MDA-MB-468, foram encontrados 1207 genes diferencialmente expressos, sendo 520 com expressão aumentada e 687 com expressão diminuída. *Fold change*  $\pm 2$ .

Após realizar a identificação dos genes DE expressos, construímos um Diagrama de Venn com todos os genes aumentados e diminuídos de ambos os modelos, para identificar quais alvos de *HOTAIR* são comuns entre eles. A partir desta análise, verificamos um total de 223 genes comuns, como demonstrado na figura 4.6.



**Figura 4.6.** Análise comparativa através do Diagrama de Venn das linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468 após silenciamento de *HOTAIR*. Genes aumentados e diminuídos em ambas as linhagens, após a comparação entre *siHOTAIR* e *scramble* (*Fold change* = 2). Análise feita utilizando a ferramenta *online* disponível em [bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/).

#### 4.4 *HOTAIR* tem influência na regulação epigenética e em vias de apoptose na linhagem BT-474

Para avaliar quais vias de sinalização e processos celulares estão inseridos na regulação da expressão gênica via *HOTAIR*, os genes identificados DE em cada linhagem silenciada, conduzimos uma análise *in silico* através do *software online* METACORE®. A análise de ontologia gênica (GO), mostrou que estes genes estão relacionados principalmente com ciclo



celular, apoptose, transdução de sinal, reprodução e resposta imune (tabela 4.1). Dentro destes processos, destacam-se dez vias enriquecidas de sinalização, nas quais estes genes estão inseridos. A partir desta análise, observamos que para a linhagem BT-474 as vias de regulação epigenética e apoptose apresentaram maior representatividade (tabela 4.2), mas também foram observadas vias de resistência à drogas, dano ao DNA, ação mitogênica (Estradiol) e estresse oxidativo.

**Tabela 4.1.** Ontologia gênica dos processos celulares identificados na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Ontologia gênica (GO) - BT-474</b> |                                                                |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1                                     | Transcrição, processamento de mRNA                             |
| 2                                     | Ciclo celular, mitose                                          |
| 3                                     | Apoptose, mitocôndria apoptótica                               |
| 4                                     | Enovelamento de proteínas, resposta a proteínas não enoveladas |
| 5                                     | Reprodução, diferenciação sexual masculina                     |
| 6                                     | Ciclo celular, meiose                                          |
| 7                                     | Ciclo celular, G2-M                                            |
| 8                                     | Apoptose, núcleo apoptótico                                    |
| 9                                     | Transdução de sinal, sinalização de colecistoquinina           |
| 10                                    | Resposta imune, apresentação de antígeno                       |

**Tabela 4.2.** Vias celulares enriquecidas identificadas na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Vias de sinalização – BT-474</b> |                                                                             |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1                                   | Mecanismo de resistência a droga em SCLC                                    |
| 2                                   | Apoptose e sobrevivência, regulação de apoptose por proteínas mitocondriais |
| 3                                   | Dano ao DNA, BRCA1 como um regulador transcricional                         |
| 4                                   | Transcrição epigenética, regulação da expressão gênica                      |
| 5                                   | Ciclo celular, condensação cromossômica na prometáfase                      |
| 6                                   | Apoptose e sobrevivência, cascata de caspase                                |
| 7                                   | Ação mitogênica do estradiol, Nuclear ESR1 em câncer de mama                |
| 8                                   | Apoptose e sobrevivência, fosforilação de BAD                               |
| 9                                   | Estresse oxidativo, ativação de NADPH oxidase                               |
| 10                                  | Apoptose e sobrevivência, cascatas de sinalização de FAS                    |

Uma vez que o METACORE® é um *software online* que permite a avaliação de vias, nos questionamos quais vias estavam relacionadas aos processos que nós encontramos. Em relação à regulação epigenética, em BT-474, observamos tanto o aumento quanto a diminuição de genes relacionados a modificação de histonas/remodelamento de cromatina, incluindo membros ou genes associados aos complexos *Polycomb* e *Trithorax*. O mesmo foi

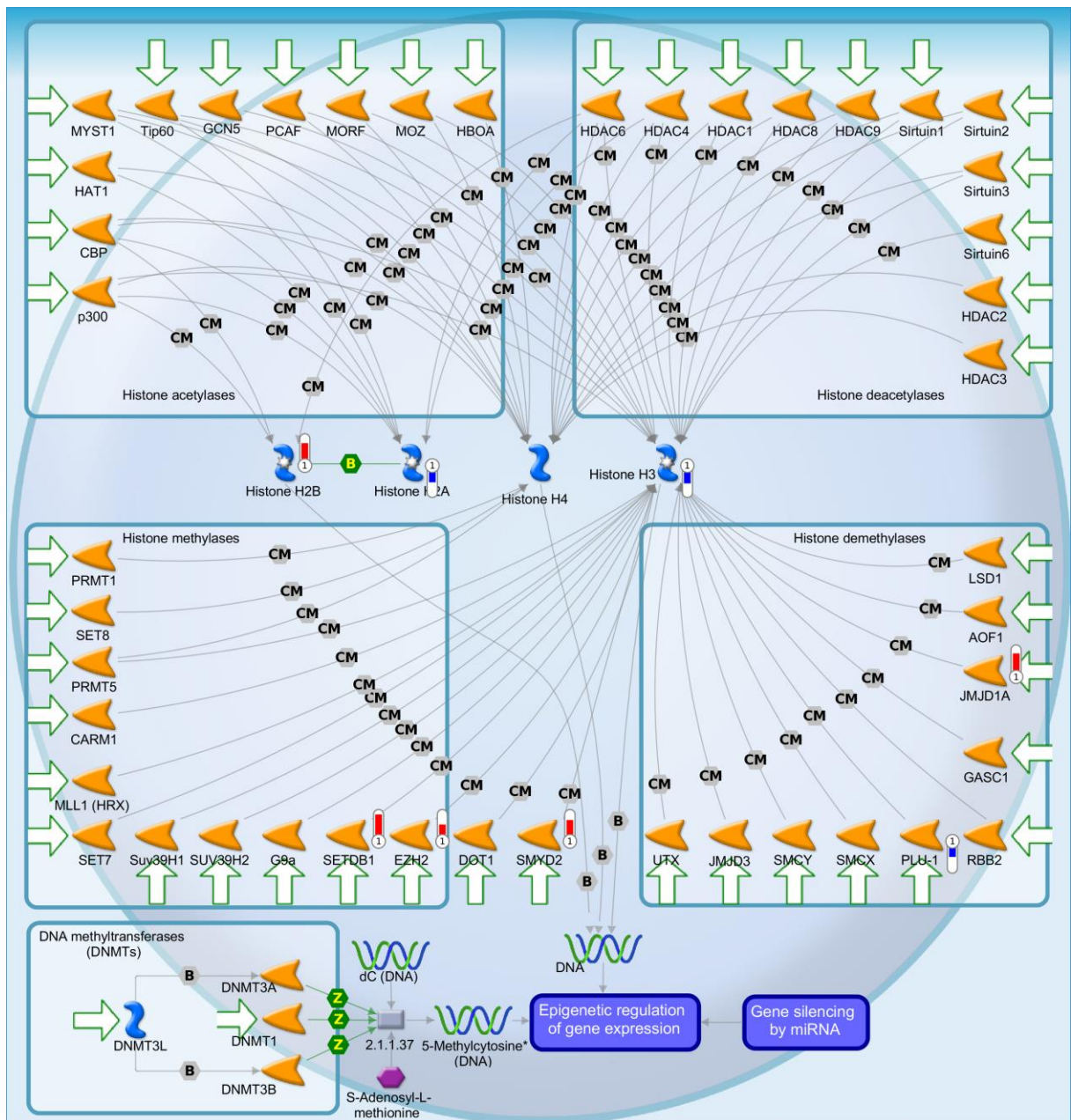
observado para *RNAs* não-codificantes. Isto indica que existe um *cross-talk* entre os diferentes mecanismos epigenéticos, e que *HOTAIR* pode ter influência sobre a expressão desses genes. Na tabela 4.3, estão discriminados os genes encontrados DE envolvidos com na regulação epigenética, agrupados de acordo com o grupo à qual pertencem.

**Tabela 4.3.** Genes diferencialmente expressos da regulação epigenética identificados na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| Símbolo                      | Nome                                                               | Fold change |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RNAs não-codificantes</b> |                                                                    |             |
| lnc-AKIRIN1-1                | lnc-AKIRIN1-1:2                                                    | 84,146576   |
| MORC2-AS1                    | MORC2 antisense RNA 1                                              | 17,061926   |
| DLEU2L                       | deleted in lymphocytic leukemia 2-like                             | 4,8317275   |
| LINC01000                    | long intergenic non-protein coding RNA 1000                        | 4,3929644   |
| lnc-SHCBP1L-1                | lnc-SHCBP1L-1:1                                                    | 3,807783    |
| EPB41L4A-AS1                 | EPB41L4A antisense RNA 1                                           | 3,4982374   |
| SNHG9                        | small nucleolar RNA host gene 9 (non-protein coding)               | 3,347168    |
| FOXN3-AS1                    | FOXN3 antisense RNA 1                                              | 3,0797591   |
| LINC00493                    | long intergenic non-protein coding RNA 493                         | 3,041896    |
| lnc-MRPL14-1                 | lnc-MRPL14-1:1                                                     | 2,5178168   |
| LINC01137                    | long intergenic non-protein coding RNA 1137                        | 2,4403005   |
| SNHG15                       | small nucleolar RNA host gene 15 (non-protein coding)              | 2,2488694   |
| LINC00923                    | long intergenic non-protein coding RNA 923                         | -2,2386606  |
| lnc-THNSL1-2                 | lnc-THNSL1-2:1                                                     | -2,3165953  |
| SOX21-AS1                    | SOX21 antisense RNA 1 (head to head)                               | -2,7725003  |
| XLOC_I2_010916               | BROAD Institute lincRNA (XLOC_I2_010916)                           | -2,790607   |
| ZFAS1                        | ZNF1 antisense RNA 1                                               | -2,8324797  |
| TTY15                        | testis-specific transcript, Y-linked 15 (non-protein coding)       | -3,2672439  |
| lnc-USP35-1                  | lnc-USP35-1:6                                                      | -3,406244   |
| LINC00999                    | long intergenic non-protein coding RNA 999                         | -5,2218347  |
| FAM225A                      | family with sequence similarity 225, member A (non-protein coding) | -6,421997   |
| LINC00842                    | long intergenic non-protein coding RNA 842                         | -7,2369986  |
| <b>HISTONAS</b>              |                                                                    |             |
| H1FX                         | H1 histone family, member X                                        | 7,315855    |
| SETDB1                       | SET domain, bifurcated 1                                           | 4,8466086   |
| DDAH1                        | dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1                          | 4,794861    |
| KDM3A                        | lysine (K)-specific demethylase 3A                                 | 4,087443    |
| HIST1H2BE                    | histone cluster 1, H2be                                            | 3,8715017   |
| CMTR2                        | cap methyltransferase 2                                            | 3,48667     |
| KDM5B                        | lysine (K)-specific demethylase 5B                                 | -2,131058   |
| HIST1H2BM                    | histone cluster 1, H2bm                                            | -2,1833522  |
| HIST1H3G                     | histone cluster 1, H3g                                             | -2,335098   |
| HIST1H2BD                    | histone cluster 1, H2bd                                            | -2,392691   |
| HIST1H2AH                    | histone cluster 1, H2ah                                            | -2,4817002  |
| HIST1H3B                     | histone cluster 1, H3b                                             | -2,6193638  |
| <b>Complexo Trithorax</b>    |                                                                    |             |

| <b>Símbolo</b>                                             | <b>Nome</b>                                                                                       | <b>Fold change</b> |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| KMT2B                                                      | lysine (K)-specific methyltransferase 2B                                                          | 14,202547          |
| SMARCC2                                                    | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2 | -3,8706853         |
| <b>Complexo Polycomb</b>                                   |                                                                                                   |                    |
| EZH2                                                       | enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit                                         | 2,5498197          |
| CBX2                                                       | chromobox homolog 2                                                                               | 2,4577749          |
| PHF1                                                       | PHD finger protein 1                                                                              | -4,98603           |
| <b>Genes associados aos Complexos Trithorax e Polycomb</b> |                                                                                                   |                    |
| ZMIZ1                                                      | zinc finger, MIZ-type containing 1                                                                | -2,302476          |

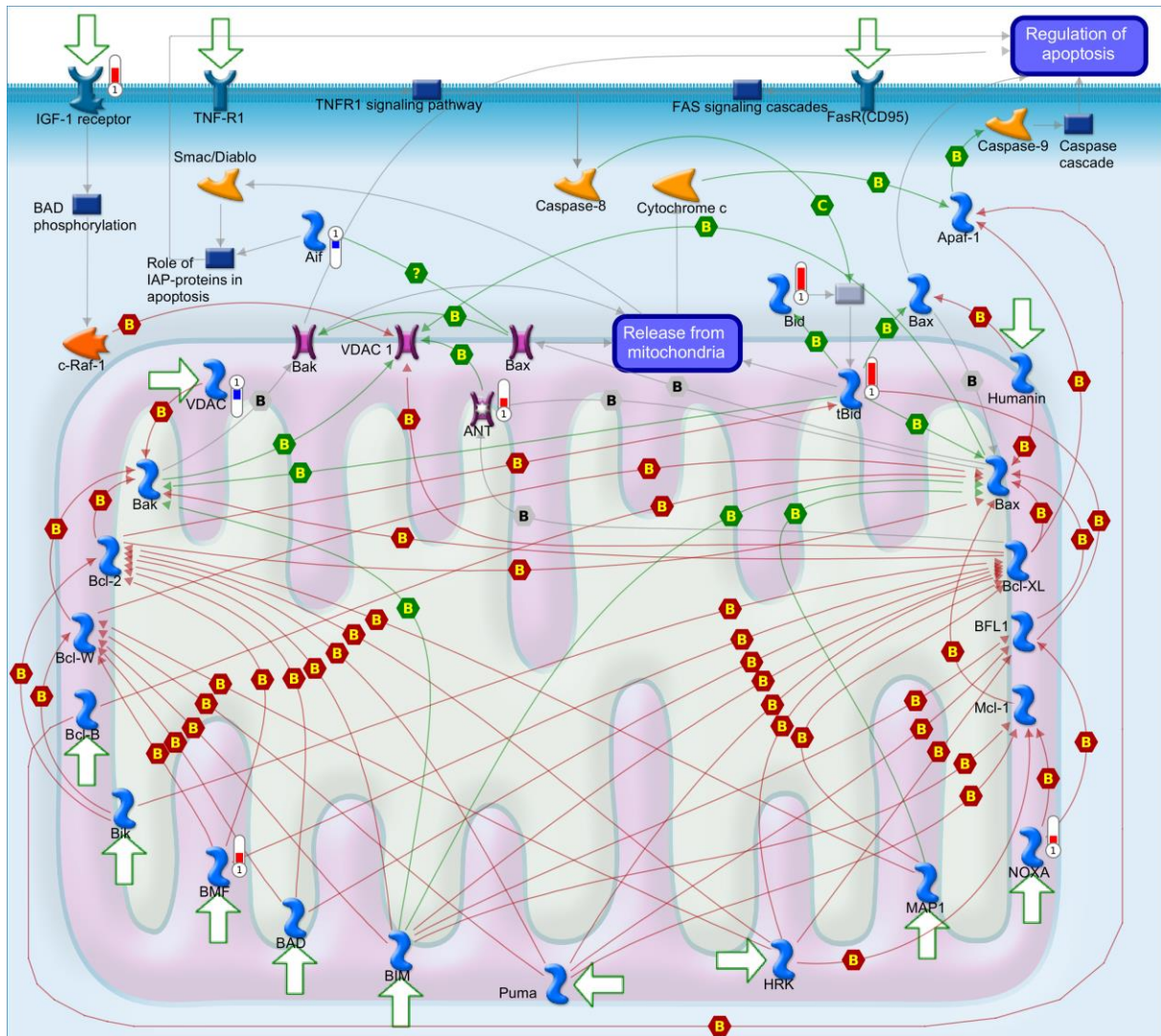
Visto que encontramos processos relacionados a tumorigênese, nos questionamos sobre as vias celulares que estão relacionadas com os nossos dados de genes DE encontrados. Utilizando o METACORE®, foram gerados mapas das vias canônicas, nas quais estes genes estão inseridos. No mapa da figura 4.7, foi possível observar que alguns dos genes DE, relacionados à regulação epigenética, pertencem ao grupo de enzimas modificadoras de histonas (metilases e demetilases), como *JMJD1A* e *PLU-1* (lisina demetilases) e *EZH2* e *SETDB1* (lisina metiltransferases). Outros genes como *SMYD2* e as histonas H2B, H2A e H3, também apareceram no mapa, mesmo não estando dentro desses grupos. *SMYD2* é uma metiltransferase que metila tanto proteínas histonas quanto não-histonas. Nota-se que o número de genes aumentados e diminuídos é semelhante e que estes genes estão distribuídos entre grupos diferentes, demonstrando que *HOTAIR* pode regular genes envolvidos tanto na ativação quanto no silenciamento epigenético da transcrição.



**Figura 4.7. Regulação epigenética da expressão gênica em BT-474.** Mapa da regulação epigenética contendo genes diferencialmente expressos na linhagem BT-474 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

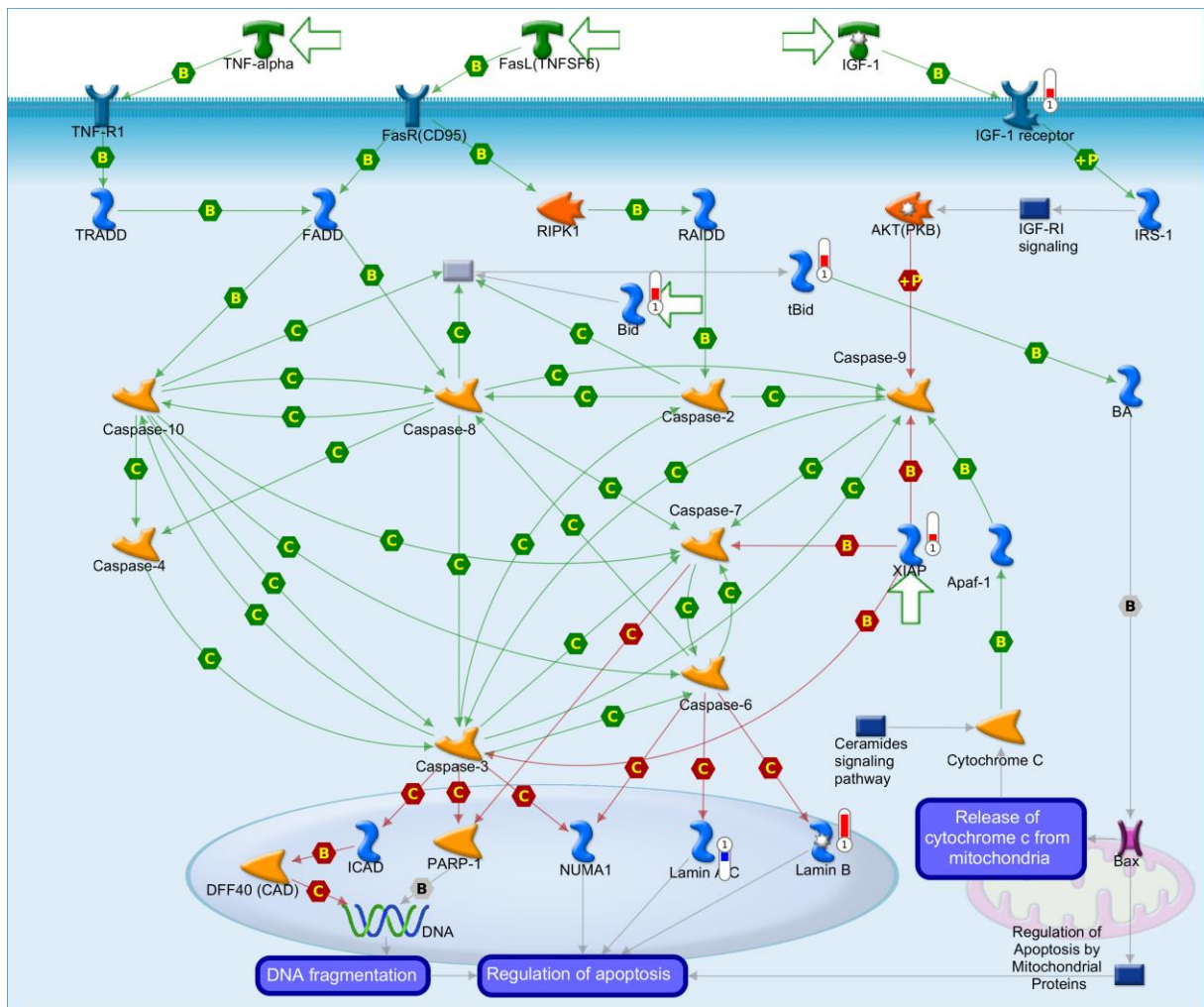
Sobre o processo de morte celular via apoptose, em BT-474, observamos alterações em genes da via de sinalização de apoptose mitocondrial, bem como da cascata de sinalização das caspases e FAS. No mapa da figura 4.8, estão representados os genes envolvidos na regulação da apoptose através de proteínas mitocondriais (via intrínseca). Os reguladores *Aif* e *VDAC*, apareceram diminuídos. No entanto, a maioria dos genes presentes no mapa estão com sua expressão aumentada, e estão relacionados à ativação da via (*Bid*, *tBid*, *BMF*, *IGF1R* e

*NOXA*) e ao transporte de solutos (*ANT*), indicando que a ausência de *HOTAIR* pode de alguma forma estar relacionada a ativação dessa via.



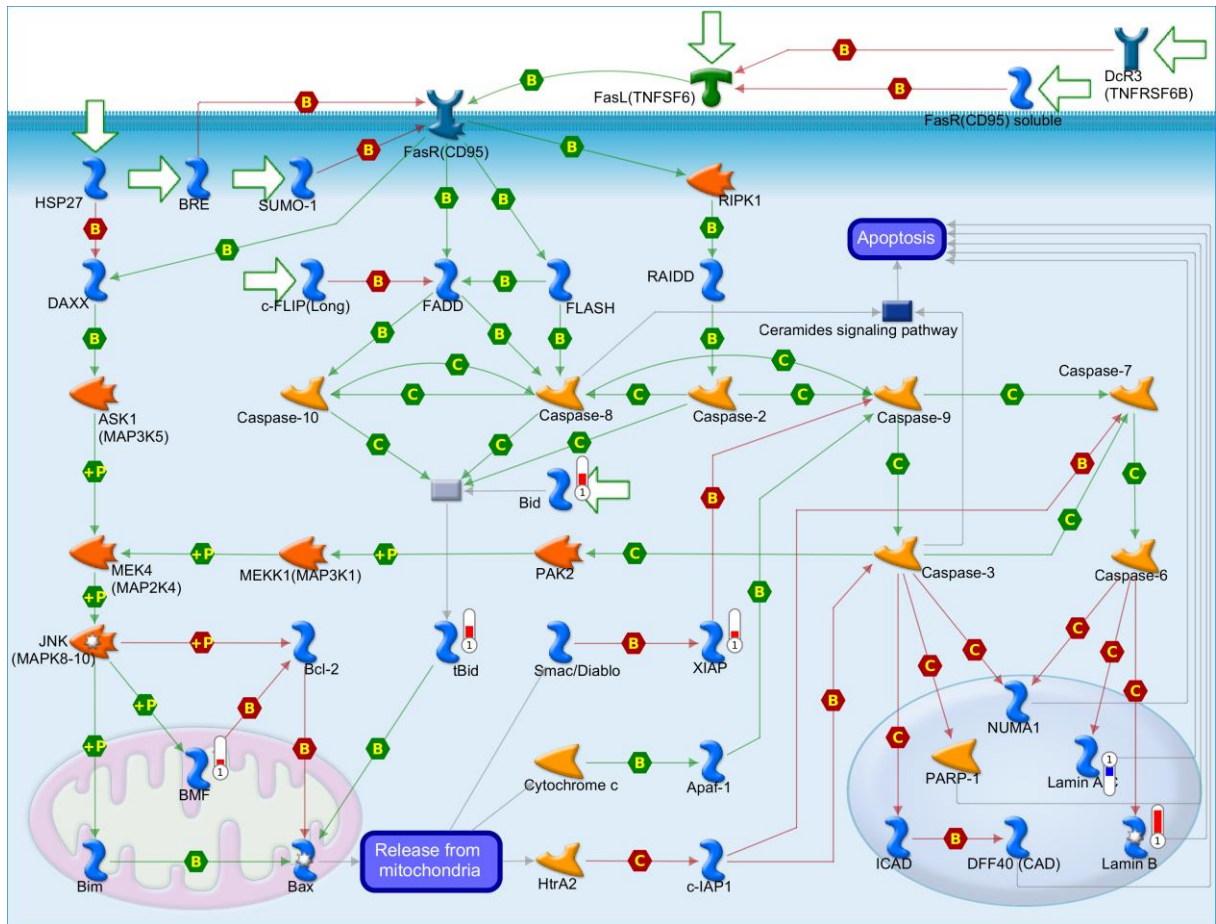
**Figura 4.8. Regulação da apoptose através de proteínas mitocondriais em BT-474.** Mapa de regulação de apoptose através da mitocôndria contendo genes diferencialmente expressos na linhagem BT-474 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

No mapa da cascata de sinalização das caspases (figura 4.9), observamos o aumento da expressão de genes reguladores, como os genes *BID*, *tBID* e o receptor *IGF-1*, relacionados à ativação e *XIAP*, um inibidor da via. Os genes *Lamin A/C* (diminuído) e *B* (aumentado), codificam proteínas que compõem a lâmina nuclear e são alvos de caspases. Estes achados indicam que a ausência de *HOTAIR* pode estar relacionada a regulação da apoptose através da sinalização nuclear, pela via das caspases.



**Figura 4.9.** Cascata de sinalização de caspases em BT-474. Mapa da regulação de apoptose através de caspases, contendo genes diferencialmente expressos na linhagem BT-474 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

Para a sinalização de FAS (figura 4.10), via extrínseca de apoptose, os genes reguladores, *BID*, *tBID*, *XIAP*, *BMF*, *IGF-1* e *Lamin B*, apresentaram expressão aumentada, já o gene *Lamin A/C* apareceu diminuído. A sinalização de FAS também envolve ativação de caspases, e pode ou não contar com a participação da mitocôndria, por isso a presença de genes comuns à cascata de sinalização de caspases. Isto demonstra que *HOTAIR*, pode influenciar diferentes vias de sinalização de apoptose.



**Figura 4.10. Regulação da apoptose através da cascata de sinalização de FAS em BT-474.** Mapa de regulação da apoptose através da sinalização de FAS, contendo genes diferencialmente expressos na linhagem BT-474 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

Na tabela 4.4, estão sumarizados todos os genes DE identificados na linhagem BT-474, após o silenciamento gênico de *HOTAIR*, associados a via de apoptose. Nota-se que a maioria dos genes relacionados a apoptose estão com expressão aumentada, muitos deles relacionados à ativação da via. Genes que codificam proteínas carreadoras também apresentaram aumento de expressão, bem como outros reguladores já citados na sinalização de caspases e FAS. As alterações observadas nas vias de apoptose, indicam um potencial envolvimento de *HOTAIR* na modulação de morte e sobrevivência celular no modelo Lum/HER (BT-474).

**Tabela 4.4.** Genes diferencialmente expressos de vias de apoptose identificados na linhagem BT-474 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Símbolo</b> | <b>Nome</b>                                                                                 | <b>Fold change</b> |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| HSPA1B         | heat shock 70kDa protein 1B                                                                 | 16,982237          |
| LMNB2          | lamin B2                                                                                    | 12,37636           |
| BECN1          | beclin 1, autophagy related                                                                 | 7,7642817          |
| PPP3CA         | protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme                                     | 6,755158           |
| +BID           | BH3 interacting domain death agonist                                                        | 6,3565307          |
| IGF1R          | insulin-like growth factor 1 receptor                                                       | 4,461624           |
| CIAPIN1        | cytokine induced apoptosis inhibitor 1                                                      | 4,3498726          |
| TRIAP1         | TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1                                                     | 4,3327             |
| MAP2K2         | mitogen-activated protein kinase kinase 2                                                   | 3,3257732          |
| XIAP           | X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase                                | 3,0394008          |
| BMF            | Bcl2 modifying factor                                                                       | 2,7015927          |
| SLC25A6        | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6 | 2,396147           |
| PPM1G          | protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1G                       | 2,0903375          |
| PMAIP1         | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1                                           | 2,001169           |
| AIFM1          | apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1                                      | -2,1129854         |
| APITD1         | apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1                                                      | -2,3169975         |
| LMNA           | lamin A/C                                                                                   | -4,571909          |

#### 4.5 *HOTAIR* tem influência na regulação epigenética da transcrição gênica e via de NF- $\kappa$ B na linhagem MDA-MB-468

Assim como para a linhagem BT-474, conduzimos uma análise *in silico* através do *software online* METACORE®, para avaliar quais vias de sinalização e processos celulares estão inseridos, os genes encontrados DE para a linhagem MDA-MB-468. A análise de ontologia gênica (GO), revelou que os genes DE após o silenciamento de *HOTAIR* estão relacionados com ciclo celular, transcrição, transdução de sinal, dano ao DNA, enovelamento de proteínas e transporte do manganês (tabela 4.5). A partir da análise de enriquecimento das vias de sinalização, observamos que, para esta linhagem, as vias de regulação genética e epigenética (tabela 4.6) foram mais representativas, mas também observamos outras vias, tais como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e regulação nuclear de citoesqueleto.



**Tabela 4.5.** Ontologia gênica dos processos celulares identificados na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Ontologia gênica (GO) – MDA-MB-468</b> |                                                                   |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1                                         | Transcrição, modificação de cromatina                             |
| 2                                         | Ciclo celular, G2-M                                               |
| 3                                         | Ciclo celular, mitose                                             |
| 4                                         | Ciclo celular, G1-S                                               |
| 5                                         | Ciclo celular, fase S                                             |
| 6                                         | Transcrição, regulação transcricional de receptores nucleares     |
| 7                                         | Transdução de sinal, sinalização nuclear do receptor de andrógeno |
| 8                                         | Dano ao DNA, ponto de checagem                                    |
| 9                                         | Enovelamento de proteínas, resposta a proteínas não enoveladas    |
| 10                                        | Transporte, transporte de manganês                                |

**Tabela 4.6.** Vias celulares enriquecidas identificadas na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Vias de sinalização – MDA-MB-468</b> |                                                                                                                                |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                       | Transcrição, Complexo N-CoR/SMRT mediando o silenciamento gênico epigenético                                                   |
| 2                                       | Desenvolvimento, sinalização de VEGFR via VEGFR2 (cascata genérica)                                                            |
| 3                                       | Enovelamento e maturação de proteínas, maturação do sistema de angiotensina                                                    |
| 4                                       | Transcrição, regulação da transcrição (SinR e NuRD)                                                                            |
| 5                                       | Transcrição, regulação epigenética da transcrição gênica                                                                       |
| 6                                       | Resposta imune, via de sinalização HSP60 e HSP70/ TLR                                                                          |
| 7                                       | Sinalização de TLR na sensibilização da pele                                                                                   |
| 8                                       | Transcrição, ação não genômica do ácido retinóico e fosforilação dos receptores do ácido retinóico na iniciação da transcrição |
| 9                                       | Resposta imune, via de sinalização de HMGB1/TLR                                                                                |
| 10                                      | Remodelamento de citoesqueleto, regulação nuclear do citoesqueleto de actina e polimerização de Rho GTPases                    |

Em MDA-MB-468, foram observados tanto o aumento quanto a diminuição de genes envolvidos na modificação de histonas/remodelamento de cromatina. Assim como identificado para BT-474, observamos alteração nos genes relacionados aos complexos *Polycomb* e *Trithorax*, bem como em genes associados a histonas. Alguns desses genes são comuns às duas linhagens, no entanto, outros genes DE apareceram na lista da MDA-MB-468.

Por exemplo, dos genes comuns, temos *SMARCC2* e *KMT2B* pertencentes ao complexo *Trithorax*. O que chama atenção neste caso, é que *SMARCC2* está diminuído em BT-474, mas aparece aumentado em MDA-MB-468. O inverso é válido para *KMT2B*, que está aumentado

em BT-474 mas diminuído em MDA-MB-468, demonstrando que *HOTAIR* pode regular o mesmo gene de maneira diferente entre os dois modelos. Os genes relacionados a histonas, *H1FX* e *HIST3B*, também aparecem nas duas listas. Para BT-474, *H1FX* está aumentado e *HIST3B* diminuído, já em MDA-MB-468, estão diminuído e aumentado, respectivamente.

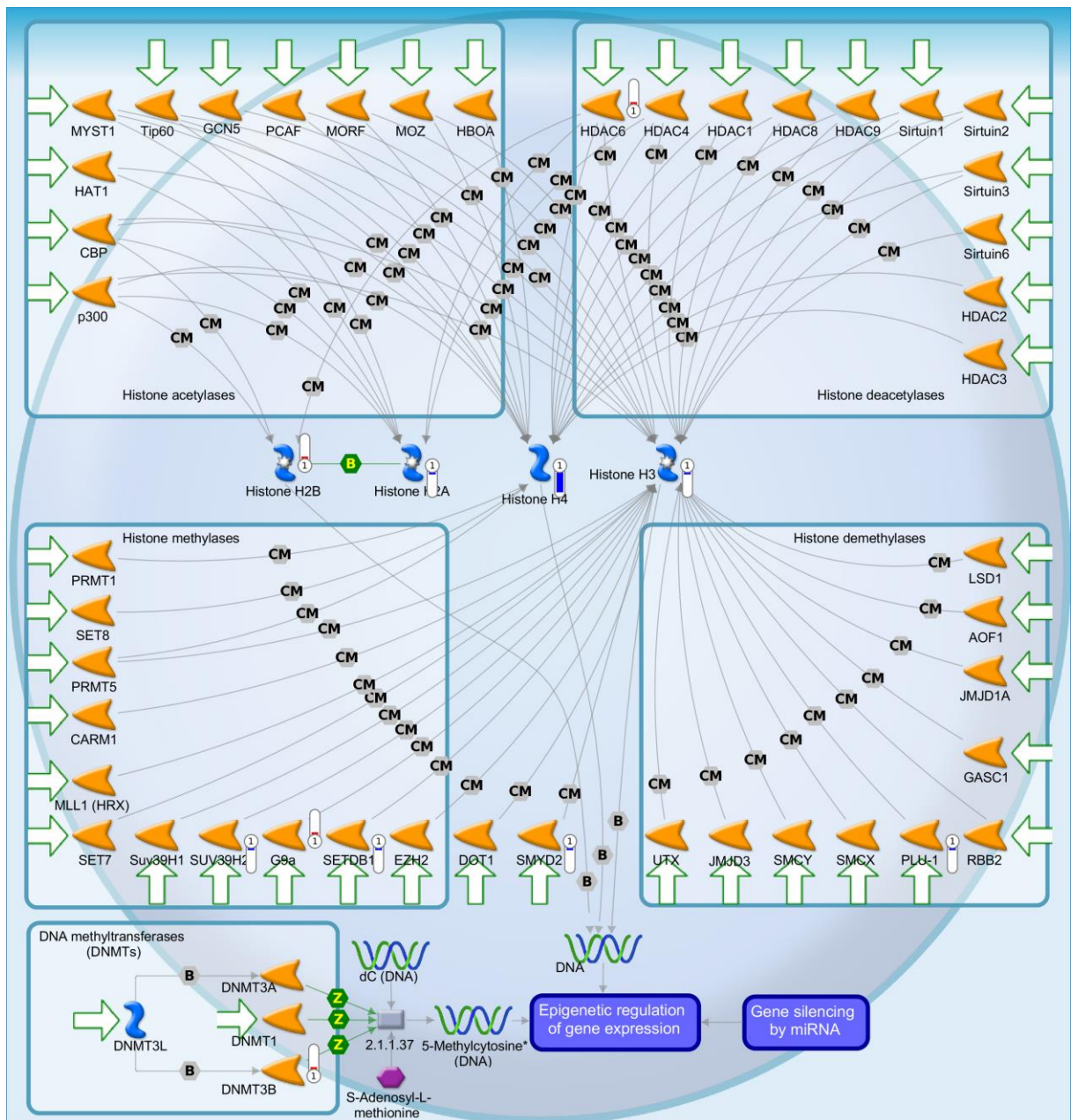
Observamos também alterações na expressão de RNAs não-codificantes. Nenhum deles é comum entre as linhagens. Estes resultados indicam que, neste modelo, *HOTAIR* também poder regular membros da regulação epigenética e que existe uma conversa entre os diferentes mecanismos epigenéticos. Além do mais, essa regulação ocorre de maneira diferente entre os subtipos Lum/HER (BT-474) e TN (MDA-MB-468), ainda que os mesmos genes estejam envolvidos. Os genes envolvidos na regulação epigenética após silenciamento de *HOTAIR* em MDA-MB-468 estão descritos na tabela 4.7, de acordo com seu respectivo grupo.

**Tabela 4.7.** Genes diferencialmente expressos da regulação epigenética identificados na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Símbolo</b>               | <b>Nome</b>                                            | <b>Fold change</b> |
|------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>RNAs não-codificantes</b> |                                                        |                    |
| lnc-DTYMK-3                  | lnc-DTYMK-3:1                                          | 6,1174617          |
| ZNF436-AS1                   | ZNF436 antisense RNA 1                                 | 3,114444           |
| LINC00487                    | long intergenic non-protein coding RNA 487             | 2,9055872          |
| LINC00265                    | long intergenic non-protein coding RNA 265             | 2,4586377          |
| TPT1-AS1                     | TPT1 antisense RNA 1                                   | 2,103861           |
| LINC01420                    | long intergenic non-protein coding RNA 1420            | 2,0062592          |
| LINC00261                    | long intergenic non-protein coding RNA 261             | -2,140283          |
| FAM74A4                      | family with sequence similarity 74, member A4          | -2,2743652         |
| LINC00665                    | long intergenic non-protein coding RNA 665             | -2,3505306         |
| UCA1                         | urothelial cancer associated 1 (non-protein coding)    | -2,3608088         |
| GLDR                         | glioblastoma down-regulated RNA                        | -3,223967          |
| TEX41                        | testis expressed 41 (non-protein coding)               | -3,5508351         |
| DLEU1                        | deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding) | -7,830416          |
| GLIS3-AS1                    | GLIS3 antisense RNA 1                                  | -141,4033          |
| <b>HISTONAS</b>              |                                                        |                    |
| CBX1                         | chromobox homolog 1                                    | 7,4878697          |
| HIST2H3D                     | histone cluster 2, H3d                                 | 5,3813567          |
| HIST1H3B                     | histone cluster 1, H3b                                 | 3,182491           |
| HIST1H1D                     | histone cluster 1, H1d                                 | 2,5868266          |
| HDAC5                        | histone deacetylase 5                                  | 2,4345694          |
| HIST1H3A                     | histone cluster 1, H3a                                 | 2,150644           |
| HIST1H3D                     | histone cluster 1, H3d                                 | 2,1471097          |
| EHMT2                        | euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2       | 2,1375353          |
| HIST1H2BC                    | histone cluster 1, H2bc                                | 2,0869095          |
| HIST1H2BH                    | histone cluster 1, H2bh                                | 2,048477           |
| H2AFV                        | H2A histone family, member V                           | -2,0053298         |

| <b>Símbolo</b>            | <b>Nome</b>                                                                                       | <b>Fold change</b> |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| SUV39H2                   | suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)                                              | -2,1928031         |
| <b>Símbolo</b>            | <b>Nome</b>                                                                                       | <b>Fold change</b> |
| HIST1H2AB                 | histone cluster 1, H2ab                                                                           | -2,211449          |
| HIST1H4H                  | histone cluster 1, H4h                                                                            | -2,9009132         |
| SETDB1                    | SET domain, bifurcated 1                                                                          | -3,033262          |
| CBX5                      | chromobox homolog 5                                                                               | -3,6344721         |
| H1FX                      | H1 histone family, member X                                                                       | -3,9598112         |
| HIST1H3H                  | histone cluster 1, H3h                                                                            | -7,2911725         |
| KDM5B                     | lysine (K)-specific demethylase 5B                                                                | -7,9956384         |
| HIST1H4A                  | histone cluster 1, H4a                                                                            | -408,42795         |
| <b>Complexo Trithorax</b> |                                                                                                   |                    |
| SMARCC2                   | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2 | 7,786864           |
| SMARCC1                   | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1 | 2,0716925          |
| KMT2B                     | lysine (K)-specific methyltransferase 2B                                                          | -6,95365           |
| <b>Complexo Polycomb</b>  |                                                                                                   |                    |
| PHF19                     | PHD finger protein 19                                                                             | 214,90749          |
| CBX2                      | chromobox homolog 2                                                                               | -2,2160058         |
| CBX7                      | chromobox homolog 7                                                                               | -2,6730099         |

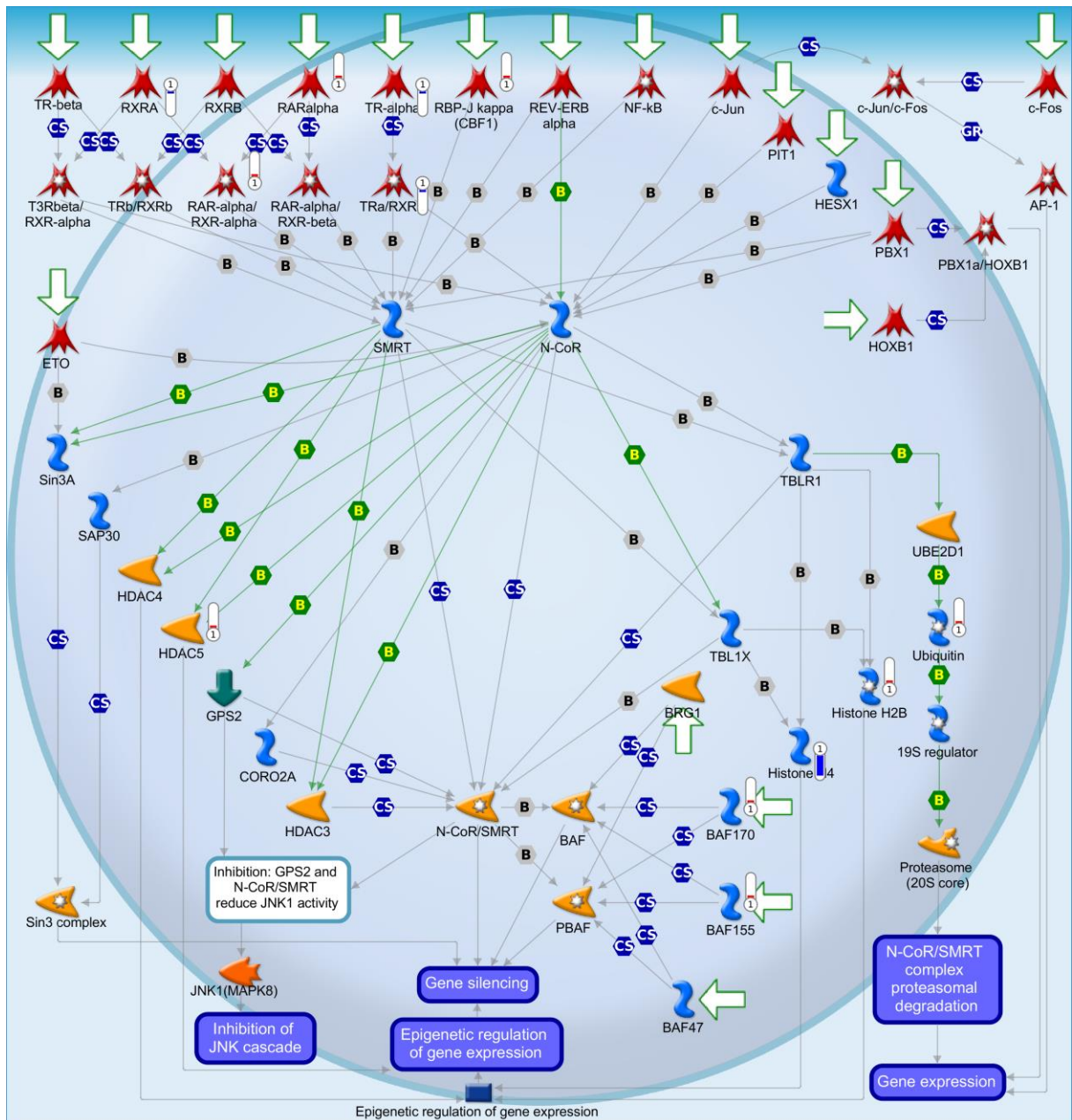
Utilizando novamente o *software* METACORE®, foram gerados mapas das vias celulares canônicas, a fim de identificar em quais delas estão inseridos os genes encontrados DE na linhagem MDA-MB-468, após o silenciamento de *HOTAIR*. No mapa da figura 4.11, observamos que alguns dos genes DE, relacionados à regulação epigenética, fazem parte do grupo de enzimas modificadoras de histonas (metilases, demetilases e desacetilases), como *PLU-1* (lisina demetilase), *G9a*, *SUV39H2* e *SETDB1* (lisina metiltransferases) e *HDAC6* (desacetilase). Outros genes envolvidos nessa regulação, como *SMYD2* e as histonas H2B, H2A, H3 e H4, também aparecem no mapa. O gene *DNMT3B* (DNA metiltransferase), que participa da metilação do DNA, outro mecanismo epigenético, aparece aumentado. Nota-se que o número de genes aumentados e diminuídos é semelhante, assim como foi visto para BT-474, indicando que *HOTAIR* pode regular genes envolvidos tanto na ativação quanto no silenciamento epigenético da transcrição.



**Figura 4.11. Regulação epigenética da expressão gênica em MDA-MB-468.** Mapa da regulação epigenética contendo genes diferencialmente expressos na linhagem MDA-MB-468 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

Alguns genes envolvidos com silenciamento gênico mediado por N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*) – SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), também apresentaram alteração de expressão diante do silenciamento de *HOTAIR*. Os fatores de transcrição *RAR-alpha*, *CBF1* e *RXR-alpha*, apresentaram aumento de expressão, ao contrário dos também fatores de transcrição *TR-alpha*, *RXRA* e *RXR* que estavam diminuídos (figura 4.12). Alguns reguladores, tais como *BAF 155* e *170*, Ubiquitina e histona H2B apareceram aumentados, já a histona H4 aparece diminuída. A histona desacetilase, *HDAC5*,

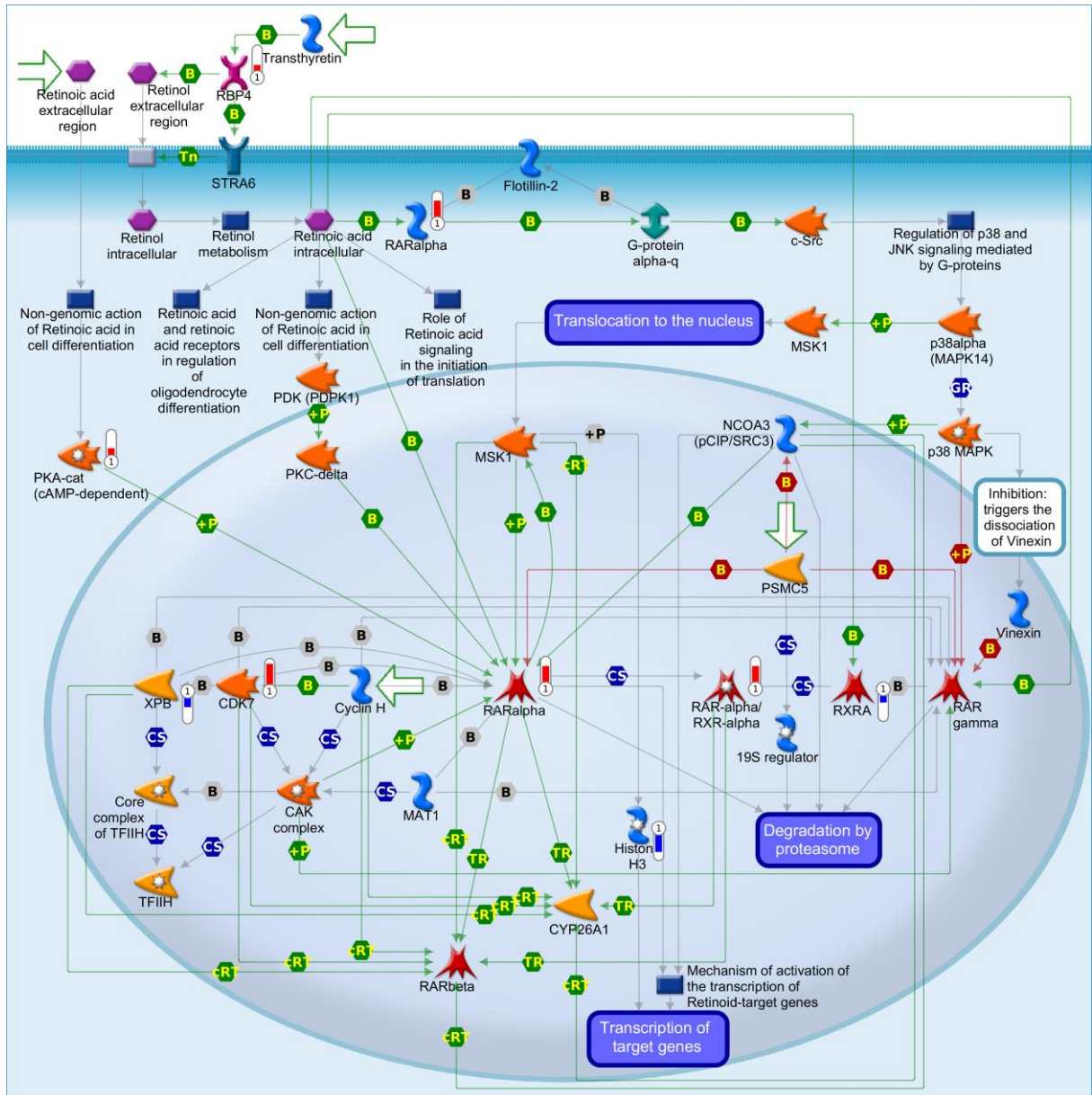
também apresentou aumento de expressão. Isto indica um possível papel de *HOTAIR* no silenciamento gênico mediado por N-CoR-SMRT.



**Figura 4.12. Regulação epigenética de silenciamento gênico mediada por N-CoR-SMRT em MDA-MB-468.** Mapa da regulação epigenética mediada por N-CoR-SMRT contendo genes diferencialmente expressos na linhagem MDA-MB-468 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

Observamos também alterações na expressão de genes associados ao controle genético da transcrição, como na figura 4.13, através da ação não genômica do ácido retinóico e fosforilação de seus receptores no início da transcrição. As quinases *PKA-cat* e *CDK7* apareceram com expressão aumentada, já a helicase *XPB* estava diminuída. Dos fatores de transcrição encontrados, *RAR-alpha* e *RXR-alpha* apresentaram aumento de expressão, em

contrapartida, *RXRA* apresentou diminuição de expressão. Outros genes como RBP4 (transportador) e histona H3 apareceram aumentado e diminuído, respectivamente. Assim sendo, estes achados indicam que *HOTAIR* também pode regular a transcrição gênica a nível genético.



**Figura 4.13. Regulação da transcrição pela ação não genômica do ácido retínico e fosforilação de seus receptores em MDA-MB-468.** Mapa da regulação genética do início da transcrição mediada pelo ácido retínico e fosforilação de seus receptores, contendo genes diferencialmente expressos na linhagem MDA-MB-468 após silenciamento gênico de *HOTAIR*. Os termômetros em vermelho indicam expressão aumentada e, em azul, expressão diminuída. Legenda dos símbolos e interações no Anexo C.

Chamou nossa atenção, na linhagem MDA-MB-468, genes da sinalização de NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) aparecerem DE após o



Os genes envolvidos na sinalização de NF- $\kappa$ B encontrados diminuídos ou aumentados após o silenciamento gênico de *HOTAIR* estão descritos na tabela 4.8. Nossos dados indicam que, na ausência de *HOTAIR*, ocorre uma menor ativação da via.

**Tabela 4.8.** Genes diferencialmente expressos da sinalização de NF- $\kappa$ B identificados na linhagem MDA-MB-468 após o silenciamento gênico de *HOTAIR*.

| <b>Símbolo</b> | <b>Nome</b>                                                                        | <b>Fold change</b> |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| PPP3CB         | protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isozyme                             | 3,2454545          |
| NKAP           | NFKB activating protein                                                            | 3,1371949          |
| PRKACA         | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha                                   | 2,585389           |
| CHUK           | conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase                                       | 2,1878035          |
| NFKBIB         | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta | 2,1371298          |
| RNF114         | ring finger protein 114                                                            | -2,1860766         |
| RNF114         | ring finger protein 114                                                            | -2,1860766         |
| IRAK1          | interleukin-1 receptor-associated kinase 1                                         | -2,176837          |
| PPP3CA         | protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme                            | -4,1644998         |
| IKBKG          | inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma        | -4,423772          |



## 5. DISCUSSÃO

Segundo Feinberg (2018), a epigenética pode ser definida como “Modificações de DNA ou de fatores associados que contêm informação, sem ser a própria sequência de DNA, mantidas durante a divisão celular, influenciadas pelo ambiente e que causam mudanças estáveis na expressão gênica”. O termo “epigenética” define estudos de mudanças hereditárias em expressão gênica e organização da cromatina que não estão codificadas no DNA. A herança epigenética representa um mecanismo crítico que permite a propagação estável dos programas de atividade gênica ao longo de gerações celulares. O conjunto das marcas epigenéticas presentes no genoma recebe o nome de epigenoma (SAWAN *et al.*, 2008; VAISERMANA; KOLIADAA; LUSHCHAK, 2018).

Estudos no campo da epigenética tem aumentado nos últimos anos, isso se deve à consciência de que a herança epigenética é essencial não só para o desenvolvimento, mas também durante toda a vida. Alterações nos padrões epigenéticos estão associados ao desenvolvimento de várias doenças, a destacar-se o câncer (SAWAN *et al.*, 2008; FEINBERG, 2018).

Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é o mais bem estudado. Recentemente, o papel dos *ncRNAs* tem sido mais explorado, uma vez que foi descoberto que configuram um importante mecanismo de regulação da expressão gênica. No grupo dos *ncRNAs*, os mais conhecidos são os *miRNAs*. Entretanto, atualmente a classe dos *lncRNAs* tem sido alvo de crescentes estudos. Alguns *lncRNAs* foram descritos regulando processos importantes no desenvolvimento e progressão tumoral, reforçando sua importante contribuição na carcinogênese.

O *lncRNA HOTAIR* tem sido considerado um regulador *master* da expressão gênica, desempenhando um papel crítico no desenvolvimento de diversos tumores. Em CM, *HOTAIR* foi associado à proliferação, migração, invasão, metástase e apoptose (DENG *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019; COLLINA *et al.*, 2019), no entanto seus mecanismos de ação permanecem pouco compreendidos. *HOTAIR* pode, de forma direta ou indireta, participar do controle da expressão gênica em diversos níveis, o que o torna um importante alvo de estudo.

Dados da literatura mostram que *HOTAIR* apresenta diferença de expressão entre os modelos *in vitro* de CM (WANG *et al.*, 2015). Conduzimos então uma análise dos níveis de *mRNA* de *HOTAIR* nos nossos modelos *in vitro*, representantes dos subtipos moleculares de CM. No estudo de Wang e seus colaboradores (2015), a expressão de *HOTAIR* foi avaliada em 8 linhagens celulares, sendo 4 representantes do subtipo TN (MDA-MB-468, MDA-MB-

231, SUM159 e HCC-1806) e 4 não-TN: T-47D (LUMA), BT-474 (Lum/HER), ZR-7-51 (LUMA) e SKBR-3 (HER2+). Os valores encontrados referentes a expressão de *HOTAIR* em cada uma das linhagens foi comparado com a linhagem MCF-7 (LUMA). Em nosso estudo, utilizamos as linhagens BT-474, SKBR-3 e HCC-1954 (HER2+), MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (TN). Os valores referentes a expressão de *HOTAIR* obtidos de cada uma das nossas linhagens também foram comparados ao valor de MCF-7.

Segundo os dados de Wang e seus colaboradores (2015), em BT-474 a expressão de *HOTAIR* é maior que em SKBR-3, o mesmo é observado para MDA-MB-468, quando comparada a MDA-MB-231, o que vai de acordo com os nossos achados. Entretanto, nossa linhagem MDA-MB-231 não apresentou expressão de *HOTAIR*, como foi encontrado por Wang e seus colaboradores (2015), mesmo que em nível relativamente baixo.

Linhagens celulares são modelos experimentais amplamente utilizados na pesquisa, com diferentes finalidades. Por essa razão, a obtenção e o uso de linhagens certificadas são de extrema importância, uma vez que problemas como a contaminação cruzada ou a identificação equivocada dessas linhagens, compromete a fidedignidade dos resultados obtidos e as conclusões oriundas desses resultados. Em nosso estudo, tomamos o cuidado de certificar todas as linhagens utilizadas, a fim de garantir sua identidade. A certificação foi realizada pelo laboratório do Biobanco do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) - Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM). No processo de certificação, excluímos nossa linhagem T-47D das análises, porque estava inconsistente com o perfil descrito para a mesma.

Um outro ponto importante, somado ao fato de que muitos trabalhos são publicados com linhagens que não passaram por certificação, provenientes de doação ou fonte não confiável, é a forma como essas linhagens são cultivadas. Por exemplo, o meio de cultura utilizado, bem como as concentrações e os próprios suplementos adicionados a este meio, a densidade e a confluência celular em cultura e as configurações da estufa onde essas células estão sendo cultivadas. Isto pode justificar a diferença na expressão de *HOTAIR* identificada linhagem MDA-MB-231 do nosso estudo, comparada ao que foi encontrado no estudo Wang e seus colaboradores (2015), uma vez que em teoria são a mesma linhagem.

Ainda sobre os resultados obtidos na análise de expressão de *HOTAIR* em nosso estudo, identificamos que os nossos modelos Lum/HER (BT-474) e TN (MDA-MB-468), apresentam superexpressão de *HOTAIR*, e que essa expressão é maior em MDA-MB-468. No trabalho de Wang e seus colaboradores (2015), também foi observado a superexpressão de *HOTAIR*

nestas duas linhagens, no entanto, a expressão é maior em BT-474. Essa divergência pode estar relacionada aos normalizadores utilizados, uma vez que não foram os mesmos. Em nosso estudo utilizamos a média das massas dos genes *GAPDH* e *B2M* para normalização, já Wang e seus colaboradores (2015), utilizaram *18S* ou  *$\beta$ -actina*.

Com o silenciamento gênico de *HOTAIR*, encontramos 854 genes DE para a linhagem BT-474 e 1207 genes DE para a linhagem MDA-MB-468, onde a maior parte deles é exclusivo de cada linhagem. Através da análise de enriquecimento das vias de sinalização, foi possível compreender melhor em que contextos celulares estes genes estavam inseridos. Com base nos dados obtidos, identificamos que os genes DE participam de sinalizações celulares distintas entre os dois modelos.

Em nossos resultados, foram encontrados membros da regulação epigenética DE após o silenciamento de *HOTAIR* para ambos os modelos. Estes genes estão distribuídos entre *ncRNAs*, componentes ou genes associados aos complexos *PcG* e *TrxG* e genes relacionados a histonas. A maioria destes genes não são comuns entre os modelos, demonstrando que dentro de um mesmo grupo gênico, *HOTAIR* pode regular membros distintos.

O complexo *PcG* está associado ao silenciamento gênico, sendo composto por dois complexos chamados de PRC1 e PRC2, já descritos no item 1.2.2.1.2. A interação entre *HOTAIR* e membros deste complexo, especialmente *EZH2*, um importante componente de PRC2, já foi relatada na literatura. Foi demonstrado em modelos *in vitro* de câncer colorretal, que *HOTAIR* e *EZH2* são positivamente regulados, e que *HOTAIR* se liga diretamente a *EZH2* promovendo a tumorigênese (HUANG *et al.*, 2018). Em modelos *in vitro* de câncer gástrico, observou-se que *HOTAIR* reprime a transcrição de E-CADERINA através do recrutamento de *EZH2* para seu promotor, e que o silenciamento de *HOTAIR* diminuiu a migração e invasão das células tumorais (CHEN *et al.*, 2017). Para câncer de próstata, utilizando modelos *in vitro* e xenográficos, foi visto que *HOTAIR* reprime a expressão do miR-193a através do recrutamento de *EZH2*, favorecendo a progressão do tumor, e que a superexpressão desse *miRNA* inibe a expressão de *HOTAIR*, suprimindo a migração e invasão celular e favorecendo apoptose (LING *et al.*, 2017).

Em CM, Han e colaboradores (2018), observaram que *HOTAIR* e *EZH2* estavam com expressão elevada em modelos *in vitro* dos subtipos LUMA, HER2+ e TN. Seus resultados demonstram que o silenciamento de *HOTAIR* na linhagem MCF-7 (LUMA) aumenta a expressão de *EZH2*, e que o inverso ocorre quando *EZH2* é silenciado, o que mostra uma relação inversamente proporcional na expressão deles. Além disso, observaram que a

regulação negativa de *HOTAIR* ou silenciamento de *EZH2*, inibe a proliferação, invasão e migração das células de CM, promovendo apoptose. Em nosso estudo, observamos um aumento na expressão de *EZH2* em BT-474 (Lum/HER), após o silenciamento de *HOTAIR*, corroborando com os resultados de Han e colaboradores (2018), apesar de se tratar de subtipos diferentes. Além disso, observamos para este subtipo, alterações em vias de apoptose, indicando sua possível ativação na ausência de *HOTAIR*, o que também vai de acordo com os achados de Han e colaboradores (2018). Não encontramos nenhum dado a respeito da expressão de *EZH2* em modelos Lum/HER na literatura.

Outros genes do complexo *PcG*, também foram encontrados alterados em nosso estudo, como genes da família *Chromobox (CBX)*. Em humanos, são descritos 8 genes da família *CBX*, conhecidos por estarem associados ao *core* de PRC1 (LIANG *et al.*, 2017). Em CM, Chen e colaboradores (2017), observaram que a superexpressão de *CBX2* em pacientes, está associada a características clínicas, incluindo metástase linfonodal, tamanho do tumor e *status* positivo de HER2. Além disso, observaram que dentro do grupo de pacientes que apresentavam alta expressão de *CBX2*, a taxa de sobrevida global foi menor naqueles tratados com Taxol®, quando comparada a pacientes que não receberam tratamento com Taxol®, indicando que este gene pode ser um possível marcador de sensibilidade para esta droga. O Taxol® é um inibidor mitótico, estabilizador de microtúbulos, utilizado no tratamento do CM. Liang e colaboradores (2017), com base em análises de banco de dados, observaram que em pacientes HER2+, a expressão de *CBX2* foi significativamente maior que em pacientes do subtipo Luminal.

Em nosso modelo Lum/HER (BT-474), observamos que *CBX2* apresentou aumento de expressão na ausência de *HOTAIR*. Os pacientes dos estudos de Chen e seus colaboradores (2017) e Liang e colaboradores (2017), eram HER2+ e apresentaram alta expressão de *CBX2*, e curiosamente, nossos modelos HER2+ tem menor expressão de *HOTAIR*. Isto indica que de alguma forma, *HOTAIR* pode regular negativamente a expressão deste gene, no modelo Lum/HER. Além do mais, o aumento da expressão de *CBX2* neste modelo, pode estar relacionado a expressão de HER2, uma vez que de acordo com Liang e colaboradores (2017), o subtipo Luminal tem menor expressão de *CBX2*, quando comparado ao subtipo HER2+.

No estudo de Zheng e seus colaboradores (2019), foi demonstrado que a superexpressão de *CBX2*, potencialmente impulsiona a proliferação e invasão de células tumorais, via sinalização de PI3K/ AKT em modelos *in vitro*, dos subtipos LUMA e TN. No nosso modelo de TN (MDA-MB-468), *CBX2* apresentou diminuição de expressão quando *HOTAIR* foi

silenciado, demonstrando uma potencial regulação positiva de *HOTAIR* sobre este gene. A expressão elevada de *HOTAIR* e *CBX2* no subtipo TN, pode estar associada a maior agressividade apresentada por este subtipo, uma vez que ambos já foram descritos relacionados ao aumento de proliferação e invasão de células tumorais no CM. Os resultados observados para os modelos Lum/HER e TN em nosso estudo, indicam que a influência de *HOTAIR* sobre a expressão de *CBX2* é diferente entre estes dois subtipos.

Um outro membro da família *CBX*, encontrado DE após o silenciamento de *HOTAIR* foi *CBX7*, na linhagem MDA-MB-468 (TN). Em CM, foi visto que este gene atua como um supressor tumoral, regulando a tumorigênese através da supressão da via de Wnt /  $\beta$ -catenina mediada por *DKK-1*, um antagonista da via de Wnt. No modelo proposto, a perda de *CBX7* induz o silenciamento gênico de *DKK-1* mediado por HDAC, promovendo a ativação da via de Wnt /  $\beta$ -catenina/ TCF, o que resulta na translocação nuclear da  $\beta$ -catenina e na regulação positiva dos genes alvo de TCF, incluindo c-Myc. Isto promove o aumento da auto-renovação das células tronco tumorais da mama (CSCs) e contribui para a tumorigênese (KIM *et al.*, 2015). Ainda no estudo de Kim e seus colaboradores (2015), foi observado em modelo *in vitro* do subtipo TN, que a superexpressão de *CBX7* diminui a formação de colônias celulares. Em modelos xenográficos, os quais receberam células MDA-MB-231 silenciadas para *CBX7*, foi observado um aumento da formação e crescimento tumoral, quando comparados ao controle.

No nosso modelo TN, silenciado para *HOTAIR*, observamos a diminuição da expressão de *CBX7*, sugerindo uma regulação positiva de *HOTAIR* sobre este gene. Curiosamente, o gene *DKK-1* foi identificado com expressão aumentada. Neste contexto, com base nos achados de Kim e seus colaboradores (2015), o silenciamento de *HOTAIR* e consequentemente a diminuição de *CBX7*, poderiam favorecer a tumorigênese no subtipo TN. No entanto, essas observações são a nível de transcritos, não se sabe o quanto isso afeta o nível de expressão da proteína *CBX7*, tornando-se necessários outros ensaios para melhor compreender a relação entre *HOTAIR* e *CBX7*, e seu impacto no desenvolvimento tumoral do CM. Já a respeito da expressão de *DKK-1*, outros genes podem estar envolvidos na regulação da sua transcrição, como o próprio *HOTAIR*, uma vez que não observamos diminuição deste gene na ausência de *CBX7*, como proposto por Kim e seus colaboradores (2015),

Em nossos resultados, também observamos alterações em genes do complexo *TrxG*. Este complexo é antagonista a atividade de *PcG*, estando relacionado a ativação da transcrição gênica. Dentre os genes identificados DE após o silenciamento de *HOTAIR*, associados a *TrxG*, encontramos o gene *KMT2B* alterado em ambos os modelos. Este gene é uma lisina

metil-transferase, componente do complexo MLL. No modelo Lum/HER, este gene aparece aumentado, enquanto que para o modelo TN, foi observado o contrário. Em CM, Su e colaboradores (2016), observaram que a interleucina 20 (IL-20), foi a única que apresentou superexpressão em modelo LUMA tratado com estradiol, e que a expressão de IL-20 induzida pelo estrogênio foi regulada epigeneticamente por *KMT2B*. Além disso, viram que a depleção de *KMT2B* ou de IL-20, interrompe a sinalização de estrogênio, atenua a proliferação celular, reduz a formação de colônias e resulta na interrupção do ciclo celular. As interleucinas são um grupo de citocinas que, em CM, já foram relacionadas ao desenvolvimento e progressão do tumor (ESQUIVEL-VELAZQUEZ *et al.*, 2015).

Uma vez que *KMT2B* parece ser capaz de regular genes relacionados a resposta imune, o aumento de sua expressão em nosso modelo Lum/HER, após o silenciamento de *HOTAIR*, pode de alguma forma, estar associado a algum tipo de resposta inflamatória. Reforçando essa ideia, neste modelo observamos o aumento da expressão de receptores de citocinas, tais como *IFNGR2* (*Interferon gamma receptor 2*), *IL13RA1* (*Interleukin 13 receptor subunit alpha 1*), *IL17RE* (*Interleukin 17 receptor E*) e *TRAF4* (*TNF receptor associated factor 4*). Já para o modelo TN, a diminuição de *KMT2B* pode estar associada a proliferação celular como foi visto por Su e colaboradores (2016), mesmo se tratando de outro subtipo, uma vez que tumores TN sabidamente apresentam altas taxas de proliferação. No entanto, para compreender a influência de *HOTAIR* e *KMT2B* neste processo, é necessário a realização de ensaios específicos. Interessantemente, no modelo TN, foram observadas alterações em vias de resposta imune, a destacar-se a sinalização de NF- $\kappa$ B, discutida adiante. Isto sugere que, no subtipo TN, *HOTAIR* também pode regular genes envolvidos na resposta imune.

Outro membro de *TrxG* encontrado alterado em nosso estudo foi o gene *SMARCC2*. Este gene é uma helicase/ATPase, componente do complexo SWI/SNF. De acordo com Wang e colaboradores (2015), a depleção do gene *SMARCC2*, em carcinoma hepatocelular, reduziu drasticamente a expressão de *TCF7* e *Nanog*, bem como outros alvos da via de Wnt e afetou a capacidade de iniciação do tumor. No modelo TN, *SMARCC2* foi identificado com expressão aumentada, após o silenciamento de *HOTAIR*, indicando uma potencial regulação negativa desse gene. Neste modelo, também identificamos membros da via de Wnt, tais como *FZD4* (*Frizzled class receptor 4*), *DVL2* (*Dishevelled segment polarity protein 2*) e *WLS* (*Wnt ligand secretion mediator*) com expressão diminuída. Além disso, *DKK-1*, inibidor da via, foi identificado com expressão aumentada. A sinalização Wnt regula uma variedade de processos celulares, como a diferenciação, proliferação e a pluripotência das células-tronco. Sua sinalização aberrante é uma marca registrada de muitos tumores. Tumores de mama TN,

sabidamente apresentam desregulação na sinalização canônica e não canônica de Wnt (POHL *et al.*, 2017). Nossos achados sugerem que o silenciamento de *HOTAIR* pode afetar a expressão de membros da via de Wnt e possivelmente sua sinalização.

No modelo TN, identificamos também o gene *SMARCC1*, outro componente de SWI/SNF, com expressão aumentada. Em CM, *SMARCC1* foi associado a migração e metástase em modelo TN (WANG *et al.*, 2014). Estes resultados sugerem que *HOTAIR* pode regular genes importantes, relacionados a iniciação e progressão do tumor, e assim contribuir para a tumorigênese da mama e pode estar relacionado a manutenção do fenótipo agressivo no subtipo TN.

Ainda dentro de regulação epigenética, identificamos alterações em transcritos de *ncRNAs* após o silenciamento de *HOTAIR*, diferentes para cada linhagem. Em BT-474, o *lncRNA SNHG9* apresentou aumento de expressão. Na literatura foi reportado que o eixo SNHG9/miR-199a-5p/Wnt2, regula o crescimento celular e a glicólise aeróbica em glioblastoma (ZHANG *et al.*, 2019). Outro *lncRNA* identificado com expressão aumentada nesta linhagem foi *SNHG15*. Em câncer de pulmão, a superexpressão deste *lncRNA* foi relacionada a proliferação e migração celular (CUI *et al.*, 2018), e o mesmo foi visto para câncer colorretal (LI *et al.*, 2019). Em CM, também com expressão aumentada, *SNHG15* contribui para a resistência a cisplatina em modelos LUMA e TN, atuando como esponja do mir-381 (MI *et al.*, 2020). Observa-se que *HOTAIR* pode ser capaz de regular a expressão de outros *lncRNAs*, e que o aumento da expressão dos mesmos, pode favorecer processos importantes da progressão tumoral.

O *lncRNA SOX21-AS1*, apresentou-se diminuído em BT-474. Dados da literatura mostram que este *lncRNA* está superexpresso em glioma e promove a proliferação e invasão celular, por meio da regulação positiva da expressão de PAK7, uma serina-treonina kinase, atuando como esponja do miR-144-3p (GAI; YUAN, 2020). Em câncer cervical, o silenciamento do *lncRNA SOX21-AS1*, suprimiu a proliferação, migração e invasão de células tumorais, bem como o progresso da transição epitélio-mesenquimal (ZHANG *et al.*, 2019). O *lncRNA ZFAS1*, também diminuído em BT-474, foi descrito como capaz de promover a progressão tumoral em câncer gástrico, através da regulação da sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina mediada por miR-200b (ZHANG *et al.*, 2019). O *lncRNA FAM225A*, diminuído em BT-474, foi descrito promovendo a tumorigênese e a metástase em carcinoma de nasofaringe, agindo como *ceRNA* dos miR-590-3p / miR-1275 e regulando positivamente a integrina *ITGB3* (ZHENG *et al.*, 2019).

Na linhagem MDA-MB-468, o *lncRNA UCA1* foi identificado com expressão diminuída, após o silenciamento de *HOTAIR*. Em CM, foi demonstrado que este *lncRNA* pode regular positivamente *PTPIB* (tirosina fosfatase) e aumentar a proliferação celular através da inibição do miR-206, em modelos LUMA e TN (LI *et al.*, 2019). Foi observado também que este *lncRNA*, confere resistência ao tamoxifeno na terapia endócrina do CM, através da regulação do eixo *EZH2/p21* e da via de sinalização PI3K/AKT, em modelo LUMA resistente ao tamoxifeno (LI *et al.*, 2019). O *lncRNA GLIDR*, também apresentou expressão diminuída. Na literatura, *GLIDR* foi encontrado superexpresso em câncer de próstata, e foi relacionado a processos como transcrição e transdução de sinal (ZHANG *et al.*, 2017). O *lncRNA DLEU1*, encontrado diminuído no nosso modelo TN, foi descrito como altamente expresso em tecidos tumorais de CM, quando comparado ao tecido adjacente normal. Também foi capaz de promover a migração, invasão e a transição epitélio-mesenquimal das células tumorais, pela ligação ao *miRNA-300* mediada pela GTPase *RAB22A*, em modelos *in vitro* dos subtipos LUMA e TN (WANG *et al.*, 2019).

Observa-se que alguns dos *lncRNAs* encontrados DE, foram descritos recentemente, logo, pouco se sabe sobre seu papel na tumorigênese. O fato de apresentarem expressão diferencial, indica que a ausência de *HOTAIR* pode influenciar de maneira positiva ou negativa a sua expressão, e demonstra um *crosstalk* entre membros da regulação epigenética. Importante destacar que, pelos dados da literatura, estes *lncRNAs* atuam ou podem atuar como esponja ou *ceRNA* de *miRNAs*, regulando a expressão gênica e modulando vias de sinalização celular, que podem favorecer o desenvolvimento tumoral.

O ensaio de microarranjo realizado neste estudo, não continha sequências de *miRNAs*. Porém, sabe-se que dentro dos possíveis mecanismos de atuação de *HOTAIR*, está a sua ação como esponja ou *ceRNA* de *miRNAs*. Neste caso, para identificar os possíveis *miRNAs* alvos de *HOTAIR* nos subtipos moleculares do CM, se faz necessário um ensaio de microarranjo específico dos modelos silenciados x não silenciados para *HOTAIR*.

A respeito das vias de sinalização celular encontradas enriquecidas em BT-474, quatro entre as dez vias mais relevantes estavam relacionadas a morte celular por apoptose. A maioria dos genes encontrados em nosso estudo, estão com expressão aumentada e incluem genes que ativam e regulam a via, demonstrando que o silenciamento de *HOTAIR* pode favorecer a ativação de apoptose no subtipo Lum/HER. Consistente com esses resultados, um estudo demonstrou que o silenciamento do *HOTAIR* em células de câncer de pâncreas poderia induzir apoptose (KIM *et al.*, 2013). Liu e colaboradores (2018) verificaram que o



silenciamento de *HOTAIR* inibe a proliferação e promove a apoptose, em células de câncer cervical.

Em CM, Yu *et al.* (2017), observaram que o silenciamento de *HOTAIR* pode regular a proliferação, apoptose, migração e invasão de células MCF-7 (LUMA), através da regulação da via de sinalização P53 / Akt / JNK. O mesmo foi visto por Han e colaboradores (2018) tanto para os modelos LUMA e HER2+. Não foram encontrados dados na literatura sobre o efeito do silenciamento de *HOTAIR* em vias de apoptose para o subtipo Lum/HER. Entretanto, nossos achados corroboram com os dados da literatura, uma vez que este subtipo é um intermediário entre Luminal e HER2+, e pode exibir características e alterações moleculares presentes nos dois subtipos. Lum/HER é o subtipo menos explorado de CM, poucos estudos relacionados a ele são encontrados na literatura. Neste trabalho, estamos apresentando os primeiros dados sobre *HOTAIR* para este subtipo, agregando informações relevantes para a compreensão da biologia do mesmo. Porém, estudos mais aprofundados precisam ser realizados a fim de confirmar estas informações.

Além das vias de apoptose, foram observadas alterações em outras vias, como a de ciclo celular. Um trabalho anterior do nosso grupo, utilizando uma abordagem proteômica para avaliar os subtipos moleculares do CM, demonstrou que entre os subtipos, Lum/HER foi o único que apresentou alterações nesta via (PANIS *et al.*, 2014), corroborando com os nossos achados. Consistente com esses dados, o envolvimento de *HOTAIR* no ciclo celular já foi reportado em outros tipos de tumores. Zhang e colaboradores (2015), observaram que a ligação de *HOTAIR* com *EZH2* (PRC2) levava a progressão de ciclo celular em glioblastoma. Kim e colaboradores (2013), demonstraram que o silenciamento de *HOTAIR* poderia alterar a progressão do ciclo celular e diminuir a proliferação celular em tumores de pâncreas.

Em MDA-MB-468, a análise das vias de sinalização celular encontradas enriquecidas, revelou que quatro entre as dez vias mais relevantes, estavam relacionadas a regulação da transcrição. Membros da regulação epigenética da transcrição apareceram alterados, alguns já discutidos acima. No entanto, também encontramos membros de outros complexos alterados, como N-CoR/SMRT, um correpressor transcricional. Na literatura, este complexo foi relacionado a modulação de resposta ao tamoxifeno (antagonista do receptor de estrogênio), em subtipos ER $\alpha$  positivos do CM, inibindo a interação do tamoxifeno ligado ao receptor ER $\alpha$  (FUJITA *et al.*, 2003). De alguma forma, o silenciamento de *HOTAIR* pode influenciar a expressão de membros do complexo N-CoR/SMRT e potencialmente, alterar sua sinalização no modelo TN. Uma vez que essa sinalização está relacionada ao silenciamento gênico, sua alteração pode levar a ativação de genes, como por exemplo: oncogenes, receptores e ligantes

de outras cascatas de sinalização, genes envolvidos em proliferação, migração e resistência a drogas, e assim contribuir para iniciação e progressão tumoral.

Outra via relacionada a regulação da transcrição em MDA-MB-468, está associada ao ácido retinóico (AR). A sinalização de AR, pode modular a transcrição gênica através da ativação de receptores chamados retinóides, que são sub-classificados em RAR (receptores de ácido retinóico) e RXR (receptores de retinóides X). Uma vez ativados, esses receptores podem interagir com fatores de transcrição e regular a transcrição de genes alvo de AR. Os RARs também têm efeitos não genômicos e ativam vias de sinalização de quinase, que regulam de forma fina a transcrição dos genes alvo do AR. Em modelos TN, foi reportado na literatura que a sinalização de AR influencia na progressão do tumor (MARCATO *et al.*, 2015). Mesquita e colaboradores (2018), observaram que o AR pode induzir sinalizações pró ou anti-invasivas em diferentes modelos de TN. A maioria dos genes identificados nesta via, incluindo quinases e fatores de transcrição, estavam com expressão aumentada após o silenciamento de *HOTAIR*, no nosso modelo TN. Estes achados sugerem uma possível ativação da via, o que poderia favorecer a progressão do tumor e invasividade neste modelo, contribuindo para a agressividade, que é característica do subtipo TN, como proposto por Marcato e colaboradores (2015) e Mesquita e colaboradores (2018).

Apesar da maior parte das vias enriquecidas, em MDA-MB-468, estarem associadas a transcrição, o que nos chamou atenção foi a alteração de genes da sinalização de NF- $\kappa$ B. Os genes alterados após o silenciamento de *HOTAIR*, apareceram na via de resposta inflamatória, que representa um componente importante do microambiente tumoral. A sinalização de NF- $\kappa$ B no CM, já foi reportada na literatura relacionada a progressão da doença. Em relação a *HOTAIR*, Özeş e colaboradores (2017) demonstraram usando peptídeos específicos, que o bloqueio da interação *HOTAIR-EZH2*, reduz a invasão celular e aumenta a sensibilidade à quimioterapia, em modelo TN. Isto foi associado a redução da ativação da via de NF- $\kappa$ B e diminuição da expressão de seus genes alvo.

A relação de *HOTAIR* com a sinalização de NF- $\kappa$ B, já foi descrita também em outros tumores. Em câncer colorretal, foi visto que *HOTAIR* contribui para a resistência ao 5-fluoracil através da supressão do mir-218 e ativação da sinalização de NF- $\kappa$ B (LI *et al.*, 2017). Em mieloma, observaram que *HOTAIR* ativa a expressão de NF- $\kappa$ B e promove proliferação celular (ZHU; LIN, 2019). No câncer de pulmão de pequenas células, Chen *et al.* 2019, demonstraram que *HOTAIR* contribui para a quimioresistência através da ativação de NF- $\kappa$ B. Consistente com os dados da literatura, observamos um aumento da expressão de reguladores

e inibidores da via quando *HOTAIR* foi silenciado, sugerindo sua possível relação com a regulação negativa da sinalização de NF- $\kappa$ B.

Como descrito por de Silviano-Silva e seus colaboradores (2018), *lncRNAs* podem regular a transcrição gênica por múltiplos mecanismos e em vários níveis. Essa regulação pode ser direta ou indireta, influenciando processos e vias de sinalização celular, que podem por sua vez, favorecer a tumorigênese. O *lncRNA HOTAIR* tem sido considerado um regulador chave da expressão gênica, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de diversos tumores. Nossos resultados indicam que o *lncRNA HOTAIR* pode regular genes importantes em vias de apoptose, ciclo celular, resposta imune e na regulação genética e epigenética da transcrição, contribuindo assim para carcinogênese da mama. Entretanto, nossos dados não são capazes de elucidar como essa regulação ocorre e quais são seus efeitos biológicos. Mesmo assim, nossos achados contribuem para a compreensão do papel de *HOTAIR* no modelo TN de CM, e principalmente, no modelo Lum/HER, que é ainda pouco explorado na literatura.

## 6. CONCLUSÃO

- As linhagens celulares BT-474 (Lum/HER) e MDA-MB-468 (TN) apresentaram maior expressão de *HOTAIR*, quando comparados a linhagem menos agressiva (MCF-7), indicando que o mesmo pode ter um papel importante na regulação da expressão gênica nestes subtipos.
- A partir do silenciamento gênico de *HOTAIR* nas linhagens celulares BT-474 e MDA-MB-468, obtivemos o perfil de transcritos de cada modelo, quando comparado ao seu respectivo controle não silenciado. Foram identificados 854 genes diferencialmente expressos no modelo Lum/HER e 1207 genes diferencialmente expressos no modelo TN.
- Para o modelo Lum/HER, foi identificado que *HOTAIR* está envolvido nos processos de transcrição, ciclo celular, transdução de sinal, reprodução, apoptose, transdução de sinal e resposta imune, destacando dentro desses processos, as vias de regulação epigenética e apoptose, como mais representativas.
- Para o modelo TN, foi observado o envolvimento de *HOTAIR* nos processos de ciclo celular, transdução de sinal, transcrição, dano ao DNA, transporte celular e enovelamento de proteínas, destacando dentro desses processos, as vias de regulação epigenética e NF- $\kappa$ B, como mais representativas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, H.; GU, B.; LEE, M. G. Histone methylation modifiers in cellular signaling pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 4577–4592, 2015.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 6. ed. United States: Garland Science, 2017, p. 1463.

ALKHATIB, S. G.; LANDRY, J. W. The Nucleosome Remodeling Factor. **FEBS Letters**, n. 85, v. 20, p. 3197–3207, 2011.

ANDRES-PABLO, A.; MORILLON, A.; WERY, M. LncRNAs, lost in translation or licence to regulate? **Current Gene Therapy**, v. 63, p. 29–33, 2017.

BABIARZ, J. E. *et al.* Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. **Genes & development**, v. 22, p. 2773–2785, 2008.

BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A. M.; BUDZIK, M. P. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. **Contemporary Oncology (Pozn)**, v. 20, n. 1, p. 436–443, 2016.

BADVE, S. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 5, n. 22, p. 294–302, 2015.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, p. 381–395, 2011.

BARALLE, F. E.; GIUDICE, J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 18, p. 437–451, 2017.

BARECHE, Y. *et al.* Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. **Annals of Oncology**, v. 29, p. 895–902, 2018.

BARTONICEK, N. *et al.* Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements. **Molecular Cancer**, v. 15, n. 43, p. 1–10, 2016.

BEERMANN, J. *et al.* Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. **Physiological Reviews**, v. 96, p. 1297–1325, 2016.

BERNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 1, p. 73–85, 2015.

BHAN, A. *et al.* Antisense-transcript long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR is transcriptionally induced by estradiol. **Molecular Biology**, n. 425, v. 19, p. 3707–3722, 2013.

- BHAN, A. *et al.* Histone methylase MLL1 coordinates with HIF and regulate lncRNA HOTAIR expression under hypoxia. **Gene**, v. 629, p. 16–28, 2017.
- BISSELL, M. J.; RIZKI, A.; MIAN, I. S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 753–762, 2003.
- BÖGERSHAUSEN, N.; WOLLNIK, B. Mutational landscapes and phenotypic spectrum of SWI/SNF-related intellectual disability disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, n. 252, v. 11, p. 1–18, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de informações sobre mortalidade**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 06 jan. 2020.
- BUNCH, H. Gene regulation of mammalian long non-coding RNA. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 293, p. 1–15, 2018.
- BURSTEIN, M. D. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1688–1698, 2015.
- CALLE, A. S. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. **Cancer Science**, v. 109, p. 2093–2100, 2018.
- CAO, J.; YAN, Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response and cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 26, p. 1–9, 2012.
- CHANG-QIANG, Y. *et al.* Recent treatment progress of triple negative breast cancer. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, p. 1 – 14, 2019.
- CHEN, H.; DZITOYEVA, S.; MANEV, H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in the mouse hippocampus. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 30, p. 237–245, 2012.
- CHEN, R. *et al.* HOTAIR contributes to chemoresistance by activating NF-κB signaling in small-cell lung cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, n. 12, v. 8, p. 2997–3004, 2019.
- CHEN, S. S. Linking long noncoding RNA localization and function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 9, p. 761–772, 2016.
- CHEN, T. *et al.* Down-regulation of long noncoding RNA HOTAIR sensitizes breast cancer to trastuzumab. **Nature: Scientific Reports**, v. 9, n. 19881, p. 1–12, 2019.
- CHEN, W. Y. *et al.* Chromobox homolog 2 protein: A novel biomarker for predicting prognosis and Taxol sensitivity in patients with breast cancer. **Oncology Letters**, n. 13, p. 1149–1156, 2017.

CHEN, W-M. *et al.* HOX transcript antisense intergenic RNA represses E-cadherin expression by binding to EZH2 in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, n. 23, v. 33, p. 6100–6110, 2017.

CHENG, Y. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine: A new player in brain disorders?. **Experimental Neurology**, v. 268, p. 3–9, 2015.

CHITTOCK, E. C. *et al.* Molecular architecture of polycomb repressive complexes. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, p. 193–205, 2017.

CHITTOCK, E. C. *et al.* Molecular architecture of polycomb repressive complexes. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, p. 193–205, 2017.

CHO, N. Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer. **Ultrasonography**, v. 35, p. 281–288, 2016.

CHO, Y. W. *et al.* Promoter hypermethylation in white blood cell DNA and breast cancer risk. **Journal of Cancer**, v. 6, p. 6819–824, 2015.

COLLINA, F. *et al.* LncRNA HOTAIR up-regulation is strongly related with lymph nodes metastasis and LAR subtype of Triple Negative Breast Cancer. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 9, p. 2018-2024, 2019.

CRICK, F. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, p. 561–563, 1970.

CUI, H. -X *et al.* LncRNA SNHG15 promotes proliferation and migration of lung cancer via targeting microRNA-211-3p. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, n. 22, p. 6838–6844, 2018.

CULLEN, B. R. Transcription and Processing of Human microRNA Precursors (Review). **Molecular Cell**, v. 16, p. 861–865, 2004.

DAHARIYA, S. *et al.* Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. **Molecular Immunology**, v. 112, p. 82–92, 2019.

DAI, X. *et al.* Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017.

DANINO, Y. M. *et al.* The core promoter: At the heart of gene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, p. 1116–1131, 2015.

DE ABREU, F. B. *et al.* The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine. **The American Journal of Pathology**, v. 4, n. 183, p. 1075–1083, 2013.

DELGADO, M. D.; LEÓN, J. Gene expression regulation and cancer. **Clinical Translational Oncology**, v. 8, n. 11, p. 780–787, 2006.

DENG, J. *et al.* Long Non-Coding RNA HOTAIR regulates the proliferation, self-renewal capacity, tumor formation and migration of the cancer stem-like cell (CSC) subpopulation enriched from breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2017.

DENG, Z. *et al.* Rs145204276 and rs4759314 affect the prognosis of prostate cancer by modulating the GAS5/ miR-1284/HMGB1 and HOTAIR/miR-22/HMGB1 signalling pathways. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 435–442, 2020.

DENLI, A. M. *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v. 432, p. 231–235, 2004.

DI SIBIO *et al.* Etiology of breast cancer (C50) in Central and South America. In: Cancer in Central and South America. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**, 2016. Disponível em: <[http://www-dep.iarc.fr/CSU\\_resources.htm](http://www-dep.iarc.fr/CSU_resources.htm)>. Acesso em: 30 de out. 2018.

DI, W. *et al.* The long non-coding RNA HOTAIR promotes thyroid cancer cell growth, invasion and migration through the miR-1-CCND2 axis. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1298–1309, 2017.

DIAMANTOPOULOS, M. A *et al.* Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in câncer. **Annals of Translational Medicine**, n. 6, v. 12, 1–17, 2018.

DIEDERICHS, S. The four dimensions of noncoding RNA conservation. **Trends in Genetics**, v. 4, n. 30, p. 121–123, 2014.

ENDER, C. *et al.* A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. **Molecular Cell**, v. 32, p. 519–528, 2008.

ESQUIVEL-VELAZQUEZ, M. *et al.* The role of cytokines in breast cancer development and progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 00, n. 00, p. 1–16, 2014.

ESTELLER, M. *et al.* A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research**, v. 61, p. 3225–3229, 2001.

FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 14, p. 42–54, 2016.

FEINBERG, A. P. The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation. **New England Journal of Medicine**, v. 378, p. 1323–34, 2018.

FENG, X.; HUANG, S. Effect and mechanism of lncRNA HOTAIR on occurrence and development of gastric cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 6899-6907, 2017.

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, Geneve, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.



FOUNTZILAS, G. *et al.* Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1-13, 2012.

FRÍAS-LASSERRE, D.; VILLAGRA, C. A. The Importance of ncRNAs as Epigenetic Mechanisms in Phenotypic Variation and Organic Evolution. **Frontiers in Microbiology**, v. 2843, n. 8, p. 1–13, 2017.

FUJITA, T. *et al.* Full Activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26704–26714, 2003.

FULLGRABE, J.; HAJJI, N.; JOSEPH, B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, p. 1238–1243, 2010.

GAI, S. Y.; YUAN, Z. H. Long non-coding RNA SOX21-AS1 promotes cell proliferation and invasion through upregulating PAK7 expression by sponging miR-144-3p in glioma cells. **Neoplasma**, p. 1–21, 2020.

GAO, L. *et al.* Circulating long noncoding RNA HOTAIR is an essential mediator of acute myocardial infarction. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 1497–1508, 2017.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Histone modification and replacement in chromatin activation. **Genes & Development**, v. 16, p. 1739–1742, 2002.

GRANT, P. A. A tale of histone modifications. **Genome Biology**, v. 4, n. 2, p. 1–6, 2001.

GUO, J. U. *et al.* Emerging roles of TET proteins and 5- hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. **Cell Cycle**, v. 10, n. 16, p. 2662–2668, 2011.

GUO, X. *et al.* Advances in long noncoding RNAs: identification, structure prediction and function annotation. **Briefings in Functional Genomics**, v. 15, n. 1, p. 38–46, 2016.

GUPTA, R. A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, p. 1071–1076, 2010.

GUTSCHNER, T. *et al.* From biomarkers to therapeutic targets—the promises and perils of long non-coding RNAs in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, p. 83–105, 2018.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 509–524, 2014.

HAN, B. *et al.* The microRNA miR-181c enhances chemosensitivity and reduces chemoresistance in breast cancer cells via down-regulating osteopontin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 544–556, 2018.

HAN, L. *et al.* Downregulation of long noncoding RNA HOTAIR and EZH2 induces apoptosis and inhibits proliferation, invasion, and migration of human breast cancer cells. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 33, n. 6, p. 1–11, 2018.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAO, S.; SHAO, Z. HOTAIR is upregulated in acute myeloid leukemia and that indicates a poor prognosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 6, p. 7223–7228, 2015.

HARBECK, N. Insights into biology of luminal HER2 vs. enriched HER2 subtypes: Therapeutic implications. **The Breast**, v. 24, p. 44–48, 2015.

HASHMI, A. A. *et al.* Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. **World Journal of Surgical Oncology**, n. 16, v. 1, p. 1–6, 2018.

HUANG, K. -b *et al.* Hotair mediates tumorigenesis through recruiting EZH2 in colorectal cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. 1–7, 2018.

INAMURA, K. Major tumor suppressor and oncogenic non-coding RNAs: clinical relevance in lung cancer. **Cells**, v. 6, n. 12, p. 1–15, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. A mulher e o câncer de mama no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 49 p, 2014 (2).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. CÂNCER DE MAMA: é preciso falar disso. Rio de Janeiro: **INCA**, 11p, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 130p, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 120p, 2020.

IYER, M. K. *et al.* The Landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. **Nature Genetics**, v. 47, n. 3, p. 199–208, 2015.

JIA, H. *et al.* Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. **RNA**, v. 16, p. 1478–1487, 2010.

JIAO, Z. Y. *et al.* Plasma long non-coding RNAs (lncRNAs) serve as potential biomarkers for predicting breast cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 1994–1999, 2018.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews: Genetics**, v. 13, p. 485–492, 2012.

- KAMINSKA, M. *et al.* Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny**, v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015.
- KATO, A.; KOMATSU, K. RNF20-SNF2H pathway of chromatin relaxation in DNA double-strand break repair. **Genes**, v. 6, p. 592–606, 2015.
- KENEMANS P.; VERSTRAETEN, R.A.; VERHEIJEN, R.H.M. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas**, v. 49, p. 34–43, 2004.
- KHANDELWAL, A. *et al.* Long non-coding RNA: a new paradigm for lung cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, p. 1235–1251, 2015.
- KIM, H. J. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. **International Journal of Oncology**, v. 46, p. 521–530, 2015.
- KIM, H. –Y. *et al.* CBX7 inhibits breast tumorigenicity through DKK-1-mediated suppression of the Wnt/b-catenin pathway. **The FASEB Journal: Research Communication**, p. 300–313, 2015.
- KIM, K. *et al.* HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. **Oncogene**, v. 32, p. 1616–1625, 2013.
- KOGO, R. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR regulates Polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. **Cancer Research**, n. 71, v. 20, p. 6320–6326, 2011.
- KOLOVOS, P. *et al.* Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. **Epigenetics & Chromatin**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2012.
- KOLUDROVIC, D. *et al.* Chromatin-Remodelling Complex NURF is essential for differentiation of adult melanocyte stem cells. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 10, p. 1–29, 2015.
- KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. **Cell**, v. 173, n. 3, p. 393–407, 2018.
- KOREN, S.; BENTIREN-ALJ, M. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. **Molecular Cell**, v. 60, p. 537–546, 2015.
- LAM, H.; GU, B.; LE, M. G. Histone methylation modifiers in cellular signaling pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 4577–92, 2015.
- LAM, S. M. *et al.* Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, p. 129–138, 2014.
- LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. 1–18, 2010.

- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROST, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, n. 75, p. 843–854, 1993.
- LEE, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, p. 415–419, 2003.
- LEVINE, M.; TJIAN, R. Transcription regulation and animal diversity. **Nature**, v. 424, p. 147–151, 2003.
- LI, E. *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells through the AKT/mTOR signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, p. 5321–5328, 2017.
- LI, G. *et al.* Long Noncoding RNA plays a key role in metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- LI, L. *et al.* Estrogen and progesterone receptor status affect genome-wide DNA methylation profile in breast cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 19, p. 4273–4277, 2010.
- LI, M. *et al.* LncRNA-SNHG15 enhances cell proliferation in colorectal cancer by inhibiting miR-338-3p. **Cancer Medicine**, v. 8, p. 2404–2413, 2019.
- LI, P. *et al.* lncRNA HOTAIR contributes to 5fu resistance through suppressing miR-218 and activating NF- $\kappa$ B/TS signaling in colorectal cancer. **Molecular Therapy: Nucleic Acids**, v. 8, p. 356–369, 2017.
- LI, Y. *et al.* Long non-coding RNA UCA1 promotes breast cancer by upregulating PTP1B expression via inhibiting miR-206. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 275, p. 1–12, 2019.
- LI, Z. *et al.* Long non-coding RNA UCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer endocrinotherapy through regulation of the EZH2/p21 axis and the PI3K/AKT signaling pathway. **International Journal of Oncology**, v. 54, p. 1033–1042, 2019.
- LIANG, Y. -K *et al.* Prognostic values of distinct CBX family members in breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 54, p. 92375–92387, 2017.
- LIM, D. H. K.; MAHER, E. R. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 12, p. 37–42, 2010.
- LING, Z. *et al.* Involvement of aberrantly activated HOTAIR/EZH2/miR-193a feedback loop in progression of prostate cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 159, p. 1–15, 2017.
- LIU, L. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR acts as a competing endogenous RNA to promote glioma progression by sponging miR-126-5p. **Journal of Cell Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6822–6831, 2018.

- LIU, M. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR promotes cervical cancer progression through regulating BCL2 via targeting miR-143-3p. **Cancer Biology & Therapy**, v. 19, n. 5, p. 391-399, 2018.
- LU, C.; ALLIS, C. D. SWI/SNF complex in cancer: ‘remodeling’ mechanisms uncovered. **Nature Genetics**, v. 49, n. 2, p. 178–179, 2017.
- LUAN, W. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR acts as a competing endogenous RNA to promote malignant melanoma progression by sponging miR-152-3p. **Oncotarget**, v. 49, n. 8, p. 85401–85414, 2017.
- LYER, M. K. *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. **Nature Genetics**, v. 3, n. 47, p. 199-211, 2015.
- MACFARLANE, L.-A.; MURPHY, P. R. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. **Current Genomics**, v. 11, p. 537–561, 2010.
- MARCATO, P. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. **Molecular Oncology**, v. 9, p. 17–31, 2015.
- MEEKS, J. J.; SHILATIFARD, A. Multiple roles for the MLL/COMPASS family in the epigenetic regulation of gene expression and in cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, p. 425–446, 2017.
- MEZQUITA, B. *et al.* All-trans-retinoic acid activates the pro-invasive Src-YAP-Interleukin 6 axis in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells while cerivastatin reverses this action. **Nature: Scientific Reports**, v. 8, n. 7047, p. 1–8, 2018.
- MI, H. *et al.* SNHG15 contributes to cisplatin resistance in breast cancer through sponging miR-381. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 657-666, 2020.
- MILEVSKIY, M. J. G. *et al.* Long-range regulators of the lncRNA HOTAIR enhance its prognostic potential in breast cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 25, p. 3269–3283, 2016.
- MORITZ, L. E.; TRIEVEL, R. C. Structure, mechanism, and regulation of polycomb repressive complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 36, p. 13805–13814, 2018.
- MORLANDO, M.; FATICA, A. Alteration of epigenetic regulation by long noncoding RNAs in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 570, p. 1–16, 2018.
- MULLARD, A. HOTAIR rises: new role for non-coding RNAs. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 601, 2007.
- NIK-ZAINAL, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. **Nature**, v. 534, p. 47–54, 2016.

- OKAMURA, K. *et al.* The mirtron pathway generates microRNA-Class regulatory RNAs in *Drosophila*. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 89–100, 2007.
- ONODERA, A.; NAKAYAMA, T. Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. **Trends in Molecular Medicine**, v. 5, n. 21, p. 330–340, 2015.
- Özeş, A. R. *et al.* Therapeutic targeting using tumor specific peptides inhibits long noncoding RNA HOTAIR activity in ovarian and breast cancer. **Nature: Scientific Reports**, v. 7, n. 894, p. 1–11, 2017.
- OZSOLAK, F. *et al.* Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. **Genes & Development**, v. 22, p. 3172–3183, 2008.
- PANIS, C. *et al.* Label-Free proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes. **Journal of Proteome Research**, n. 13, p. 4752–4772, 2014.
- PASTOR, W. A.; ARAVIND, L.; RAO, A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 341–356, 2013.
- PEROU, C. M. *et al.* Molecular Portraits Breast Cancer. **Nature**, v. 533, p. 747–752, 2000.
- PIRAS, V.; TOMITA, M.; SELVARAJOO, K. Is central dogma a global property of cellular information flow?. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 439, p. 1–8, 2012.
- POHL, S-G. *et al.* Wnt signaling in triple-negative breast cancer. **Oncogenesis**, v. 6, n. 310, p. 1–12, 2017.
- POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 11, n. 117, p. 3155–3163, 2007.
- PRAT, A. *et al.* Intrinsic molecular subtypes of HER2+ breast cancer. **Oncotarget**, v. 43, n. 8, p. 73362–73363, 2017.
- PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, p. 5–23, 2011.
- PUKKILA, P. J. Molecular Biology: The Central Dogma. **Encyclopedia of Life Sciences**©, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- QUINN, J. J.; CHANG, W. H. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews: Genetics**, v. 17, p. 47–62, 2016.
- RAMANOUSKAYA, T. V.; GRINEV, V. V. The determinants of alternative RNA splicing in human cells. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 292, p. 1175–1195, 2017.
- REED, A. E. M. *et al.* Recent advances in breast cancer research impacting clinical diagnostic practice. **The Journal of Pathology**, v. 247, p. 552–562, 2018.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1113–1124, 2013.

ROMAGNOLO, D. F. *et al.* Epigenetics of breast cancer: Modifying role of environmental and bioactive food compounds. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 1310–1329, 2016.

ROSSETTO, D.; AVVAKUMOV, K.; CÔTÉ, J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. **Epigenetics**, v. 7, n. 10, p. 1098–1108, 2012.

SAINI, H. K.; GRIFFITHS-JONES, S.; ENRIGHT, A. J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17719–17724, 2007.

SALVIANO-SILVA, A. *et al.* Besides pathology: long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. **Non-coding RNA**, v. 4, n. 3, p. 1–30, 2018.

SANTEN, G. W. E.; KRIEK, M.; ATTIKUM, H. VAN. SWI/SNF complex in disorder: SWitching from malignancies to intellectual disability. **Epigenetics**, v. 7, n. 11, p. 1219–1224, 2012.

SAUVAGEAU, M.; SAUVAGEAU, G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. **Cell Stem Cell**, v. 7, p. 299–313, 2010.

SAWAN, C. *et al.* Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutation Research**, v. 642, p. 1–13, 2008.

SAWAN, C.; HERCEG, Z. Histone modifications and cancer. **Advances in Genetics**, v. 70, p. 58–85, 2010.

SCALIA-WILBUR, J. *et al.* Breast cancer risk assessment: moving beyond BRCA 1 and 2. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 26, n. 1, p. 3–8, 2016.

SCHNEIDER-POETSCH, T; YOSHIDA, M. Along the Central Dogma — controlling gene expression with small molecules. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 87, p. 391–420, 2018.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Modern pathology**, v. S2, n. 23, Suppl 2, p. S60–S64, 2010.

SCHUETTENGRUBER, B. *et al.* Genome regulation by Polycomb and Trithorax proteins. **Cell**, v. 128, p. 735–745, 2007.

SCHUETTENGRUBER, B. *et al.* Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. **Cell**, v. 171, p. 34–57, 2017.

- SIBBERING, M.; COURTNEY, C. A. Management of breast cancer: basic principles. **Surgery**, v. 34, n. 1, p. 25–31, 2015.
- SINGLETERY, S. E.; GREENE, F. L.; SOBIN, L. H. Classification of isolated tumor cells. **Cancer**, v. 98, n. 12, p. 2740–2741, 2003.
- SLOMOVIC, S. *et al.* Addition of poly(A) and poly(A)-rich tails during RNA degradation in the cytoplasm of human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 16, n. 107, p. 7407–7412, 2010.
- SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nature Reviews: Genetics**, v. 14, p. 204–220, 2013.
- SORENSEN, K. P. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, n. 142, p.529–536, 2013.
- SORLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.
- SOSLAU, G. Circular RNA (circRNA) was an important bridge in the switch from the RNA world to the DNA world. **Journal of Theoretical Biology**, v. 447, p. 32–40, 2018.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.
- SU, C. -H. *et al.* Regulation of IL-20 expression by estradiol through KMT2B-mediated epigenetic modification. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2016.
- SUBRAMANIAN, A. *et al.* Development of nanotheranostics against metastatic breast cancer - A focus on the biology & mechanistic approaches. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 33, p. 1897–1911, 2015.
- TANG, L.; NOGALES, E.; CIFERRI, C. Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 102, n. 2-3, p. 122–128, 2010.
- TANG, S. *et al.* Overexpression of serum exosomal HOTAIR is correlated with poor survival and poor response to chemotherapy in breast cancer patients. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 37, p. 1–8, 2019.
- TAO, F. *et al.* miR-211 sponges lncRNA MALAT1 to suppress tumor growth and progression through inhibiting PHF19 in ovarian carcinoma. **The FASEB Journal**, v. 32, p. 6330–6343, 2018.
- THOMAS, M. C.; CHIANG, C. -M. The general transcription machinery and general cofactors. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, n. 41, p. 105–178, 2006.



- TSAI, M. -C. Long Noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. **Science**, n. 329, v. 5992, p. 689–693, 2010.
- ULITSKY, I. *et al.* Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. **Cell**, v. 7, n. 147, p. 1537–1550, 2011.
- UNNIKRISHNAN, A. *et al.* The role of DNA methylation in epigenetics of aging. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 192, p. 1–14, 2018.
- VAISERMANA, A.; KOLIADAA, A.; LUSHCHAKB, O. Developmental programming of aging trajectory. **Ageing Research Reviews**, n. 47, p. 105–122, 2018.
- VANCE, K. P.; PONTING, C. P. Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 3, p. 348–355, 2014.
- VIDULA, N.; BARDIA, A. Targeted therapy for metastatic triple negative breast cancer: The next frontier in precision oncology. **Oncotarget**, v. 63, n. 8, p. 106167–106168, 2017.
- VIEIRA, L. M. *et al.* PlantRNA Sniffer: a svm-based workflow to predict long intergenic non-coding RNAs in plants. **Non-coding RNA**, v. 3, n. 11, p. 1–13, 2017.
- VINDULA, N.; BARDIA, A. Targeted therapy for metastatic triple negative breast cancer: The next frontier in precision oncology. **Oncotarget**, v. 8, n. 63, p. 106167–106168, 2017.
- VODUC, D. *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684–1691, 2010.
- WANG, C. *et al.* LncRNA DLEU1/microRNA-300/RAB22A axis regulates migration and invasion of breast cancer cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 23, p. 10410–10421, 2019.
- WANG, H. *et al.* A role of long non-coding RNA HOTAIR in the acquired multidrug resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia cells. **Hematology**, v. 22, n. 4, p. 208–216, 2017.
- WANG, L. *et al.* CARM1 Methylates chromatin remodeling factor BAF155 to enhance tumor progression and metastasis. **Cancer Cell**, v. 25, n. 1, p. 21–36, 2014.
- WANG, Y. *et al.* The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. **Cell Stem Cell**, v. 16, p. 413–425, 2015.
- WANG, Y. -L *et al.* Combined inhibition of EGFR and c-ABL suppresses the growth of triple-negative breast cancer growth through inhibition of HOTAIR. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11150–11161, 2015.
- WEAKE, V. M.; WORKMAN, J. L. Histone ubiquitination: triggering gene activity. **Molecular Cell**, n. 29, p. 653–663, 2008.

YU, Y. *et al.* HOTAIR may regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion of MCF-7 cells through regulating the P53/Akt/JNK signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 555–561, 2017.

ZHANG, C. *et al.* Exosomal HOTAIR promotes proliferation, migration and invasion of lung cancer by sponging miR-203. **Science China: Life Sciences**, v. 63, p. 1–4, 2020.

ZHANG, F. *et al.* Long non-coding RNA ZFAS1 regulates the malignant progression of gastric cancer via the microRNA-200b-3p/Wnt1 axis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, p. 1–12, 2019.

ZHANG, H. *et al.* SNHG9/miR-199a-5p/Wnt2 axis regulates cell growth and aerobic glycolysis in glioblastoma. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 78, n. 10, p. 939–948, 2019.

ZHANG, K. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. **Oncotarget**, v. 6, n. 1, p. 537–546, 2015.

ZHANG, L.; LI, X.; ZHAO, R. Structural analyses of the pre-mRNA splicing machinery. **Protein Science**, v. 22, p. 677–692, 2013.

ZHANG, X. *et al.* Long noncoding RNA SOX21-AS1 promotes cervical cancer progression by competitively sponging miR-7/VDAC1. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1–11, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 4196–4205, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Circulating long non-coding HOX transcript antisense intergenic ribonucleic acid in plasma as a potential biomarker for diagnosis of breast cancer. **Thoracic Cancer**, v. 7, p. 627–632, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 12, p. 3465–3475, 2006.

ZHANG, Y. *et al.* Increased expression of long non-coding RNA GLDR in prostate cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 19, n. 2, p. 145–150, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Histone Deacetylase-3 modification of microrna-31 promotes cell proliferation and aerobic glycolysis in breast cancer and is predictive of poor prognosis. **Journal of Breast Cancer**, v. 21, n. 2, p. 112–123, 2018.

ZHENG, S. *et al.* Overexpression of CBX2 in breast cancer promotes tumor progression through the PI3K/AKT signaling pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 3, p. 1668–1682, 2019.

ZHENG, Z. -Q. *et al.* Long non-coding RNA FAM225A promotes nasopharyngeal carcinoma tumorigenesis and metastasis by acting as ceRNA to sponge miR-590-3p/miR-1275 and upregulate ITGB3. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4612–4626, 2019.

ZHOU, Y. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR enhances radioresistance in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Oncology Letters**, v. 13, p. 1143–1148, 2017.

ZHU, B. -Z.; LIN, L. Effects of lncRNA HOTAIR on proliferation and apoptosis of myeloma cells through NF- $\kappa$ B pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 10042-10048, 2019.

ZONG, Y. *et al.* miR-221/222 promote tumor growth and suppress apoptosis by targeting lncRNA GAS5 in breast cancer. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–8, 2018.

## 8. ANEXOS

**Anexo A - Tabela dos genes diferencialmente expressos após silenciamento de *HOTAIR* na linhagem BT-474 (fold change 2,0)**

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                     | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ABCF3                  | ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3                                 | 4,6984034          |
| ACP1                   | acid phosphatase 1, soluble                                                          | 3,4450557          |
| ACSL3                  | acyl-CoA synthetase long-chain family member 3                                       | 5,065864           |
| ACTL10                 | actin-like 10                                                                        | 4,1412697          |
| ACTR3B                 | ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)                                       | 3,2801728          |
| ACVR1C                 | activin A receptor, type IC                                                          | 2,3646853          |
| AES                    | amino-terminal enhancer of split                                                     | 2,337093           |
| AKAP5                  | A kinase (PRKA) anchor protein 5                                                     | 4,8595824          |
| ALG11                  | ALG11, alpha-1,2-mannosyltransferase                                                 | 5,919698           |
| ANAPC13                | anaphase promoting complex subunit 13                                                | 3,362374           |
| ANAPC15                | anaphase promoting complex subunit 15                                                | 3,9215918          |
| ANKRD10                | ankyrin repeat domain 10                                                             | 2,1657343          |
| APIG2                  | adaptor-related protein complex 1, gamma 2 subunit                                   | 5,6883264          |
| AP3B1                  | adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit                                    | 28,323935          |
| AP5S1                  | adaptor-related protein complex 5, sigma 1 subunit                                   | 16,98079           |
| AQR                    | aquarius intron-binding spliceosomal factor                                          | 5,8464375          |
| AREG                   | amphiregulin                                                                         | 11,708348          |
| ARF1                   | ADP-ribosylation factor 1                                                            | 5,8923225          |
| ARF3                   | ADP-ribosylation factor 3                                                            | 2,2128365          |
| ARF4                   | ADP-ribosylation factor 4                                                            | 3,6120396          |
| ARFGAP1                | ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1                                  | 5,6688647          |
| ARFGEF1                | ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1 (brefeldin A-inhibited) | 2,9097583          |
| ARHGAP12               | Rho GTPase activating protein 12                                                     | 2,3140922          |
| ARHGEF17               | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17                                      | 2,1483564          |
| ARHGEF7                | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7                                       | 6,1548214          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                            | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ASB9                   | ankyrin repeat and SOCS box containing 9                                                    | 9,939611           |
| ASPH                   | aspartate beta-hydroxylase                                                                  | 3,2857761          |
| ASPSCR1                | alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1                                   | 14,366649          |
| ATAD2                  | ATPase family, AAA domain containing 2                                                      | 2,2039506          |
| ATF2                   | activating transcription factor 2                                                           | 10,909561          |
| ATF3                   | activating transcription factor 3                                                           | 21,235825          |
| ATF6                   | activating transcription factor 6                                                           | 6,0200543          |
| ATG9A                  | autophagy related 9A                                                                        | 3,2132142          |
| ATP2B4                 | ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4                                    | 5,079972           |
| ATP5E                  | ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit        | 2,5005205          |
| ATP5G2                 | ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C2 (subunit 9) | 6,60544            |
| ATP6V1C1               | ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1                         | 11,02717           |
| ATP6V1D                | ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D                          | 9,174512           |
| BACE1                  | beta-site APP-cleaving enzyme 1                                                             | 9,442579           |
| BAI2                   | brain-specific angiogenesis inhibitor 2                                                     | 5,296134           |
| BBS5                   | Bardet-Biedl syndrome 5                                                                     | 2,1230478          |
| BCAP31                 | B-cell receptor-associated protein 31                                                       | 2,1622145          |
| BCAR1                  | breast cancer anti-estrogen resistance 1                                                    | 3,2442405          |
| BCL7B                  | B-cell CLL/lymphoma 7B                                                                      | 6,3270683          |
| BECN1                  | beclin 1, autophagy related                                                                 | 7,7642817          |
| BID                    | BH3 interacting domain death agonist                                                        | 6,3565307          |
| BLOC1S3                | biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 3                                     | 2,0021534          |
| BLVRA                  | biliverdin reductase A                                                                      | 2,8252225          |
| BMF                    | Bcl2 modifying factor                                                                       | 2,7015927          |
| BRD4                   | bromodomain containing 4                                                                    | 2,1527314          |
| BYSL                   | bystin-like                                                                                 | 2,031424           |
| C2CD5                  | C2 calcium-dependent domain containing 5                                                    | 8,259079           |
| CARHSP1                | calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa                                              | 3,3388312          |
| CBX2                   | chromobox homolog 2                                                                         | 2,4577749          |
| CCDC137                | coiled-coil domain containing 137                                                           | 3,4199164          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| CCDC14                 | coiled-coil domain containing 14                                 | 2,4947898          |
| CCDC34                 | coiled-coil domain containing 34                                 | 2,709736           |
| CCNK                   | cyclin K                                                         | 2,4636624          |
| CCNL2                  | cyclin L2                                                        | 4,383954           |
| CD276                  | CD276 molecule                                                   | 2,7160897          |
| CDADC1                 | cytidine and dCMP deaminase domain containing 1                  | 88,48389           |
| CDC25A                 | cell division cycle 25A                                          | 2,0000787          |
| CDC26                  | cell division cycle 26                                           | 6,173857           |
| CDC7                   | cell division cycle 7                                            | 5,085102           |
| CEP135                 | centrosomal protein 135kDa                                       | 5,7462916          |
| CETN3                  | centrin, EF-hand protein, 3                                      | 9,629732           |
| CGREF1                 | cell growth regulator with EF-hand domain 1                      | 13,941606          |
| CHSY1                  | chondroitin sulfate synthase 1                                   | 2,1246877          |
| CIAPIN1                | cytokine induced apoptosis inhibitor 1                           | 4,3498726          |
| CKAP4                  | cytoskeleton-associated protein 4                                | 5,2257023          |
| CLDN7                  | claudin 7                                                        | 2,98547            |
| CLIC5                  | chloride intracellular channel 5                                 | 2,480672           |
| CLSTN3                 | calsyntenin 3                                                    | 6,5661287          |
| CMTR2                  | cap methyltransferase 2                                          | 3,48667            |
| CNFN                   | cornifelin                                                       | 15,717391          |
| COA5                   | cytochrome c oxidase assembly factor 5                           | 12,003065          |
| COG7                   | component of oligomeric golgi complex 7                          | 2,7216685          |
| COL4A3BP               | collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein | 4,537404           |
| COMMD10                | COMM domain containing 10                                        | 4,7890987          |
| COMMD4                 | COMM domain containing 4                                         | 6,0547457          |
| COPS4                  | COP9 signalosome subunit 4                                       | 2,626858           |
| CORO1A                 | coronin, actin binding protein, 1A                               | 4,470683           |
| COX20                  | COX20 cytochrome c oxidase assembly factor                       | 3,2716646          |
| CPSF1                  | cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa           | 3,9650972          |
| CPSF6                  | cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68kDa            | 2,4282482          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|
| CRCP                   | CGRP receptor component                                       | 2,2509196          |
| CS                     | citrate synthase                                              | 5,8120008          |
| CSDE1                  | cold shock domain containing E1, RNA-binding                  | 2,1437757          |
| CSGALNACT2             | chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2       | 17,644634          |
| CSNK1D                 | casein kinase 1, delta                                        | 2,231101           |
| CUL1                   | cullin 1                                                      | 4,108116           |
| CYP11A1                | cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1        | 11,249183          |
| DAZAP1                 | DAZ associated protein 1                                      | 3,0334575          |
| DCAF10                 | DDB1 and CUL4 associated factor 10                            | 3,3486893          |
| DCTN6                  | dynactin 6                                                    | 7,7274413          |
| DDAH1                  | dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1                     | 4,794861           |
| DDX24                  | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 24                        | 8,044841           |
| DDX55                  | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55                     | 3,1001666          |
| DHRS1                  | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1                 | 2,852938           |
| DHRS7B                 | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B                | 6,8324556          |
| DHX34                  | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 34                     | 52,57506           |
| DIRC2                  | disrupted in renal carcinoma 2                                | 7,646786           |
| DKFZp686K1684          | uncharacterized LOC440034                                     | 42,88434           |
| DLEU2L                 | deleted in lymphocytic leukemia 2-like                        | 4,8317275          |
| DMXL1                  | Dmx-like 1                                                    | 5,773813           |
| DNAJC6                 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6                   | 4,3061156          |
| DOCK7                  | dedicator of cytokinesis 7                                    | 26,797388          |
| DPYSL4                 | dihydropyrimidinase-like 4                                    | 7,397358           |
| DPYSL5                 | dihydropyrimidinase-like 5                                    | 2,1340206          |
| DSCR3                  | Down syndrome critical region 3                               | 5,5061717          |
| DUS3L                  | dihydrouridine synthase 3-like ( <i>S. cerevisiae</i> )       | 2,8002038          |
| DUSP8                  | dual specificity phosphatase 8                                | 2,897428           |
| DYNC1H1                | dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1                          | 13,681655          |
| ECH1                   | enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal                            | 5,0771804          |
| EIF1AD                 | eukaryotic translation initiation factor 1A domain containing | 2,2576828          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                    | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------|
| EIF2B3                 | eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa | 3,169464           |
| EIF4B                  | eukaryotic translation initiation factor 4B                         | 3,2617464          |
| ELMOD3                 | ELMO/CED-12 domain containing 3                                     | 5,403711           |
| EMP3                   | epithelial membrane protein 3                                       | 3,209217           |
| ENDOG                  | endonuclease G                                                      | 5,14968            |
| EPB41L4A-AS1           | EPB41L4A antisense RNA 1                                            | 3,4982374          |
| ERBB3                  | erb-b2 receptor tyrosine kinase 3                                   | 4,9101524          |
| ERF                    | Ets2 repressor factor                                               | 6,8859906          |
| EWSR1                  | EWS RNA-binding protein 1                                           | 4,103148           |
| EXOC7                  | exocyst complex component 7                                         | 2,5438716          |
| EXOSC2                 | exosome component 2                                                 | 2,0322804          |
| EXOSC7                 | exosome component 7                                                 | 5,4398136          |
| EXTL3                  | exostosin-like glycosyltransferase 3                                | 2,0127814          |
| EZH2                   | enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit           | 2,5498197          |
| F12                    | coagulation factor XII (Hageman factor)                             | 2,8206263          |
| FAF2                   | Fas associated factor family member 2                               | 5,0288343          |
| FAM118A                | family with sequence similarity 118, member A                       | 2,8491535          |
| FAM120AOS              | family with sequence similarity 120A opposite strand                | 2,4783683          |
| FAM133B                | family with sequence similarity 133, member B                       | 10,803214          |
| FAM155B                | family with sequence similarity 155, member B                       | 4,38676            |
| FAM173B                | family with sequence similarity 173, member B                       | 8,890494           |
| FAM20C                 | family with sequence similarity 20, member C                        | 3,1394706          |
| FAM210A                | family with sequence similarity 210, member A                       | 12,002268          |
| FAM58A                 | family with sequence similarity 58, member A                        | 7,676077           |
| FAM65A                 | family with sequence similarity 65, member A                        | 9,528031           |
| FAM86B2                | family with sequence similarity 86, member B2                       | 2,6754723          |
| FASTKD3                | FAST kinase domains 3                                               | 10,282083          |
| FGGY                   | FGGY carbohydrate kinase domain containing                          | 6,0130825          |
| FHOD1                  | formin homology 2 domain containing 1                               | 3,6702695          |
| FLJ45872               | FLJ45872 protein                                                    | 3,2052548          |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                        | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| FOXN3-AS1              | FOXN3 antisense RNA 1                                                   | 3,0797591          |
| FUZ                    | fuzzy planar cell polarity protein                                      | 11,262427          |
| FYCO1                  | FYVE and coiled-coil domain containing 1                                | 2,0570683          |
| GAPVD1                 | GTPase activating protein and VPS9 domains 1                            | 5,427293           |
| GATA2-AS1              | GATA2 antisense RNA 1                                                   | 6,1430945          |
| GDPGP1                 | GDP-D-glucose phosphorylase 1                                           | 7,0711026          |
| GGH                    | gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, foylpolypogammaglutamyl hydrolase) | 2,4578123          |
| GINS1                  | GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)                                   | 4,2567244          |
| GNB1                   | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1      | 3,5227401          |
| GOLGA2P6               | golgin A2 pseudogene 6                                                  | 3,9923935          |
| GOLGA6L4               | golgin A6 family-like 4                                                 | 3,2895467          |
| GORAB                  | golgin, RAB6-interacting                                                | 4,613899           |
| GPANK1                 | G patch domain and ankyrin repeats 1                                    | 3,2304225          |
| GPC6                   | glypican 6                                                              | 21,65375           |
| GPR56                  | G protein-coupled receptor 56                                           | 2,0376348          |
| GRPEL2                 | GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli)                                    | 14,812379          |
| GSKIP                  | GSK3B interacting protein                                               | 3,1256907          |
| GTF3A                  | general transcription factor IIIA                                       | 2,126032           |
| GTPBP4                 | GTP binding protein 4                                                   | 5,4958987          |
| H1FX                   | H1 histone family, member X                                             | 7,315855           |
| HARS2                  | histidyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial                               | 10,508873          |
| HCAR3                  | hydroxycarboxylic acid receptor 3                                       | 4,0839305          |
| HCN2                   | hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 2 | 4,093778           |
| HDGFRP3                | hepatoma-derived growth factor, related protein 3                       | 3,0545402          |
| HELZ                   | helicase with zinc finger                                               | 2,0476234          |
| HELZ2                  | helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator                | 2,2180443          |
| HEXA                   | hexosaminidase A (alpha polypeptide)                                    | 5,539924           |
| HIPK3                  | homeodomain interacting protein kinase 3                                | 2,8837926          |
| HIST1H2BE              | histone cluster 1, H2be                                                 | 3,8715017          |
| HMGB3                  | high mobility group box 3                                               | 5,06613            |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                       | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| HMX1                   | H6 family homeobox 1                                                   | 2,0420158          |
| HNRNPM                 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M                              | 3,372449           |
| HPS6                   | Hermansky-Pudlak syndrome 6                                            | 2,0769317          |
| HRASLS5                | HRAS-like suppressor family, member 5                                  | 2,1046603          |
| HS1BP3                 | HCLS1 binding protein 3                                                | 4,091196           |
| HSPA1B                 | heat shock 70kDa protein 1B                                            | 16,982237          |
| HSPA9                  | heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)                                  | 3,2357912          |
| IER3                   | immediate early response 3                                             | 3,371613           |
| IFITM4P                | interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene                  | 16,395384          |
| IFNGR2                 | interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)            | 11,510925          |
| IGF1R                  | insulin-like growth factor 1 receptor                                  | 4,461624           |
| IGFBP7                 | insulin-like growth factor binding protein 7                           | 20,634304          |
| IL13RA1                | interleukin 13 receptor, alpha 1                                       | 4,093808           |
| IL17RE                 | interleukin 17 receptor E                                              | 4,5965576          |
| INF2                   | inverted formin, FH2 and WH2 domain containing                         | 2,8992176          |
| INTS4                  | integrator complex subunit 4                                           | 2,0397642          |
| IP6K1                  | inositol hexakisphosphate kinase 1                                     | 6,5920186          |
| IP6K2                  | inositol hexakisphosphate kinase 2                                     | 6,5139565          |
| ISG15                  | ISG15 ubiquitin-like modifier                                          | 7,6704946          |
| ISOC1                  | isochorismatase domain containing 1                                    | 3,7578769          |
| ITPR1                  | inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1                          | 10,046502          |
| IVD                    | isovaleryl-CoA dehydrogenase                                           | 3,2056108          |
| JOSD2                  | Josephin domain containing 2                                           | 5,92936            |
| KANSL2                 | KAT8 regulatory NSL complex subunit 2                                  | 3,8778267          |
| KCNE3                  | potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 3 | 2,1443653          |
| KCNG1                  | potassium channel, voltage gated modifier subfamily G, member 1        | 2,0403938          |
| KDM3A                  | lysine (K)-specific demethylase 3A                                     | 4,087443           |
| KHSRP                  | KH-type splicing regulatory protein                                    | 2,1932192          |
| KIAA0319L              | KIAA0319-like                                                          | 2,176358           |
| KIAA1033               | KIAA1033                                                               | 8,916526           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                     | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| KIF15                  | kinesin family member 15                                             | 5,511643           |
| KLHL35                 | kelch-like family member 35                                          | 3,85076            |
| KMT2B                  | lysine (K)-specific methyltransferase 2B                             | 14,202547          |
| KPNA3                  | karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)                               | 5,918098           |
| LARP4B                 | La ribonucleoprotein domain family, member 4B                        | 3,0089657          |
| LARP7                  | La ribonucleoprotein domain family, member 7                         | 4,537049           |
| LAT2                   | linker for activation of T cells family, member 2                    | 5,540333           |
| LCP1                   | lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)                           | 7,2573013          |
| LHPP                   | phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase   | 20,72843           |
| LINC00493              | long intergenic non-protein coding RNA 493                           | 3,041896           |
| LINC01000              | long intergenic non-protein coding RNA 1000                          | 4,3929644          |
| LINC01137              | long intergenic non-protein coding RNA 1137                          | 2,4403005          |
| LMBR1                  | limb development membrane protein 1                                  | 2,3587644          |
| LMNB2                  | lamin B2                                                             | 12,37636           |
| lnc-AKIRIN1-1          | lnc-AKIRIN1-1:2                                                      | 84,146576          |
| lnc-MRPL14-1           | lnc-MRPL14-1:1                                                       | 2,5178168          |
| lnc-SHCBP1L-1          | lnc-SHCBP1L-1:1                                                      | 3,807783           |
| LOC100134091           | protein FRG1B-like                                                   | 3,1325912          |
| LOC441666              | zinc finger protein 91 pseudogene                                    | 5,2630367          |
| LOC442132              | golgin A6 family-like 1 pseudogene                                   | 4,249968           |
| LOC642426              | uncharacterized LOC642426                                            | 2,2660835          |
| LOC642852              | uncharacterized LOC642852                                            | 6,0692215          |
| LOC727751              | golgin A2 pseudogene                                                 | 2,5246017          |
| LOC84214               | uncharacterized LOC84214                                             | 5,733664           |
| LRRC40                 | leucine rich repeat containing 40                                    | 3,591432           |
| LRTOMT                 | leucine rich transmembrane and O-methyltransferase domain containing | 2,509688           |
| LYRM1                  | LYR motif containing 1                                               | 12,449679          |
| MAP2K2                 | mitogen-activated protein kinase kinase 2                            | 3,3257732          |
| MAP4                   | microtubule-associated protein 4                                     | 3,2321205          |
| MAT2A                  | methionine adenosyltransferase II, alpha                             | 3,8430727          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|
| MAVS                   | mitochondrial antiviral signaling protein                       | 29,382475          |
| MBOAT7                 | membrane bound O-acyltransferase domain containing 7            | 2,1698892          |
| MDH1B                  | malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)                          | 4,5384703          |
| MDP1                   | magnesium-dependent phosphatase 1                               | 3,9028785          |
| MED27                  | mediator complex subunit 27                                     | 2,29912            |
| MED7                   | mediator complex subunit 7                                      | 9,181641           |
| METTL1                 | methyltransferase like 1                                        | 2,2337425          |
| MFSD12                 | major facilitator superfamily domain containing 12              | 13,834703          |
| MFSD5                  | major facilitator superfamily domain containing 5               | 4,781039           |
| MIB2                   | mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 2                          | 5,924754           |
| MITD1                  | MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1 | 6,180098           |
| MLH1                   | mutL homolog 1                                                  | 4,522529           |
| MMD                    | monocyte to macrophage differentiation-associated               | 2,5595908          |
| MOCS1                  | molybdenum cofactor synthesis 1                                 | 8,46817            |
| MORC2-AS1              | MORC2 antisense RNA 1                                           | 17,061926          |
| MPZL2                  | myelin protein zero-like 2                                      | 8,925298           |
| MRPL37                 | mitochondrial ribosomal protein L37                             | 2,3578682          |
| MRPL44                 | mitochondrial ribosomal protein L44                             | 7,93226            |
| MRPL9                  | mitochondrial ribosomal protein L9                              | 2,9218144          |
| MRPS14                 | mitochondrial ribosomal protein S14                             | 2,1558409          |
| MTFR1                  | mitochondrial fission regulator 1                               | 2,7115386          |
| MTMR14                 | myotubularin related protein 14                                 | 2,502695           |
| MYADM                  | myeloid-associated differentiation marker                       | 2,7544975          |
| MYBL1                  | v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1        | 6,6773047          |
| MYCBP2                 | MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase              | 4,0389543          |
| MYH9                   | myosin, heavy chain 9, non-muscle                               | 3,0029838          |
| NARF                   | nuclear prelamin A recognition factor                           | 4,620753           |
| NBPF14                 | neuroblastoma breakpoint family, member 14                      | 12,365774          |
| NCBP1                  | nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa                    | 4,2374578          |
| NDC1                   | NDC1 transmembrane nucleoporin                                  | 3,669731           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                    | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| NDUF6F6                | NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 6                                        | 2,2638354          |
| NDUFC2                 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa                                   | 5,382214           |
| NECAP1                 | NECAP endocytosis associated 1                                                                      | 2,2222195          |
| NEEDD4L                | neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase | 7,033475           |
| NELFB                  | negative elongation factor complex member B                                                         | 4,263793           |
| NIN                    | ninein (GSK3B interacting protein)                                                                  | 9,354307           |
| NIPA2                  | non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2                                                   | 2,0466022          |
| NIPBL                  | Nipped-B homolog (Drosophila)                                                                       | 4,342335           |
| NKTR                   | natural killer cell triggering receptor                                                             | 15,9250345         |
| NMNAT1                 | nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1                                                       | 4,7088847          |
| NMT2                   | N-myristoyltransferase 2                                                                            | 5,155075           |
| NOD1                   | nucleotide-binding oligomerization domain containing 1                                              | 4,897944           |
| NOMO1                  | NODAL modulator 1                                                                                   | 4,418885           |
| NPEPPS                 | aminopeptidase puromycin sensitive                                                                  | 6,7783666          |
| NR3C1                  | nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)                           | 4,7795696          |
| NRSN2                  | neurensin 2                                                                                         | 6,6220407          |
| NUDC                   | nudC nuclear distribution protein                                                                   | 2,872371           |
| NUDCD2                 | NudC domain containing 2                                                                            | 4,338339           |
| NUDCD3                 | NudC domain containing 3                                                                            | 2,870302           |
| NUP160                 | nucleoporin 160kDa                                                                                  | 12,273652          |
| NUP85                  | nucleoporin 85kDa                                                                                   | 5,9925437          |
| NYNRIN                 | NYN domain and retroviral integrase containing                                                      | 2,8593419          |
| ODC1                   | ornithine decarboxylase 1                                                                           | 5,845035           |
| OPA3                   | optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia)                           | 3,3547835          |
| OR7E14P                | olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 14 pseudogene                                     | 5,395371           |
| OSBPL11                | oxysterol binding protein-like 11                                                                   | 7,7857804          |
| PANK3                  | pantothenate kinase 3                                                                               | 2,7834404          |
| PAQR6                  | progesterone and adipoQ receptor family member VI                                                   | 4,3082256          |
| PARL                   | presenilin associated, rhomboid-like                                                                | 3,1546204          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
|                        | pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 |                    |
| PCBD1                  | alpha                                                                                         | 2,2201853          |
| PCBP1                  | poly(rC) binding protein 1                                                                    | 3,7581675          |
| PCMT1                  | protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase                                      | 3,997218           |
| PCYT2                  | phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine                                                  | 7,091158           |
| PDIA5                  | protein disulfide isomerase family A, member 5                                                | 2,2786758          |
| PDPR                   | pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit                                         | 40,100616          |
| PER2                   | period circadian clock 2                                                                      | 5,866834           |
| PHACTR4                | phosphatase and actin regulator 4                                                             | 3,1410263          |
| PHAX                   | phosphorylated adaptor for RNA export                                                         | 179,3395           |
| PIN1                   | peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1                                        | 3,2653384          |
| PLCB4                  | phospholipase C, beta 4                                                                       | 2,2143145          |
| PLD6                   | phospholipase D family, member 6                                                              | 5,316375           |
| PLEK2                  | pleckstrin 2                                                                                  | 4,7421665          |
| PLGRKT                 | plasminogen receptor, C-terminal lysine transmembrane protein                                 | 2,2410977          |
| PLOD2                  | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2                                            | 3,0310893          |
| PLSCR3                 | phospholipid scramblase 3                                                                     | 2,2165375          |
| PLXNB3                 | plexin B3                                                                                     | 9,632498           |
| PMAIP1                 | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1                                             | 2,001169           |
| PMS1                   | PMS1 postmeiotic segregation increased 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )                             | 3,199927           |
| POLA2                  | polymerase (DNA directed), alpha 2, accessory subunit                                         | 5,308779           |
| POTEF                  | POTE ankyrin domain family, member F                                                          | 2,088012           |
| PP7080                 | uncharacterized LOC25845                                                                      | 2,2622213          |
| PPM1G                  | protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1G                         | 2,0903375          |
| PPP2R5B                | protein phosphatase 2, regulatory subunit B', beta                                            | 4,570877           |
| PPP3CA                 | protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme                                       | 6,755158           |
| PQLC3                  | PQ loop repeat containing 3                                                                   | 3,1389663          |
| PREX1                  | phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1                      | 3,2672448          |
| PRKXP1                 | protein kinase, X-linked, pseudogene 1                                                        | 6,862822           |
| PRR14                  | proline rich 14                                                                               | 11,095076          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| PRR5                   | proline rich 5 (renal)                                                           | 3,3996272          |
| PRRG3                  | proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 3 (transmembrane)                      | 4,7942758          |
| PSMA6                  | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6                           | 3,0850334          |
| PSMD1                  | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1                       | 3,2180703          |
| PTBP3                  | polypyrimidine tract binding protein 3                                           | 2,700252           |
| PTPRJ                  | protein tyrosine phosphatase, receptor type, J                                   | 9,726045           |
| PUS1                   | pseudouridylate synthase 1                                                       | 3,5620408          |
| RAB21                  | RAB21, member RAS oncogene family                                                | 4,593961           |
| RAB26                  | RAB26, member RAS oncogene family                                                | 10,989472          |
| RABEP2                 | rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2                                  | 2,4751453          |
| RAD51D                 | RAD51 paralog D                                                                  | 8,88894            |
| RAD9A                  | RAD9 homolog A (S. pombe)                                                        | 3,0131836          |
| RAE1                   | ribonucleic acid export 1                                                        | 2,5842185          |
| RALA                   | v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)                     | 3,9905252          |
| RANGAP1                | Ran GTPase activating protein 1                                                  | 2,0652332          |
| RAPGEF2                | Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2                                   | 2,3149214          |
| RBM10                  | RNA binding motif protein 10                                                     | 2,4803293          |
| RBM17                  | RNA binding motif protein 17                                                     | 7,8170266          |
| RBM22                  | RNA binding motif protein 22                                                     | 13,150335          |
| RBM39                  | RNA binding motif protein 39                                                     | 3,0128589          |
| RBMX                   | RNA binding motif protein, X-linked                                              | 12,800631          |
| REXO2                  | RNA exonuclease 2                                                                | 3,8344007          |
| RGS4                   | regulator of G-protein signaling 4                                               | 2,1463776          |
| RIC8A                  | RIC8 guanine nucleotide exchange factor A                                        | 2,5982232          |
| RIPK4                  | receptor-interacting serine-threonine kinase 4                                   | 34,273823          |
| RITA1                  | RBPJ interacting and tubulin associated 1                                        | 28,279858          |
| RLTPR                  | RGD motif, leucine rich repeats, tropomodulin domain and proline-rich containing | 36,290955          |
| RMDN3                  | regulator of microtubule dynamics 3                                              | 7,12068            |
| RNF24                  | ring finger protein 24                                                           | 18,757019          |
| RNH1                   | ribonuclease/angiogenin inhibitor 1                                              | 3,9486852          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                            | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| RPAIN                  | RPA interacting protein                                                                     | 2,2186954          |
| RPL22                  | ribosomal protein L22                                                                       | 3,377963           |
| RPL24                  | ribosomal protein L24                                                                       | 8,027987           |
| RPS17                  | ribosomal protein S17                                                                       | 2,0169997          |
| RPTOR                  | regulatory associated protein of MTOR, complex 1                                            | 3,1371596          |
| RRAGD                  | Ras-related GTP binding D                                                                   | 10,887351          |
| RSRC1                  | arginine/serine-rich coiled-coil 1                                                          | 4,2618628          |
| RSRC2                  | arginine/serine-rich coiled-coil 2                                                          | 3,2136455          |
| RTN3                   | reticulon 3                                                                                 | 3,7927518          |
| RXRA                   | retinoid X receptor, alpha                                                                  | 2,2301764          |
| S1PR3                  | sphingosine-1-phosphate receptor 3                                                          | 2,9137444          |
| SAP30L                 | SAP30-like                                                                                  | 9,638142           |
| SAPCD2                 | suppressor APC domain containing 2                                                          | 2,2167559          |
| SART3                  | squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3                                     | 9,240868           |
| SCO1                   | SCO1 cytochrome c oxidase assembly protein                                                  | 6,605855           |
| SDHAF1                 | succinate dehydrogenase complex assembly factor 1                                           | 4,4464874          |
| SEH1L                  | SEH1-like ( <i>S. cerevisiae</i> )                                                          | 5,2228994          |
| SERINC3                | serine incorporator 3                                                                       | 2,0496066          |
| SETDB1                 | SET domain, bifurcated 1                                                                    | 4,8466086          |
| SETX                   | senataxin                                                                                   | 2,9863741          |
| SFN                    | stratifin                                                                                   | 3,0558329          |
| SGOL2                  | shugoshin-like 2 ( <i>S. pombe</i> )                                                        | 2,90649            |
| SH2D4A                 | SH2 domain containing 4A                                                                    | 6,0160246          |
| SH3KBP1                | SH3-domain kinase binding protein 1                                                         | 9,883897           |
| SIRPB1                 | signal-regulatory protein beta 1                                                            | 3,0147476          |
| SKAP2                  | src kinase associated phosphoprotein 2                                                      | 6,9871736          |
| SKIV2L                 | superkiller viralicidic activity 2-like ( <i>S. cerevisiae</i> )                            | 14,223301          |
| SLC25A6                | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6 | 2,396147           |
| SLC35F2                | solute carrier family 35, member F2                                                         | 3,3635168          |
| SLC43A1                | solute carrier family 43 (amino acid system L transporter), member 1                        | 5,5011435          |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                         | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| SLC44A1                | solute carrier family 44 (choline transporter), member 1                 | 4,40627            |
| SLC44A2                | solute carrier family 44 (choline transporter), member 2                 | 2,024557           |
| SLC6A14                | solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14              | 3,7849026          |
| SLU7                   | SLU7 splicing factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                    | 5,8118086          |
| SMEK2                  | SMEK homolog 2, suppressor of mek1 ( <i>Dictyostelium</i> )              | 6,2929463          |
| SMIM15                 | small integral membrane protein 15                                       | 8,776385           |
| SMIM3                  | small integral membrane protein 3                                        | 13,252993          |
| SMYD2                  | SET and MYND domain containing 2                                         | 3,7042835          |
| SNHG15                 | small nucleolar RNA host gene 15 (non-protein coding)                    | 2,2488694          |
| SNHG9                  | small nucleolar RNA host gene 9 (non-protein coding)                     | 3,347168           |
| SNORA73B               | small nucleolar RNA, H/ACA box 73B                                       | 4,3658433          |
| SNRNP200               | small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)                              | 2,2046194          |
| SNRPG                  | small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G                            | 2,177473           |
| SNW1                   | SNW domain containing 1                                                  | 3,110904           |
| SNX27                  | sorting nexin family member 27                                           | 3,9467385          |
| SNX5                   | sorting nexin 5                                                          | 5,6110535          |
| SOCS4                  | suppressor of cytokine signaling 4                                       | 7,0577445          |
| SP1                    | Sp1 transcription factor                                                 | 7,391192           |
| SPOCK2                 | sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2 | 9,824184           |
| SPOPL                  | speckle-type POZ protein-like                                            | 3,9737864          |
| SPPL2A                 | signal peptide peptidase like 2A                                         | 2,6099293          |
| SPPL3                  | signal peptide peptidase like 3                                          | 6,729195           |
| SRRM2                  | serine/arginine repetitive matrix 2                                      | 2,0165424          |
| SRSF11                 | serine/arginine-rich splicing factor 11                                  | 3,6047382          |
| SRSF4                  | serine/arginine-rich splicing factor 4                                   | 3,0403886          |
| SRSF9                  | serine/arginine-rich splicing factor 9                                   | 2,2760541          |
| SSBP4                  | single stranded DNA binding protein 4                                    | 4,8530188          |
| STAG2                  | stromal antigen 2                                                        | 3,8148928          |
| STBD1                  | starch binding domain 1                                                  | 2,6162577          |
| STK25                  | serine/threonine kinase 25                                               | 2,0496404          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| STK26                  | serine/threonine protein kinase 26                                               | 2,7437158          |
| STK4                   | serine/threonine kinase 4                                                        | 8,097762           |
| STRAP                  | serine/threonine kinase receptor associated protein                              | 2,412814           |
| STX12                  | syntaxin 12                                                                      | 9,811886           |
| STX4                   | syntaxin 4                                                                       | 4,9971647          |
| SUOX                   | sulfite oxidase                                                                  | 4,0975184          |
| SUPT6H                 | suppressor of Ty 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                              | 3,2769208          |
| SYNE1                  | spectrin repeat containing, nuclear envelope 1                                   | 5,0075874          |
| TAF12                  | TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa | 2,674027           |
| TARBP2                 | TAR (HIV-1) RNA binding protein 2                                                | 4,656592           |
| TCEA1                  | transcription elongation factor A (SII), 1                                       | 2,1532059          |
| THAP6                  | THAP domain containing 6                                                         | 6,4521403          |
| THTPA                  | thiamine triphosphatase                                                          | 4,135742           |
| TIMM17B                | translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast)                 | 9,678005           |
| TM2D1                  | TM2 domain containing 1                                                          | 8,877234           |
| TMEM120A               | transmembrane protein 120A                                                       | 4,2896166          |
| TMEM135                | transmembrane protein 135                                                        | 6,4289823          |
| TMEM141                | transmembrane protein 141                                                        | 2,3841817          |
| TMEM160                | transmembrane protein 160                                                        | 2,066077           |
| TMEM194A               | transmembrane protein 194A                                                       | 2,3539965          |
| TMEM201                | transmembrane protein 201                                                        | 4,835519           |
| TMEM203                | transmembrane protein 203                                                        | 4,95925            |
| TMEM223                | transmembrane protein 223                                                        | 2,2982836          |
| TMEM62                 | transmembrane protein 62                                                         | 3,2100892          |
| TMEM79                 | transmembrane protein 79                                                         | 2,2787473          |
| TNXB                   | tenascin XB                                                                      | 4,8716564          |
| TPD52L1                | tumor protein D52-like 1                                                         | 2,0275712          |
| TRA2B                  | transformer 2 beta homolog ( <i>Drosophila</i> )                                 | 2,1831403          |
| TRAF4                  | TNF receptor-associated factor 4                                                 | 12,974371          |
| TRIAP1                 | TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1                                          | 4,3327             |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                  | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| TRIM8                  | tripartite motif containing 8                                     | 2,3161023          |
| TRO                    | trophinin                                                         | 2,0982807          |
| TSC22D1                | TSC22 domain family, member 1                                     | 2,5170348          |
| TSPAN3                 | tetraspanin 3                                                     | 11,209719          |
| TTC38                  | tetratricopeptide repeat domain 38                                | 6,0640745          |
| TTLL1                  | tubulin tyrosine ligase-like family member 1                      | 2,1679394          |
| TTYH3                  | tweety family member 3                                            | 8,5305395          |
| TUBA4A                 | tubulin, alpha 4a                                                 | 6,4620624          |
| UBP1                   | upstream binding protein 1 (LBP-1a)                               | 8,813894           |
| UBR1                   | ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1                | 3810,9653          |
| UBR7                   | ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)     | 2,6296082          |
| UMAD1                  | UBAP1-MVB12-associated (UMA) domain containing 1                  | 5,290721           |
| UNC119B                | unc-119 homolog B (C. elegans)                                    | 2,3542097          |
| UPRT                   | uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog (S. cerevisiae)   | 2,5015843          |
| UQCRCQ                 | ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa | 2,2189858          |
| UROD                   | uroporphyrinogen decarboxylase                                    | 2,4377258          |
| USP18                  | ubiquitin specific peptidase 18                                   | 9,202784           |
| USP32                  | ubiquitin specific peptidase 32                                   | 4,1365886          |
| VAV3                   | vav 3 guanine nucleotide exchange factor                          | 2,9269874          |
| VEGFA                  | vascular endothelial growth factor A                              | 2,5520277          |
| VIMP                   | VCP-interacting membrane protein                                  | 3,7804353          |
| VPS29                  | vacuolar protein sorting 29 homolog (S. cerevisiae)               | 2,1600938          |
| WDR33                  | WD repeat domain 33                                               | 3,747846           |
| WDR55                  | WD repeat domain 55                                               | 2,688239           |
| WNK2                   | WNK lysine deficient protein kinase 2                             | 4,0575128          |
| XIAP                   | X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase      | 3,0394008          |
| XXYLT1                 | xyloside xylosyltransferase 1                                     | 2,9981046          |
| ZASP                   | ZO-2 associated speckle protein                                   | 2,5493133          |
| ZBTB43                 | zinc finger and BTB domain containing 43                          | 2,5296717          |
| ZFAND5                 | zinc finger, AN1-type domain 5                                    | 2,6427877          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                          | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------|
| ZNF131                 | zinc finger protein 131                                   | 2,1868203          |
| ZNF219                 | zinc finger protein 219                                   | 6,292853           |
| ZNF22                  | zinc finger protein 22                                    | 5,9472303          |
| ZNF274                 | zinc finger protein 274                                   | 2,5048566          |
| ZNF574                 | zinc finger protein 574                                   | 4,9606647          |
| ZNF627                 | zinc finger protein 627                                   | 2,5593843          |
| ZNF692                 | zinc finger protein 692                                   | 13,702952          |
| ZNF746                 | zinc finger protein 746                                   | 2,8360584          |
| ZNF75A                 | zinc finger protein 75a                                   | 11,913692          |
| ZNF770                 | zinc finger protein 770                                   | 5,802931           |
| AAGAB                  | alpha- and gamma-adaptin binding protein                  | -5,2929196         |
| ABAT                   | 4-aminobutyrate aminotransferase                          | -2,6859176         |
| ABCC5                  | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5   | -2,7606177         |
| ABCF1                  | ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1      | -2,5989988         |
| ACAA1                  | acetyl-CoA acyltransferase 1                              | -2,1390717         |
| ADAM15                 | ADAM metallopeptidase domain 15                           | -6,6891513         |
| ADAMTS7                | ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7 | -2,523819          |
| ADAMTSL5               | ADAMTS-like 5                                             | -8,859466          |
| ADI1                   | acireductone dioxygenase 1                                | -2,2213926         |
| AGAP3                  | ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3 | -2,1012518         |
| AGPS                   | alkylglycerone phosphate synthase                         | -2,9883685         |
| AHCTF1                 | AT hook containing transcription factor 1                 | -9,786238          |
| AIFM1                  | apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1    | -2,1129854         |
| AKAP11                 | A kinase (PRKA) anchor protein 11                         | -7,664225          |
| AKAP17A                | A kinase (PRKA) anchor protein 17A                        | -2,8544743         |
| AMBRA1                 | autophagy/beclin-1 regulator 1                            | -3,2166157         |
| ANXA7                  | annexin A7                                                | -2,393731          |
| AP3D1                  | adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit        | -2,0302804         |
| AP3S2                  | adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit        | -2,2700243         |
| APITD1                 | apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1                    | -2,3169975         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                  | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ARFRP1                 | ADP-ribosylation factor related protein 1                         | -4,7693677         |
| ARHGEF10L              | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like              | -2,5156815         |
| ARL4C                  | ADP-ribosylation factor-like 4C                                   | -3,1194396         |
| ARL8B                  | ADP-ribosylation factor-like 8B                                   | -2,9199753         |
| ATXN1L                 | ataxin 1-like                                                     | -2,1003351         |
| AURKA                  | aurora kinase A                                                   | -4,752177          |
| BATF                   | basic leucine zipper transcription factor, ATF-like               | -5,4127016         |
| BCR                    | breakpoint cluster region                                         | -2,301143          |
| BDH1                   | 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1                           | -2,8002028         |
| BLOC1S6                | biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 6, pallidin | -2,3002517         |
| C1D                    | C1D nuclear receptor corepressor                                  | -2,0921042         |
| C1QTNF9B-AS1           | C1QTNF9B antisense RNA 1                                          | -3,5470476         |
| CCDC22                 | coiled-coil domain containing 22                                  | -7,490013          |
| CCDC94                 | coiled-coil domain containing 94                                  | -3,3762298         |
| CCSAP                  | centriole, cilia and spindle-associated protein                   | -10,56006          |
| CD72                   | CD72 molecule                                                     | -6,572858          |
| CD79A                  | CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha                   | -2,047069          |
| CDK4                   | cyclin-dependent kinase 4                                         | -5,59272           |
| CEP131                 | centrosomal protein 131kDa                                        | -6,007832          |
| CHORDC1                | cysteine and histidine-rich domain (CHORD) containing 1           | -3,023666          |
| CHST13                 | carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13                  | -4,7996078         |
| CLEC4M                 | C-type lectin domain family 4, member M                           | -5,404366          |
| CLMN                   | calmin (calponin-like, transmembrane)                             | -2,7387533         |
| CLSTN1                 | calsyntenin 1                                                     | -2,020874          |
| COMMD1                 | copper metabolism (Murr1) domain containing 1                     | -3,0208979         |
| COMMD7                 | COMM domain containing 7                                          | -18,157776         |
| COPRS                  | coordinator of PRMT5, differentiation stimulator                  | -2,0821679         |
| CORO7                  | coronin 7                                                         | -3,4307487         |
| COX6B1                 | cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous)       | -2,6843467         |
| CRELD2                 | cysteine-rich with EGF-like domains 2                             | -11,835448         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                               | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------|
| CSE1L                  | CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)                     | -20,1584           |
| CSNK1G2                | casein kinase 1, gamma 2                                       | -4,2260714         |
| CSNK2B                 | casein kinase 2, beta polypeptide                              | -2,9042604         |
| CSTF1                  | cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1, 50kDa      | -3,2333717         |
| CUTC                   | cutC copper transporter                                        | -2,178566          |
| CWC15                  | CWC15 spliceosome-associated protein                           | -6,3061533         |
| CYC1                   | cytochrome c-1                                                 | -4,5551786         |
| CYP2W1                 | cytochrome P450, family 2, subfamily W, polypeptide 1          | -8,080125          |
| D2HGDH                 | D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase                             | -4,028193          |
| DBNDD1                 | dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1 | -4,2745943         |
| DCAF4                  | DDB1 and CUL4 associated factor 4                              | -3,1540377         |
| DESI1                  | desumoylating isopeptidase 1                                   | -6,1190047         |
| DGKZ                   | diacylglycerol kinase, zeta                                    | -2,874068          |
| DHCR24                 | 24-dehydrocholesterol reductase                                | -3,7039993         |
| DHX15                  | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box helicase 15                         | -2,0420752         |
| DMKN                   | dermokine                                                      | -3,115167          |
| DOLPP1                 | dolichyldiphosphatase 1                                        | -3,782434          |
| DPP3                   | dipeptidyl-peptidase 3                                         | -2,2123532         |
| DSP                    | desmoplakin                                                    | -2,1804647         |
| DTD1                   | D-tyrosyl-tRNA deacylase 1                                     | -2,1552522         |
| ECE2                   | endothelin converting enzyme 2                                 | -3,566243          |
| EEF2                   | eukaryotic translation elongation factor 2                     | -2,1659927         |
| EFCAB14                | EF-hand calcium binding domain 14                              | -4,8413205         |
| EIF4H                  | eukaryotic translation initiation factor 4H                    | -2,930418          |
| ELF1                   | E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)            | -2,7750058         |
| EMID1                  | EMI domain containing 1                                        | -10,326643         |
| EMP2                   | epithelial membrane protein 2                                  | -2,3751714         |
| ENAH                   | enabled homolog (Drosophila)                                   | -6,1335125         |
| ENDOD1                 | endonuclease domain containing 1                               | -4,5174212         |
| ENSA                   | endosulfine alpha                                              | -5,188027          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                   | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------|
| EPHB3                  | EPH receptor B3                                                    | -3,8891091         |
| EPHB4                  | EPH receptor B4                                                    | -6,7226925         |
| EPN2                   | epsin 2                                                            | -2,1659799         |
| ETV2                   | ets variant 2                                                      | -6,643248          |
| EVI5L                  | ecotropic viral integration site 5-like                            | -2,0410402         |
| FAM129B                | family with sequence similarity 129, member B                      | -2,1715121         |
| FAM134B                | family with sequence similarity 134, member B                      | -7,256479          |
| FAM225A                | family with sequence similarity 225, member A (non-protein coding) | -6,421997          |
| FAM96B                 | family with sequence similarity 96, member B                       | -2,1001034         |
| FAM98C                 | family with sequence similarity 98, member C                       | -4,89264           |
| FASN                   | fatty acid synthase                                                | -3,5025368         |
| FBL                    | fibrillarlin                                                       | -3,9281092         |
| FBRSL1                 | fibrosin-like 1                                                    | -2,6955116         |
| FBXO9                  | F-box protein 9                                                    | -2,336208          |
| FGF2                   | fibroblast growth factor 2 (basic)                                 | -9,736688          |
| FN3KRP                 | fructosamine 3 kinase related protein                              | -2,016681          |
| FOPNL                  | FGFR1OP N-terminal like                                            | -2,415851          |
| FOXRED2                | FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2                   | -2,3596628         |
| GALR3                  | galanin receptor 3                                                 | -2,1316738         |
| GATA6                  | GATA binding protein 6                                             | -3,1181202         |
| GFM2                   | G elongation factor, mitochondrial 2                               | -2,227495          |
| GFOD2                  | glucose-fructose oxidoreductase domain containing 2                | -6,766568          |
| GJD4                   | gap junction protein, delta 4, 40.1kDa                             | -2,1706517         |
| GLA                    | galactosidase, alpha                                               | -2,0062141         |
| GLI4                   | GLI family zinc finger 4                                           | -2,1852627         |
| GLMP                   | glycosylated lysosomal membrane protein                            | -2,5406945         |
| GLTSCR2                | glioma tumor suppressor candidate region gene 2                    | -2,1774802         |
| GNL3L                  | guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like         | -4,1167665         |
| GOLGA6L9               | golgin A6 family-like 9                                            | -2,129695          |
| GPC1                   | glypican 1                                                         | -2,9381418         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| GPSM1                  | G-protein signaling modulator 1                                  | -3,2848282         |
| GRB7                   | growth factor receptor-bound protein 7                           | -11,189248         |
| HIGD1A                 | HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1A                  | -8,090755          |
| HIP1R                  | huntingtin interacting protein 1 related                         | -3,0645595         |
| HIST1H2AH              | histone cluster 1, H2ah                                          | -2,4817002         |
| HIST1H2BD              | histone cluster 1, H2bd                                          | -2,392691          |
| HIST1H2BM              | histone cluster 1, H2bm                                          | -2,1833522         |
| HIST1H3B               | histone cluster 1, H3b                                           | -2,6193638         |
| HIST1H3G               | histone cluster 1, H3g                                           | -2,335098          |
| HLA-B                  | major histocompatibility complex, class I, B                     | -3,2252867         |
| HMGN3                  | high mobility group nucleosomal binding domain 3                 | -5,2988443         |
| HN1L                   | hematological and neurological expressed 1-like                  | -2,3294353         |
| HNRNPA1                | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1                       | -2,169152          |
| HNRNPF                 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F                        | -3,051739          |
| HNRNPLL                | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like                   | -4,230378          |
| HOXC9                  | homeobox C9                                                      | -4,9784536         |
| HR                     | hair growth associated                                           | -3,2468128         |
| HS6ST3                 | heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3                           | -2,1015387         |
| HSF1                   | heat shock transcription factor 1                                | -2,6436298         |
| HSPB11                 | heat shock protein family B (small), member 11                   | -2,285418          |
| HTATSF1                | HIV-1 Tat specific factor 1                                      | -2,4179807         |
| IER3IP1                | immediate early response 3 interacting protein 1                 | -2,1418803         |
| IFRD2                  | interferon-related developmental regulator 2                     | -2,2860188         |
| IFT43                  | intraflagellar transport 43                                      | -2,3908396         |
| IMPDH2                 | IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2                   | -2,4669912         |
| INTS10                 | integrator complex subunit 10                                    | -5,293075          |
| IPO7                   | importin 7                                                       | -3,0450368         |
| ISCU                   | iron-sulfur cluster assembly enzyme                              | -3,195842          |
| ITFG1                  | integrin alpha FG-GAP repeat containing 1                        | -3,2470467         |
| ITPRIPL2               | inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2 | -2,7530239         |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                         | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| KCNH3                  | potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 3       | -2,084049          |
| KCTD3                  | potassium channel tetramerization domain containing 3                    | -2,498637          |
| KDM5B                  | lysine (K)-specific demethylase 5B                                       | -2,131058          |
| KIF13B                 | kinesin family member 13B                                                | -91,965126         |
| KIF16B                 | kinesin family member 16B                                                | -3,3035116         |
| KLC1                   | kinesin light chain 1                                                    | -4,786741          |
| KRT10                  | keratin 10, type I                                                       | -2,7751315         |
| KRTCAP2                | keratinocyte associated protein 2                                        | -2,3379166         |
| KTN1                   | kinectin 1 (kinesin receptor)                                            | -3,069541          |
| LAMA5                  | laminin, alpha 5                                                         | -4,09859           |
| LAPTM4B                | lysosomal protein transmembrane 4 beta                                   | -2,3483982         |
| LEMD2                  | LEM domain containing 2                                                  | -4,696472          |
| LETM1                  | leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1                | -8,062406          |
| LGALS1                 | lectin, galactoside-binding, soluble, 1                                  | -2,6342762         |
| LGALS8                 | lectin, galactoside-binding, soluble, 8                                  | -3,5319982         |
| LINC00842              | long intergenic non-protein coding RNA 842                               | -7,2369986         |
| LINC00923              | long intergenic non-protein coding RNA 923                               | -2,2386606         |
| LINC00999              | long intergenic non-protein coding RNA 999                               | -5,2218347         |
| LMNA                   | lamin A/C                                                                | -4,571909          |
| lnc-THNSL1-2           | lnc-THNSL1-2:1                                                           | -2,3165953         |
| lnc-USP35-1            | lnc-USP35-1:6                                                            | -3,406244          |
| LOC100128398           | uncharacterized LOC100128398                                             | -2,3416495         |
| LOC100131262           | uncharacterized LOC100131262                                             | -6,3869114         |
| LOC100506639           | uncharacterized LOC100506639                                             | -6,6706543         |
| LOC220729              | succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) pseudogene | -3,0197678         |
| LOC400558              | uncharacterized LOC400558                                                | -4,9332614         |
| LOC494150              | prohibitin pseudogene                                                    | -5,635226          |
| LOC646626              | uncharacterized LOC646626                                                | -2,4349234         |
| LPCAT3                 | lysophosphatidylcholine acyltransferase 3                                | -2,670983          |
| LTBP4                  | latent transforming growth factor beta binding protein 4                 | -3,5154195         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                               | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| MAGIX                  | MAGI family member, X-linked                                                                   | -4,5269914         |
| MAU2                   | MAU2 sister chromatid cohesion factor                                                          | -2,045707          |
| MAX                    | MYC associated factor X                                                                        | -2,120896          |
| MCCC1                  | methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha)                                                      | -2,0774865         |
| MEA1                   | male-enhanced antigen 1                                                                        | -3,1565259         |
| MEGF8                  | multiple EGF-like-domains 8                                                                    | -4,7108526         |
| MEN1                   | multiple endocrine neoplasia I                                                                 | -2,4524145         |
| METTTL5                | methyltransferase like 5                                                                       | -4,0343995         |
| MFSD3                  | major facilitator superfamily domain containing 3                                              | -2,0848205         |
| MIDN                   | midnolin                                                                                       | -10,793899         |
| MISP                   | mitotic spindle positioning                                                                    | -2,816114          |
| MKRN1                  | makorin ring finger protein 1                                                                  | -2,5742888         |
| MLLT6                  | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6 | -2,0465224         |
| MLXIP                  | MLX interacting protein                                                                        | -2,8017683         |
| MORF4L1                | mortality factor 4 like 1                                                                      | -2,6798363         |
| MPZL1                  | myelin protein zero-like 1                                                                     | -3,3658054         |
| MRPL11                 | mitochondrial ribosomal protein L11                                                            | -2,360939          |
| MRPL23                 | mitochondrial ribosomal protein L23                                                            | -88,15924          |
| MRRF                   | mitochondrial ribosome recycling factor                                                        | -4,163839          |
| MSX2P1                 | msh homeobox 2 pseudogene 1                                                                    | -2,6084547         |
| MT1HL1                 | metallothionein 1H-like 1                                                                      | -9,724997          |
| NAB2                   | NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)                                              | -3,111529          |
| NACC1                  | nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing                            | -3,6843805         |
| NBAS                   | neuroblastoma amplified sequence                                                               | -2,7418654         |
| NCAPH2                 | non-SMC condensin II complex, subunit H2                                                       | -2,1856527         |
| ND3                    | NADH dehydrogenase, subunit 3 (complex I)                                                      | -2,8107672         |
| NDRG1                  | N-myc downstream regulated 1                                                                   | -3,4077754         |
| NDUFA4                 | NDUFA4, mitochondrial complex associated                                                       | -14,3754225        |
| NDUFB5                 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa                                    | -2,2547612         |
| NDUFS2                 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase)              | -2,1225271         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                  | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| NECAP2                 | NECAP endocytosis associated 2                                    | -2,2205353         |
| NEDD1                  | neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1 | -3,1595058         |
| NEURL1B                | neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1B                         | -3,1149            |
| NIFK                   | nucleolar protein interacting with the FHA domain of MKI67        | -5,023698          |
| NIT2                   | nitrilase family, member 2                                        | -2,1393163         |
| NLN                    | neurolysin (metallopeptidase M3 family)                           | -6,376386          |
| NLRC3                  | NLR family, CARD domain containing 3                              | -2,40186           |
| NMRAL1                 | NmrA-like family domain containing 1                              | -3,9316032         |
| NOLC1                  | nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1                        | -6,374846          |
| NOP10                  | NOP10 ribonucleoprotein                                           | -2,8110738         |
| NOXA1                  | NADPH oxidase activator 1                                         | -2,1451428         |
| NPIP15                 | nuclear pore complex interacting protein family, member B15       | -13,618871         |
| NPIP5                  | nuclear pore complex interacting protein family, member B5        | -3,3224695         |
| NRD1                   | nardilysin (N-arginine dibasic convertase)                        | -2,0889218         |
| NRDE2                  | NRDE-2, necessary for RNA interference, domain containing         | -3,6909707         |
| NT5DC1                 | 5'-nucleotidase domain containing 1                               | -5,8805113         |
| NVL                    | nuclear VCP-like                                                  | -6,122587          |
| NXT1                   | nuclear transport factor 2-like export factor 1                   | -2,3087385         |
| OS9                    | osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin            | -3,2443798         |
| OST4                   | oligosaccharyltransferase 4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )      | -2,0051403         |
| OTOF                   | otoferlin                                                         | -3,641103          |
| OTUD5                  | OTU deubiquitinase 5                                              | -2,0247128         |
| PACSIN3                | protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3         | -6,0545473         |
| PCDHGA8                | protocadherin gamma subfamily A, 8                                | -38,153404         |
| PDCD5                  | programmed cell death 5                                           | -2,1940196         |
| PDDC1                  | Parkinson disease 7 domain containing 1                           | -3,7425764         |
| PDK2                   | pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2                          | -10,300134         |
| PFKFB2                 | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2             | -2,571652          |
| PGAM4                  | phosphoglycerate mutase family member 4                           | -5,0351377         |
| PGM3                   | phosphoglucomutase 3                                              | -15,594176         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                    | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| PHF1                   | PHD finger protein 1                                                                | -4,98603           |
| PHPT1                  | phosphohistidine phosphatase 1                                                      | -3,166122          |
| PIGO                   | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O                            | -2,2018077         |
| PIK3C2A                | phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha           | -2,9991708         |
| PKIB                   | protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta                           | -4,3565197         |
| PLA2G12A               | phospholipase A2, group XIIA                                                        | -2,7039852         |
| PLA2G4C                | phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)                        | -7,9805074         |
| PMS2L2                 | postmeiotic segregation increased 2-like 2 pseudogene                               | -130,75162         |
| POLR1C                 | polymerase (RNA) I polypeptide C, 30kDa                                             | -3,2844472         |
| POP5                   | processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )      | -2,1498437         |
| POR                    | P450 (cytochrome) oxidoreductase                                                    | -2,657064          |
| PPID                   | peptidylprolyl isomerase D                                                          | -2,4218807         |
| PPM1D                  | protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1D               | -2,069484          |
| PPP1R14A               | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A                           | -3,7316747         |
| PPP1R9B                | protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B                                        | -2,243625          |
| PPP4C                  | protein phosphatase 4, catalytic subunit                                            | -2,3925273         |
| PRDM2                  | PR domain containing 2, with ZNF domain                                             | -3,2588272         |
| PRDX1                  | peroxiredoxin 1                                                                     | -2,827128          |
| PRDX6                  | peroxiredoxin 6                                                                     | -2,1845057         |
| PREPL                  | prolyl endopeptidase-like                                                           | -4,2934446         |
| PSMA4                  | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4                              | -5,786049          |
| PSMA5                  | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5                              | -2,1566875         |
| PSMD14                 | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14                         | -4,3534408         |
| PSME3                  | proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)                | -2,7507126         |
| PTPLB                  | protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b | -2,5679467         |
| PTRF                   | polymerase I and transcript release factor                                          | -18,389963         |
| PUF60                  | poly-U binding splicing factor 60KDa                                                | -2,212468          |
| PWP1                   | PWP1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                                               | -2,4425197         |
| RAB10                  | RAB10, member RAS oncogene family                                                   | -2,2992651         |
| RAB20                  | RAB20, member RAS oncogene family                                                   | -2,3705363         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                            | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| RAB28                  | RAB28, member RAS oncogene family                                           | -2,6096222         |
| RAB44                  | RAB44, member RAS oncogene family                                           | -84,04012          |
| RAD51                  | RAD51 recombinase                                                           | -2,3379693         |
| RALGAPA1               | Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1 (catalytic)                  | -2,9545546         |
| RARS2                  | arginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial                                    | -18,907488         |
| RBBP8                  | retinoblastoma binding protein 8                                            | -3,4830153         |
| RBMS1                  | RNA binding motif, single stranded interacting protein 1                    | -3,3417778         |
| RER1                   | retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1                       | -5,7493443         |
| RNF11                  | ring finger protein 11                                                      | -2,3538067         |
| RNF111                 | ring finger protein 111                                                     | -2,4629753         |
| RNF135                 | ring finger protein 135                                                     | -2,2273464         |
| RNF41                  | ring finger protein 41, E3 ubiquitin protein ligase                         | -2,163884          |
| RNF44                  | ring finger protein 44                                                      | -4,1577454         |
| RNPS1                  | RNA binding protein S1, serine-rich domain                                  | -3,64213           |
| RPA2                   | replication protein A2, 32kDa                                               | -2,6584783         |
| RPA3                   | replication protein A3, 14kDa                                               | -4,265109          |
| RPL26L1                | ribosomal protein L26-like 1                                                | -2,2503588         |
| RPL32P3                | ribosomal protein L32 pseudogene 3                                          | -7,2251635         |
| RPL4                   | ribosomal protein L4                                                        | -2,1298976         |
| RPS6KA4                | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4                           | -3,0383885         |
| RPS6KA5                | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5                           | -2,4510694         |
| RRN3                   | RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) | -7,377829          |
| RRP1                   | ribosomal RNA processing 1                                                  | -2,251745          |
| S100A11                | S100 calcium binding protein A11                                            | -3,2847424         |
| SARS2                  | seryl-tRNA synthetase 2, mitochondrial                                      | -2,377655          |
| SCGB1D1                | secretoglobin, family 1D, member 1                                          | -2,3209417         |
| SDC4                   | syndecan 4                                                                  | -6,675085          |
| SERGEF                 | secretion regulating guanine nucleotide exchange factor                     | -174,75156         |
| SET                    | SET nuclear proto-oncogene                                                  | -2,1296358         |
| SF3B3                  | splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa                                       | -2,914147          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                                                                                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| SH2B2                  | SH2B adaptor protein 2                                                                                                                                                                           | -4,164173          |
| SIGIRR                 | single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain                                                                                                                               | -2,0679135         |
| SLC16A12               | solute carrier family 16, member 12                                                                                                                                                              | -2,0130117         |
| SLC25A18               | solute carrier family 25 (glutamate carrier), member 18                                                                                                                                          | -2,857187          |
| SLC25A22               | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22                                                                                                                           | -3,2252162         |
| SLC25A24               | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24                                                                                                                   | -2,0971735         |
| SLC35B1                | solute carrier family 35, member B1                                                                                                                                                              | -4,1253858         |
| SLC4A1AP               | solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, adaptor protein                                                                                                                             | -8,9818945         |
| SLC6A15                | solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15                                                                                                                              | -2,1677725         |
| SLC9A3R1               | solute carrier family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3 regulator 1<br>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member | -2,196032          |
| SMARCC2                | 2                                                                                                                                                                                                | -3,8706853         |
| SMC4                   | structural maintenance of chromosomes 4                                                                                                                                                          | -4,987433          |
| SMIM22                 | small integral membrane protein 22                                                                                                                                                               | -3,2217195         |
| SOD3                   | superoxide dismutase 3, extracellular                                                                                                                                                            | -2,4809318         |
| SOX21-AS1              | SOX21 antisense RNA 1 (head to head)                                                                                                                                                             | -2,7725003         |
| SPCS1                  | signal peptidase complex subunit 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                                                                                                                              | -2,0273795         |
| SPG21                  | spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome)                                                                                                                                       | -2,6612897         |
| SPIRE2                 | spire-type actin nucleation factor 2                                                                                                                                                             | -2,5681834         |
| ST6GAL1                | ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1                                                                                                                                             | -2,170146          |
| STARD10                | StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10                                                                                                                                         | -2,000148          |
| STRBP                  | spermatid perinuclear RNA binding protein                                                                                                                                                        | -3,9866824         |
| SUPT4H1                | suppressor of Ty 4 homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )                                                                                                                                            | -2,2964718         |
| SYNE4                  | spectrin repeat containing, nuclear envelope family member 4                                                                                                                                     | -2,8761415         |
| SYTL1                  | synaptotagmin-like 1                                                                                                                                                                             | -2,4679012         |
| TANGO2                 | transport and golgi organization 2 homolog ( <i>Drosophila</i> )                                                                                                                                 | -3,1517158         |
| TBC1D3B                | TBC1 domain family, member 3B                                                                                                                                                                    | -2,2157319         |
| TBC1D5                 | TBC1 domain family, member 5                                                                                                                                                                     | -2,3221002         |
| TBCA                   | tubulin folding cofactor A                                                                                                                                                                       | -3,2221498         |
| TBL2                   | transducin (beta)-like 2                                                                                                                                                                         | -2,1662004         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| TBX1                   | T-box 1                                                          | -3,299939          |
| TEFM                   | transcription elongation factor, mitochondrial                   | -5,024973          |
| TESK1                  | testis-specific kinase 1                                         | -2,4069612         |
| TGFB3                  | transforming growth factor, beta 3                               | -2,480872          |
| TIGD3                  | tigger transposable element derived 3                            | -2,4157162         |
| TIMM17A                | translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast) | -2,1082082         |
| TIPRL                  | TOR signaling pathway regulator                                  | -4,5445375         |
| TLCD1                  | TLC domain containing 1                                          | -2,6959822         |
| TMEM106B               | transmembrane protein 106B                                       | -2,6598141         |
| TMEM237                | transmembrane protein 237                                        | -11,029408         |
| TMEM55B                | transmembrane protein 55B                                        | -3,0094154         |
| TNFRSF12A              | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A           | -3,4043238         |
| TNFRSF25               | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25            | -2,1932902         |
| TNPO2                  | transportin 2                                                    | -4,048979          |
| TNRC6C                 | trinucleotide repeat containing 6C                               | -8,60447           |
| TPGS2                  | tubulin polyglutamylase complex subunit 2                        | -2,251337          |
| TROAP                  | trophinin associated protein                                     | -2,2389047         |
| TRPT1                  | tRNA phosphotransferase 1                                        | -2,223364          |
| TTPAL                  | tocopherol (alpha) transfer protein-like                         | -2,1282551         |
| TTY15                  | testis-specific transcript, Y-linked 15 (non-protein coding)     | -3,2672439         |
| TYMS                   | thymidylate synthetase                                           | -7,279812          |
| UBE2K                  | ubiquitin-conjugating enzyme E2K                                 | -2,2729464         |
| UBE4A                  | ubiquitination factor E4A                                        | -2,4285355         |
| USF2                   | upstream transcription factor 2, c-fos interacting               | -2,8678393         |
| USP38                  | ubiquitin specific peptidase 38                                  | -3,281614          |
| USP4                   | ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)                  | -2,7348032         |
| UXT                    | ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone                 | -2,0584552         |
| VEZF1                  | vascular endothelial zinc finger 1                               | -2,2478292         |
| VHL                    | von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase  | -2,0992386         |
| VMA21                  | VMA21 vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase homolog (S. cerevisiae)    | -2,0600207         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| VRK1                   | vaccinia related kinase 1                                                     | -3,7993526         |
| WDR61                  | WD repeat domain 61                                                           | -2,0310066         |
| WFIKKN1                | WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1 | -7,279066          |
| WSB2                   | WD repeat and SOCS box containing 2                                           | -2,6711102         |
| XKR4                   | XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 4                 | -3,133781          |
| XLOC_12_010916         |                                                                               | -2,790607          |
| XRCC1                  | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1        | -2,008037          |
| YBX1                   | Y box binding protein 1                                                       | -2,2267501         |
| ZBED3                  | zinc finger, BED-type containing 3                                            | -4,3848233         |
| ZCCHC8                 | zinc finger, CCHC domain containing 8                                         | -2,0990257         |
| ZDHHC5                 | zinc finger, DHHC-type containing 5                                           | -2,496923          |
| ZFAS1                  | ZNFX1 antisense RNA 1                                                         | -2,8324797         |
| ZMAT2                  | zinc finger, matrin-type 2                                                    | -2,1747773         |
| ZMIZ1                  | zinc finger, MIZ-type containing 1                                            | -2,302476          |
| ZNF311                 | zinc finger protein 311                                                       | -4,7902656         |
| ZNF322                 | zinc finger protein 322                                                       | -2,8805842         |
| ZNF326                 | zinc finger protein 326                                                       | -7,5505743         |
| ZNF350                 | zinc finger protein 350                                                       | -2,0041099         |
| ZNF625                 | zinc finger protein 625                                                       | -3,6266963         |
| ZNF763                 | zinc finger protein 763                                                       | -2,3394465         |
| ZNRD1                  | zinc ribbon domain containing 1                                               | -2,114458          |
| ZSWIM7                 | zinc finger, SWIM-type containing 7                                           | -2,104307          |



**Anexo B - Tabela dos genes diferencialmente expressos após silenciamento de *HOTAIR* na linhagem MDA-MB-468 (*fold change* 2,0)**

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                           | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------|
| AAGAB                  | alpha- and gamma-adaptin binding protein                   | 3,20106            |
| ABCF3                  | ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3       | -9,165335          |
| ABHD16A                | abhydrolase domain containing 16A                          | 2,3571527          |
| ABHD17B                | abhydrolase domain containing 17B                          | -2,6792464         |
| ABI2                   | abl-interactor 2                                           | -7,986381          |
| ABR                    | active BCR-related                                         | 2,465778           |
| ACACA                  | acetyl-CoA carboxylase alpha                               | -2,1790643         |
| ACAD9                  | acyl-CoA dehydrogenase family, member 9                    | -2,266393          |
| ACBD5                  | acyl-CoA binding domain containing 5                       | -5,9769645         |
| ACOXL                  | acyl-CoA oxidase-like                                      | 7,9216805          |
| ACSL5                  | acyl-CoA synthetase long-chain family member 5             | 2,533493           |
| ACY3                   | aspartoacylase (aminocyclase) 3                            | 2,0739174          |
| ACYP2                  | acylphosphatase 2, muscle type                             | -2,4502456         |
| ADAMTS13               | ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13 | 3,4598055          |
| ADAMTS7                | ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7  | 6,8557577          |
| ADAMTSL5               | ADAMTS-like 5                                              | 2,9025407          |
| ADSL                   | adenylosuccinate lyase                                     | 8,358681           |
| AES                    | amino-terminal enhancer of split                           | -2,0127149         |
| AGA                    | aspartylglucosaminidase                                    | -4,5231686         |
| AGPS                   | alkylglycerone phosphate synthase                          | -6,967007          |
| AGTRAP                 | angiotensin II receptor-associated protein                 | -2,2535036         |
| AHDC1                  | AT hook, DNA binding motif, containing 1                   | 6,9694943          |
| AHR                    | aryl hydrocarbon receptor                                  | -2,3169498         |
| AIF1L                  | allograft inflammatory factor 1-like                       | 2,4803522          |
| AIG1                   | androgen-induced 1                                         | -4,031139          |
| AK6                    | adenylate kinase 6                                         | 2,5504155          |
| AKTIP                  | AKT interacting protein                                    | -4,9179745         |
| ALDH3A2                | aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2                 | -2,6385844         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                        | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ALG11                  | ALG11, alpha-1,2-mannosyltransferase                                                    | -2,2841804         |
| ALG13                  | ALG13, UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit                                      | 2,0800066          |
| ALG14                  | ALG14, UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit                                      | 2,3263185          |
| ALG6                   | ALG6, alpha-1,3-glucosyltransferase                                                     | -2,5411766         |
| ALKBH3                 | alkB, alkylation repair homolog 3 (E. coli)                                             | -3,5202413         |
| AMBP                   | alpha-1-microglobulin/bikunin precursor                                                 | -2,764936          |
| ANAPC10                | anaphase promoting complex subunit 10                                                   | -2,9873831         |
| ANAPC13                | anaphase promoting complex subunit 13                                                   | -2,0811744         |
| ANAPC15                | anaphase promoting complex subunit 15                                                   | -5,0419655         |
| ANG                    | angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5                                             | 3,3766637          |
| ANTXR1                 | anthrax toxin receptor 1                                                                | 10,784898          |
| AP1S1                  | adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit                                      | -8,186453          |
| AP3B1                  | adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit                                       | -26,850582         |
| AP5S1                  | adaptor-related protein complex 5, sigma 1 subunit                                      | -13,299189         |
| APCDD1                 | adenomatosis polyposis coli down-regulated 1                                            | 2,6065717          |
| APITD1                 | apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1                                                  | 2,0453851          |
| APOM                   | apolipoprotein M                                                                        | -4,452508          |
| APPL1                  | adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1 | -2,0070577         |
| ARFGEF1                | ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1 (brefeldin A-inhibited)    | -7,699708          |
| ARG2                   | arginase 2                                                                              | 2,7146153          |
| ARHGAP18               | Rho GTPase activating protein 18                                                        | -2,707385          |
| ARHGEF4                | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4                                          | 37,31899           |
| ARHGEF7                | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7                                          | -4,775952          |
| ARHGEF9                | Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9                                        | 2,4310675          |
| ARL2                   | ADP-ribosylation factor-like 2                                                          | -2,6700633         |
| ARL4C                  | ADP-ribosylation factor-like 4C                                                         | -2,183667          |
| ARMC6                  | armadillo repeat containing 6                                                           | -2,753358          |
| ARPC1A                 | actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa                                    | 2,1961598          |
| ARPP19                 | cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa                                                    | -9,206714          |
| ARV1                   | ARV1 homolog (S. cerevisiae)                                                            | -6,0507565         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                            | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ASAP2                  | ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2                                      | -3,3980095         |
| ASB3                   | ankyrin repeat and SOCS box containing 3                                                    | -14,227359         |
| ASPH                   | aspartate beta-hydroxylase                                                                  | -5,7098355         |
| ATG101                 | autophagy related 101                                                                       | -2,247107          |
| ATG16L2                | autophagy related 16-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )                                        | -6,734909          |
| ATG9A                  | autophagy related 9A                                                                        | -2,7892578         |
| ATP13A2                | ATPase type 13A2                                                                            | -2,29002           |
| ATP1B3                 | ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 3 polypeptide                    | -2,179505          |
| ATP2B4                 | ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4                                    | -3,512092          |
| ATP2C1                 | ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, type 2C, member 1                                    | 2,349684           |
| ATP5C1                 | ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1    | -2,1465747         |
| ATP5E                  | ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit        | -2,5426881         |
| ATP5G2                 | ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C2 (subunit 9) | -2,4834104         |
| ATP6V1D                | ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D                          | -2,5504045         |
| ATP9A                  | ATPase, class II, type 9A                                                                   | 2,014902           |
| ATXN10                 | ataxin 10                                                                                   | -5,9370017         |
| AURKAPS1               | aurora kinase A pseudogene 1                                                                | 3,6224926          |
| B3GALNT1               | beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (globoside blood group)                        | 2,2068496          |
| B3GALT6                | UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase polypeptide 6                                | -2,9134402         |
| B3GAT3                 | beta-1,3-glucuronyltransferase 3                                                            | -3,9831238         |
| BAIAP2L1               | BAI1-associated protein 2-like 1                                                            | 3,0781329          |
| BAK1                   | BCL2-antagonist/killer 1                                                                    | -4,382811          |
| BCAP29                 | B-cell receptor-associated protein 29                                                       | -3,39687           |
| BCKDK                  | branched chain ketoacid dehydrogenase kinase                                                | -2,2576172         |
| BCL11A                 | B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)                                               | -4,04483           |
| BCL6                   | B-cell CLL/lymphoma 6                                                                       | -2,1546917         |
| BEND3                  | BEN domain containing 3                                                                     | 2,415681           |
| BIRC6                  | baculoviral IAP repeat containing 6                                                         | 2,0182493          |
| BLCAP                  | bladder cancer associated protein                                                           | 2,5436237          |
| BLNK                   | B-cell linker                                                                               | -6,8499093         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                  | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| BLOC1S5                | biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 5, muted    | -2,1110797         |
| BRD1                   | bromodomain containing 1                                          | 2,5739894          |
| BRD3                   | bromodomain containing 3                                          | -5,7220945         |
| BRD4                   | bromodomain containing 4                                          | -5,5178075         |
| BRICD5                 | BRICHOS domain containing 5                                       | 2,7088342          |
| BRK1                   | BRICK1, SCAR/WAVE actin-nucleating complex subunit                | -2,4507241         |
| BTBD1                  | BTB (POZ) domain containing 1                                     | -2,2232232         |
| BTBD10                 | BTB (POZ) domain containing 10                                    | 2,171078           |
| BUD31                  | BUD31 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                            | 2,0826497          |
| BZW2                   | basic leucine zipper and W2 domains 2                             | -2,1355975         |
| C1QBP                  | complement component 1, q subcomponent binding protein            | -2,1416538         |
| C1QTNF6                | C1q and tumor necrosis factor related protein 6                   | 3,6057107          |
| CALR                   | calreticulin                                                      | -6,7386317         |
| CALY                   | calcyon neuron-specific vesicular protein                         | 3,1830885          |
| CAMSAP2                | calmodulin regulated spectrin-associated protein family, member 2 | 2,3930185          |
| CAND1                  | cullin-associated and neddylation-dissociated 1                   | 4,1410728          |
| CAP2                   | CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)              | -2,0770347         |
| CARD10                 | caspase recruitment domain family, member 10                      | -2,8299906         |
| CARHSP1                | calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa                    | -2,7589366         |
| CASK                   | calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family) | 2,37613            |
| CASKIN1                | CASK interacting protein 1                                        | 3,3423169          |
| CBX1                   | chromobox homolog 1                                               | 7,4878697          |
| CBX2                   | chromobox homolog 2                                               | -2,2160058         |
| CBX5                   | chromobox homolog 5                                               | -3,6344721         |
| CBX7                   | chromobox homolog 7                                               | -2,6730099         |
| CCDC117                | coiled-coil domain containing 117                                 | -4,8823595         |
| CCDC120                | coiled-coil domain containing 120                                 | -3,630251          |
| CCDC125                | coiled-coil domain containing 125                                 | -2,0034475         |
| CCDC14                 | coiled-coil domain containing 14                                  | -2,177338          |
| CCDC142                | coiled-coil domain containing 142                                 | -2,2868214         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|
| CCDC151                | coiled-coil domain containing 151             | -19,902391         |
| CCDC34                 | coiled-coil domain containing 34              | -2,9805768         |
| CCDC53                 | coiled-coil domain containing 53              | -2,2153833         |
| CCDC71L                | coiled-coil domain containing 71-like         | 2,9522214          |
| CCDC78                 | coiled-coil domain containing 78              | 2,8759153          |
| CCDC85C                | coiled-coil domain containing 85C             | 2,4704418          |
| CCDC88B                | coiled-coil domain containing 88B             | -2,136744          |
| CCDC90B                | coiled-coil domain containing 90B             | -2,0121481         |
| CCDC92                 | coiled-coil domain containing 92              | 3,089328           |
| CCHCR1                 | coiled-coil alpha-helical rod protein 1       | -2,0877388         |
| CCND3                  | cyclin D3                                     | 4,8296185          |
| CCNK                   | cyclin K                                      | -8,280932          |
| CD72                   | CD72 molecule                                 | 2,0361269          |
| CD84                   | CD84 molecule                                 | -2,0333574         |
| CD9                    | CD9 molecule                                  | 2,6270525          |
| CD97                   | CD97 molecule                                 | -2,3657634         |
| CDC23                  | cell division cycle 23                        | -4,0863147         |
| CDC25A                 | cell division cycle 25A                       | 4,316411           |
| CDC26                  | cell division cycle 26                        | -2,7781875         |
| CDC40                  | cell division cycle 40                        | 3,8758278          |
| CDC42                  | cell division cycle 42                        | -9,075735          |
| CDC42EP4               | CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4 | -4,68003           |
| CDCA7                  | cell division cycle associated 7              | -3,093224          |
| CDCA7L                 | cell division cycle associated 7-like         | 10,231259          |
| CDH3                   | cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)    | 2,1094482          |
| CDK3                   | cyclin-dependent kinase 3                     | 2,5811915          |
| CDK5                   | cyclin-dependent kinase 5                     | 2,661601           |
| CDK5RAP1               | CDK5 regulatory subunit associated protein 1  | -2,7299056         |
| CDK7                   | cyclin-dependent kinase 7                     | 8,466223           |
| CDK9                   | cyclin-dependent kinase 9                     | -2,015467          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                   | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| CDS1                   | CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 1                 | 3,4383168          |
| CDS2                   | CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2                 | 2,1753066          |
| CENPU                  | centromere protein U                                                               | -5,149616          |
| CEP250                 | centrosomal protein 250kDa                                                         | 3,4360878          |
| CEP72                  | centrosomal protein 72kDa                                                          | -4,2145886         |
| CERS1                  | ceramide synthase 1                                                                | 2,3668802          |
| CERS5                  | ceramide synthase 5                                                                | -2,8337233         |
| CFDP1                  | craniofacial development protein 1                                                 | 2,5032337          |
| CHAC1                  | ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1                         | 2,0521622          |
| CHCHD5                 | coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5                            | 2,3959167          |
| CHCHD6                 | coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6                            | 2,236193           |
| CHEK1                  | checkpoint kinase 1                                                                | -6,350955          |
| CHIT1                  | chitinase 1 (chitotriosidase)                                                      | -2,576467          |
| CHORDC1                | cysteine and histidine-rich domain (CHORD) containing 1                            | 2,6957023          |
| CHST6                  | carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6                          | 2,4561808          |
| CTF18                  | CTF18, chromosome transmission fidelity factor 18 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) | -5,655168          |
| CHUK                   | conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase                                       | 2,1878035          |
| CIAPIN1                | cytokine induced apoptosis inhibitor 1                                             | -3,2097232         |
| CIC                    | capicua transcriptional repressor                                                  | -2,4313993         |
| CIRBP                  | cold inducible RNA binding protein                                                 | 3,3794606          |
| CKAP2L                 | cytoskeleton associated protein 2-like                                             | -2,0791461         |
| CLHC1                  | clathrin heavy chain linker domain containing 1                                    | -2,3245482         |
| CLNS1A                 | chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A                                         | 2,442161           |
| CLSTN3                 | calsyntenin 3                                                                      | -2,4377193         |
| CMTM6                  | CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6                                 | 2,026794           |
| CNN2                   | calponin 2                                                                         | 2,6905298          |
| CNP                    | 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase                                       | -3,99126           |
| COA5                   | cytochrome c oxidase assembly factor 5                                             | -884,46075         |
| COG1                   | component of oligomeric golgi complex 1                                            | -3,2709963         |
| COG2                   | component of oligomeric golgi complex 2                                            | -3,673228          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                    | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| COG4                   | component of oligomeric golgi complex 4                                             | -3,0482056         |
| COIL                   | coilin                                                                              | -2,2917457         |
| COL4A5                 | collagen, type IV, alpha 5                                                          | -2,9025524         |
| COMMD5                 | COMM domain containing 5                                                            | -2,6175385         |
| COMMD8                 | COMM domain containing 8                                                            | -3,8340712         |
| COPRS                  | coordinator of PRMT5, differentiation stimulator                                    | 7,181841           |
| COPS4                  | COP9 signalosome subunit 4                                                          | -2,922162          |
| COPS6                  | COP9 signalosome subunit 6                                                          | 2,8893013          |
| COX1                   | cytochrome c oxidase subunit I                                                      | -2,0104306         |
| COX20                  | COX20 cytochrome c oxidase assembly factor                                          | -4,5562687         |
| COX6C                  | cytochrome c oxidase subunit VIc                                                    | -2,172668          |
| CPQ                    | carboxypeptidase Q                                                                  | -5,7407994         |
| CPSF6                  | cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68kDa                               | -3,8306892         |
| CRACR2B                | calcium release activated channel regulator 2B                                      | -2,9112282         |
| CREG1                  | cellular repressor of E1A-stimulated genes 1                                        | -2,0754056         |
| CRELD2                 | cysteine-rich with EGF-like domains 2                                               | 3,40728            |
| CSAG4                  | CSAG family, member 4 (pseudogene)                                                  | 2,747013           |
| CSDE1                  | cold shock domain containing E1, RNA-binding                                        | -4,6126747         |
| CSE1L                  | CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)                                          | 5,5497823          |
| CSNK2B                 | casein kinase 2, beta polypeptide                                                   | 5,0951276          |
| CSRP2                  | cysteine and glycine-rich protein 2                                                 | -2,913261          |
| CST5                   | cystatin D                                                                          | -4,894167          |
| CSTF1                  | cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1, 50kDa                           | 2,2893298          |
| CTBS                   | chitobiase, di-N-acetyl-                                                            | -6,0807953         |
| CTDSP2                 | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2 | -2,5527475         |
| CTNNA1                 | catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa                              | -10,508221         |
| CTSD                   | cathepsin D                                                                         | 2,2834973          |
| CTSG                   | cathepsin G                                                                         | -3,9579375         |
| CTSH                   | cathepsin H                                                                         | 6,668871           |
| CUL4B                  | cullin 4B                                                                           | -9,506072          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                       | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| CUTC                   | cutC copper transporter                                                                | 2,2409303          |
| CYB5R2                 | cytochrome b5 reductase 2                                                              | -2,5309846         |
| CYC1                   | cytochrome c-1                                                                         | 5,830741           |
| CYGB                   | cytoglobin                                                                             | 2,1874435          |
| CYP26C1                | cytochrome P450, family 26, subfamily C, polypeptide 1                                 | 2,8555784          |
| CYP27A1                | cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1                                 | -3,4433084         |
| CYR61                  | cysteine-rich, angiogenic inducer, 61                                                  | -2,0823386         |
| D2HGDH                 | D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase                                                     | -2,892359          |
| DCP1A                  | decapping mRNA 1A                                                                      | -2,8603137         |
| DCPS                   | decapping enzyme, scavenger                                                            | -2,0015898         |
| DCTN1                  | dynactin 1                                                                             | -1421,1548         |
| DCTN3                  | dynactin 3 (p22)                                                                       | 2,0851953          |
| DDAH1                  | dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1                                              | -4,869108          |
| DDC                    | dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)                               | 2,3258564          |
| DDOST                  | dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit (non-catalytic) | -5,647517          |
| DDX11                  | DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11                                           | -2,8573203         |
| DDX18                  | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18                                              | 2,975853           |
| DDX49                  | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49                                              | -2,5020797         |
| DEF8                   | differentially expressed in FDCP 8 homolog (mouse)                                     | 2,3733256          |
| DERL1                  | derlin 1                                                                               | 5,01488            |
| DEXI                   | Dexi homolog (mouse)                                                                   | -5,4506826         |
| DGCR6L                 | DiGeorge syndrome critical region gene 6-like                                          | -3,1823921         |
| DHCR24                 | 24-dehydrocholesterol reductase                                                        | -2,1310089         |
| DHFR                   | dihydrofolate reductase                                                                | 6,6874604          |
| DHRS2                  | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2                                          | -4,968334          |
| DHRS7B                 | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B                                         | -9,323194          |
| DHX34                  | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 34                                              | 2,3444414          |
| DHX9                   | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box helicase 9                                                  | -8,381062          |
| DIABLO                 | diablo, IAP-binding mitochondrial protein                                              | 2,0096943          |
| DIAPH1                 | diaphanous-related formin 1                                                            | 2,336954           |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                         | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| DIMT1                  | DIM1 dimethyladenosine transferase 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )    | 2,067509           |
| DKK1                   | dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1                               | 2,3712902          |
| DLEU1                  | deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding)                   | -7,830416          |
| DNAJC1                 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1                              | -2,626397          |
| DNAJC13                | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13                             | 2,2963836          |
| DNAJC16                | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16                             | 2,2590907          |
| DNASE2                 | deoxyribonuclease II, lysosomal                                          | -5,1356845         |
| DNMT3B                 | DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta                               | 2,077267           |
| DOCK11                 | dedicator of cytokinesis 11                                              | -2,4556077         |
| DOK3                   | docking protein 3                                                        | 5,2329717          |
| DPH3                   | diphthamide biosynthesis 3                                               | -4,521208          |
| DPM2                   | dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit | -2,2694647         |
| DPYSL4                 | dihydropyrimidinase-like 4                                               | -9,166201          |
| DR1                    | down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)     | -4,196557          |
| DRG2                   | developmentally regulated GTP binding protein 2                          | 3,6411645          |
| DSCR3                  | Down syndrome critical region 3                                          | -4,544859          |
| DSN1                   | DSN1, MIS12 kinetochore complex component                                | -2,1428773         |
| DUSP15                 | dual specificity phosphatase 15                                          | 2,4039845          |
| DUSP22                 | dual specificity phosphatase 22                                          | -3,0983093         |
| DUSP23                 | dual specificity phosphatase 23                                          | 6,682597           |
| DUT                    | deoxyuridine triphosphatase                                              | -3,070921          |
| DVL2                   | dishevelled segment polarity protein 2                                   | -10,975744         |
| DXO                    | decapping exoribonuclease                                                | -4,79302           |
| DYNLRB1                | dynein, light chain, roadblock-type 1                                    | -2,7750306         |
| E2F7                   | E2F transcription factor 7                                               | -2,6925714         |
| EBP                    | emopamil binding protein (sterol isomerase)                              | -2,500752          |
| ECE2                   | endothelin converting enzyme 2                                           | -2,014745          |
| ECH1                   | enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal                                       | -8,268499          |
| EDARADD                | EDAR-associated death domain                                             | 2,1336193          |
| EDEM3                  | ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3                        | 2,056827           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                       | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| EDF1                   | endothelial differentiation-related factor 1                                           | -4,97348           |
| EEF1D                  | eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein) | 2,0735352          |
| EEF2                   | eukaryotic translation elongation factor 2                                             | -2,428102          |
| EFEMP1                 | EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1                             | -2,2142618         |
| EFNB1                  | ephrin-B1                                                                              | -2,3923345         |
| EHBP1L1                | EH domain binding protein 1-like 1                                                     | -13,85214          |
| EHMT2                  | euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2                                       | 2,1375353          |
| EIF1AD                 | eukaryotic translation initiation factor 1A domain containing                          | -5,971179          |
| EIF2B3                 | eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa                    | -3,0388093         |
| EIF3D                  | eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D                                  | 7,180293           |
| EIF4E                  | eukaryotic translation initiation factor 4E                                            | 9,55883            |
| EIF6                   | eukaryotic translation initiation factor 6                                             | 5,071847           |
| ELMO2                  | engulfment and cell motility 2                                                         | 2,3000443          |
| ELMOD3                 | ELMO/CED-12 domain containing 3                                                        | -6,6188045         |
| ELOF1                  | elongation factor 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                                   | 2,281067           |
| ELP4                   | elongator acetyltransferase complex subunit 4                                          | -2,5412834         |
| ELP6                   | elongator acetyltransferase complex subunit 6                                          | -3,6069598         |
| EN2                    | engrailed homeobox 2                                                                   | 2,1051612          |
| ENAH                   | enabled homolog ( <i>Drosophila</i> )                                                  | 2,0448754          |
| ENTHD2                 | ENTH domain containing 2                                                               | 2,0103188          |
| ENTPD6                 | ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative)                            | 2,6731255          |
| EPAS1                  | endothelial PAS domain protein 1                                                       | 2,3336058          |
| EPB41L4B               | erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B                                          | 2,5889874          |
| EPHB3                  | EPH receptor B3                                                                        | 2,2418             |
| ERCC3                  | excision repair cross-complementation group 3                                          | -3,924535          |
| EVI5L                  | ecotropic viral integration site 5-like                                                | 2,269242           |
| EXOC6                  | exocyst complex component 6                                                            | -5,096837          |
| EXOSC7                 | exosome component 7                                                                    | -2,8528793         |
| EXOSC8                 | exosome component 8                                                                    | 2,0629382          |
| EXPH5                  | exophilin 5                                                                            | -2,473178          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| F3                     | coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)           | 2,155268           |
| F8A2                   | coagulation factor VIII-associated 2                             | -5,4193215         |
| FAM133B                | family with sequence similarity 133, member B                    | -6,6147604         |
| FAM136A                | family with sequence similarity 136, member A                    | 2,2071128          |
| FAM13A                 | family with sequence similarity 13, member A                     | 2,5635293          |
| FAM160A2               | family with sequence similarity 160, member A2                   | -2,7716885         |
| FAM172A                | family with sequence similarity 172, member A                    | 7,1853004          |
| FAM174A                | family with sequence similarity 174, member A                    | 2,5976684          |
| FAM199X                | family with sequence similarity 199, X-linked                    | -3,3692324         |
| FAM204A                | family with sequence similarity 204, member A                    | -6,2256956         |
| FAM20A                 | family with sequence similarity 20, member A                     | 13,997553          |
| FAM212A                | family with sequence similarity 212, member A                    | 2,4479587          |
| FAM216A                | family with sequence similarity 216, member A                    | 2,799729           |
| FAM219A                | family with sequence similarity 219, member A                    | 2,1741896          |
| FAM49B                 | family with sequence similarity 49, member B                     | 2,5731387          |
| FAM58A                 | family with sequence similarity 58, member A                     | -3,0923898         |
| FAM65A                 | family with sequence similarity 65, member A                     | -11,237269         |
| FAM72D                 | family with sequence similarity 72, member D                     | 2,3718765          |
| FAM74A4                | family with sequence similarity 74, member A4                    | -2,2743652         |
| FAN1                   | FANCD2/FANCI-associated nuclease 1                               | -2,323387          |
| FANCF                  | Fanconi anemia, complementation group F                          | -6,24908           |
| FASTKD2                | FAST kinase domains 2                                            | -2,3946466         |
| FBXL3                  | F-box and leucine-rich repeat protein 3                          | 2,616346           |
| FBXO21                 | F-box protein 21                                                 | -3,1147847         |
| FCGBP                  | Fc fragment of IgG binding protein                               | -2,1419773         |
| FCHO2                  | FCH domain only 2                                                | 3,3554165          |
| FGF22                  | fibroblast growth factor 22                                      | -26,084435         |
| FGFR1OP                | FGFR1 oncogene partner                                           | 2,0591452          |
| FIG4                   | FIG4 phosphoinositide 5-phosphatase                              | 6,783136           |
| FIS1                   | fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (S. cerevisiae) | -2,6446803         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                  | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| FKBP8                  | FK506 binding protein 8, 38kDa                                                    | 8,284568           |
| FLJ11292               | uncharacterized protein FLJ11292                                                  | 2,8498805          |
| FLJ13773               | uncharacterized LOC246318                                                         | -2,8673182         |
| FLJ43681               | ribosomal protein L23a pseudogene                                                 | 2,3128343          |
| FMO4                   | flavin containing monooxygenase 4                                                 | -5,107363          |
| FNIP2                  | folliculin interacting protein 2                                                  | -4,940939          |
| FOXP1                  | forkhead box P1                                                                   | 3,7821727          |
| FOXQ1                  | forkhead box Q1                                                                   | -2,1008239         |
| FRA10AC1               | fragile site, folic acid type, rare, fra(10)(q23.3) or fra(10)(q24.2) candidate 1 | 2,0628967          |
| FRG1                   | FSHD region gene 1                                                                | -3,5409226         |
| FTO                    | fat mass and obesity associated                                                   | 2,3737006          |
| FTSJ1                  | FtsJ RNA methyltransferase homolog 1 (E. coli)                                    | -2,9643555         |
| FTSJ3                  | FtsJ homolog 3 (E. coli)                                                          | -2,0302374         |
| FXD2                   | FXD domain containing ion transport regulator 2                                   | 2,4965904          |
| FZD2                   | frizzled class receptor 2                                                         | 2,034219           |
| FZD4                   | frizzled class receptor 4                                                         | -2,3595388         |
| GABARAP                | GABA(A) receptor-associated protein                                               | 2,6836476          |
| GABARAPL1              | GABA(A) receptor-associated protein like 1                                        | -3,4493797         |
| GABARAPL2              | GABA(A) receptor-associated protein-like 2                                        | 2,5983596          |
| GABPA                  | GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa                      | -6,5867043         |
| GAK                    | cyclin G associated kinase                                                        | -7,330254          |
| GAL                    | galanin/GMAP prepropeptide                                                        | -3,4537969         |
| GALNT7                 | polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7                                   | 2,046022           |
| GAS8                   | growth arrest-specific 8                                                          | 2,1139464          |
| GATA6                  | GATA binding protein 6                                                            | -2,3627768         |
| GBAS                   | glioblastoma amplified sequence                                                   | 3,1555974          |
| GCDH                   | glutaryl-CoA dehydrogenase                                                        | 2,6374474          |
| GCHFR                  | GTP cyclohydrolase I feedback regulator                                           | -2,191486          |
| GCOM1                  | GRINL1A complex locus 1                                                           | 2,9076288          |
| GCSH                   | glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)                           | -2,2307353         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                        | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| GEMIN7                 | gem (nuclear organelle) associated protein 7                                            | 2,8105924          |
| GFM1                   | G elongation factor, mitochondrial 1                                                    | -2,539463          |
| GFOD2                  | glucose-fructose oxidoreductase domain containing 2                                     | -2,4438438         |
| GFPT1                  | glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1                                          | 2,5744667          |
| GGH                    | gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, foylpolypogammaglutamyl hydrolase)                 | -2,1743362         |
| GID8                   | GID complex subunit 8                                                                   | 2,0529654          |
| GIGYF2                 | GRB10 interacting GYF protein 2                                                         | -2,2043455         |
| GINM1                  | glycoprotein integral membrane 1                                                        | -10,422952         |
| GIN1                   | GIN5 complex subunit 1 (Psf1 homolog)                                                   | -2,7652779         |
| GIN3                   | GIN5 complex subunit 3 (Psf3 homolog)                                                   | -2,7361612         |
| GIN4                   | GIN5 complex subunit 4 (Sld5 homolog)                                                   | 2,2800672          |
| GLIDR                  | glioblastoma down-regulated RNA                                                         | -3,223967          |
| GLIS3-AS1              | GLIS3 antisense RNA 1                                                                   | -141,4033          |
| GLS                    | glutaminase                                                                             | 8,402004           |
| GLT8D1                 | glycosyltransferase 8 domain containing 1                                               | -2,8563306         |
| GLTSCR2                | glioma tumor suppressor candidate region gene 2                                         | 3,130427           |
| GLUL                   | glutamate-ammonia ligase                                                                | -5,2518063         |
| GNAI2                  | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2 | -2,357279          |
| GNB2                   | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2                      | -2,1521075         |
| GNB4                   | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4                      | 2,7463694          |
| GNL3L                  | guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like                              | 2,0642424          |
| GNPTAB                 | N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits                    | 2,8078907          |
| GOLGA2                 | golgin A2                                                                               | 2,8661318          |
| GOLGA2P6               | golgin A2 pseudogene 6                                                                  | -2,7700088         |
| GOLGA6L4               | golgin A6 family-like 4                                                                 | -2,5349178         |
| GOLGA8IP               | golgin A8 family, member I, pseudogene                                                  | 2,6712284          |
| GOLPH3L                | golgi phosphoprotein 3-like                                                             | -4,2646074         |
| GOPC                   | golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing                                   | 2,1272018          |
| GPC1                   | glypican 1                                                                              | 2,2291815          |
| GPC2                   | glypican 2                                                                              | -3,126627          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| GPD2                   | glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)                                                             | 3,2740898          |
| GPNMB                  | glycoprotein (transmembrane) nmb                                                                                 | 2,8397107          |
| GPR125                 | G protein-coupled receptor 125                                                                                   | -2,8463233         |
| GPR137B                | G protein-coupled receptor 137B                                                                                  | -2,191691          |
| GPR150                 | G protein-coupled receptor 150                                                                                   | 2,0360286          |
| GRB10                  | growth factor receptor-bound protein 10                                                                          | -2,0651596         |
| GRPEL2                 | GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli)                                                                             | -4,2130647         |
| GSE1                   | Gse1 coiled-coil protein                                                                                         | -7,2511034         |
| GSKIP                  | GSK3B interacting protein                                                                                        | -6,4226656         |
| GTF3C3                 | general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa                                                         | -5,769786          |
| GUK1                   | guanylate kinase 1                                                                                               | -2,0233107         |
| GYS1                   | glycogen synthase 1 (muscle)                                                                                     | -2,033016          |
| H1FX                   | H1 histone family, member X                                                                                      | -3,9598112         |
| H2AFV                  | H2A histone family, member V                                                                                     | -2,0053298         |
| HADHA                  | hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit | -4,4153566         |
| HAPLN2                 | hyaluronan and proteoglycan link protein 2                                                                       | 3,084965           |
| HARS                   | histidyl-tRNA synthetase                                                                                         | -2,6181104         |
| HARS2                  | histidyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial                                                                        | -4,416397          |
| HCFC2                  | host cell factor C2                                                                                              | -5,3764873         |
| HCST                   | hematopoietic cell signal transducer                                                                             | -7,522872          |
| HDAC5                  | histone deacetylase 5                                                                                            | 2,4345694          |
| HDLBP                  | high density lipoprotein binding protein                                                                         | -2,2350054         |
| HELZ                   | helicase with zinc finger                                                                                        | -44,310165         |
| HELZ2                  | helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator                                                         | -3,7509131         |
| HEXA                   | hexosaminidase A (alpha polypeptide)                                                                             | -13,174058         |
| HEXDC                  | hexosaminidase (glycosyl hydrolase family 20, catalytic domain) containing                                       | -2,310604          |
| HGH1                   | HGH1 homolog (S. cerevisiae)                                                                                     | 2,0138354          |
| HIC2                   | hypermethylated in cancer 2                                                                                      | -2,3867552         |
| HIF3A                  | hypoxia inducible factor 3, alpha subunit                                                                        | 2,6079419          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                   | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------|
| HIGD1A                 | HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1A                    | 2,0296228          |
| HIGD2A                 | HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A                    | 2,5006263          |
| HINT3                  | histidine triad nucleotide binding protein 3                       | -2,2914085         |
| HIPK1                  | homeodomain interacting protein kinase 1                           | -6,1136537         |
| HIRIP3                 | HIRA interacting protein 3                                         | -2,7603147         |
| HIST1H1D               | histone cluster 1, H1d                                             | 2,5868266          |
| HIST1H2AB              | histone cluster 1, H2ab                                            | -2,211449          |
| HIST1H2BC              | histone cluster 1, H2bc                                            | 2,0869095          |
| HIST1H2BH              | histone cluster 1, H2bh                                            | 2,048477           |
| HIST1H3A               | histone cluster 1, H3a                                             | 2,150644           |
| HIST1H3B               | histone cluster 1, H3b                                             | 3,182491           |
| HIST1H3D               | histone cluster 1, H3d                                             | 2,1471097          |
| HIST1H3H               | histone cluster 1, H3h                                             | -7,2911725         |
| HIST1H4A               | histone cluster 1, H4a                                             | -408,42795         |
| HIST1H4H               | histone cluster 1, H4h                                             | -2,9009132         |
| HIST2H3D               | histone cluster 2, H3d                                             | 5,3813567          |
| HLA-C                  | major histocompatibility complex, class I, C                       | 3,0961514          |
| HLA-DRB3               | major histocompatibility complex, class II, DR beta 3              | -2,4233172         |
| HMGCR                  | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase                           | 2,860686           |
| HMGCS1                 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)                | 3,1847503          |
| HNRNPL                 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L                          | -2,6447678         |
| HNRNPUL2               | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2                   | 2,490928           |
| HOOK3                  | hook microtubule-tethering protein 3                               | 3,2290242          |
| HRSP12                 | heat-responsive protein 12                                         | 4,1512914          |
| HSF1                   | heat shock transcription factor 1                                  | 2,0749872          |
| HSPA1B                 | heat shock 70kDa protein 1B                                        | -6,2947206         |
| HSPA9                  | heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)                              | -5,932459          |
| HSPB1                  | heat shock 27kDa protein 1                                         | 2,0918374          |
| HSPH1                  | heat shock 105kDa/110kDa protein 1                                 | 2,409365           |
| HUWE1                  | HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase | 5,793286           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                            | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| HYI                    | hydroxypyruvate isomerase (putative)                                        | -3,2435715         |
| ID2                    | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein      | -2,687699          |
| IDH1                   | isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble                                 | -3,15944           |
| IDH3B                  | isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta                                      | -2,0126204         |
| IDS                    | iduronate 2-sulfatase                                                       | -2,665998          |
| IER3IP1                | immediate early response 3 interacting protein 1                            | 2,574956           |
| IFI6                   | interferon, alpha-inducible protein 6                                       | -13,206258         |
| IFITM2                 | interferon induced transmembrane protein 2                                  | -9,130023          |
| IFITM3                 | interferon induced transmembrane protein 3                                  | 6,383484           |
| IFT74                  | intraflagellar transport 74                                                 | -191,68288         |
| IGF2R                  | insulin-like growth factor 2 receptor                                       | 2,064279           |
| IGFBP7                 | insulin-like growth factor binding protein 7                                | -3,7119656         |
| IK                     | IK cytokine, down-regulator of HLA II                                       | 2,4241343          |
| IKBKG                  | inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma | -4,423772          |
| IL13RA1                | interleukin 13 receptor, alpha 1                                            | -3,175699          |
| IMMP2L                 | IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like ( <i>S. cerevisiae</i> )   | 2,4739742          |
| INPP5K                 | inositol polyphosphate-5-phosphatase K                                      | -2,7886992         |
| IP6K2                  | inositol hexakisphosphate kinase 2                                          | -4,8012295         |
| IPO7                   | importin 7                                                                  | -2,0872998         |
| IRAK1                  | interleukin-1 receptor-associated kinase 1                                  | -2,176837          |
| IREB2                  | iron-responsive element binding protein 2                                   | -5,7876935         |
| IRF3                   | interferon regulatory factor 3                                              | -2,2469816         |
| ISG15                  | ISG15 ubiquitin-like modifier                                               | -3,7765963         |
| ISOC1                  | isochorismatase domain containing 1                                         | -4,23967           |
| ITM2B                  | integral membrane protein 2B                                                | -2,1447976         |
| ITM2C                  | integral membrane protein 2C                                                | -2,4333997         |
| JAK3                   | Janus kinase 3                                                              | -23821,334         |
| JMJD4                  | jumonji domain containing 4                                                 | -2,3412433         |
| KANSL2                 | KAT8 regulatory NSL complex subunit 2                                       | -4,6884894         |
| KBTBD4                 | kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4                              | -14,181584         |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| KCNN4                  | potassium channel, calcium activated intermediate/small conductance subfamily N alpha, member 4 | 3,9696708          |
| KCNQ1                  | potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 1                                 | 2,2049642          |
| KCTD6                  | potassium channel tetramerization domain containing 6                                           | -17,53286          |
| KDM5B                  | lysine (K)-specific demethylase 5B                                                              | -7,9956384         |
| KDSR                   | 3-ketodihydrosphingosine reductase                                                              | -3,313076          |
| KIAA0100               | KIAA0100                                                                                        | -3,7477703         |
| KIAA1033               | KIAA1033                                                                                        | -10,491621         |
| KIAA1161               | KIAA1161                                                                                        | -5,8422904         |
| KIAA1279               | KIAA1279                                                                                        | -3,2641373         |
| KIAA1551               | KIAA1551                                                                                        | 4,391074           |
| KIAA1731NL             | KIAA1731 N-terminal like                                                                        | -7,2136097         |
| KIF23                  | kinesin family member 23                                                                        | 3,2225099          |
| KIF4A                  | kinesin family member 4A                                                                        | -11,014331         |
| KLC1                   | kinesin light chain 1                                                                           | 4,3330107          |
| KLF10                  | Kruppel-like factor 10                                                                          | 2,8526664          |
| KLF17                  | Kruppel-like factor 17                                                                          | 2,228168           |
| KLF5                   | Kruppel-like factor 5 (intestinal)                                                              | -3,672115          |
| KLHDC2                 | kelch domain containing 2                                                                       | -3,447777          |
| KLHL12                 | kelch-like family member 12                                                                     | 2,4158735          |
| KLHL25                 | kelch-like family member 25                                                                     | -2,1139753         |
| KLHL7                  | kelch-like family member 7                                                                      | 3,4539063          |
| KLHL8                  | kelch-like family member 8                                                                      | -2,5638328         |
| KLHL9                  | kelch-like family member 9                                                                      | -8,389337          |
| KLK5                   | kallikrein-related peptidase 5                                                                  | 3,9244678          |
| KMT2B                  | lysine (K)-specific methyltransferase 2B                                                        | -6,95365           |
| KNSTRN                 | kinetochore-localized astrin/SPAG5 binding protein                                              | 4,2550926          |
| KPNA3                  | karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)                                                          | -7,2336006         |
| KRT5                   | keratin 5, type II                                                                              | -2,0103042         |
| KRT8                   | keratin 8, type II                                                                              | 3,834426           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                           | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------|
| KRT80                  | keratin 80, type II                                        | -2,0426583         |
| KRTAP1-4               | keratin associated protein 1-4                             | 2,0989335          |
| KRTAP2-4               | keratin associated protein 2-4                             | 2,6979823          |
| KRTAP3-3               | keratin associated protein 3-3                             | -2075,64           |
| KRTCAP2                | keratinocyte associated protein 2                          | 4,1391034          |
| KYNU                   | kynureninase                                               | -3,0331297         |
| LANCL3                 | LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial) | -3,9961545         |
| LARP4B                 | La ribonucleoprotein domain family, member 4B              | -6,908863          |
| LARP7                  | La ribonucleoprotein domain family, member 7               | -2,5858266         |
| LAT2                   | linker for activation of T cells family, member 2          | -2,2019484         |
| LEPR                   | leptin receptor                                            | 2,2568696          |
| LGALS3BP               | lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein    | -2,67136           |
| LINC00261              | long intergenic non-protein coding RNA 261                 | -2,140283          |
| LINC00265              | long intergenic non-protein coding RNA 265                 | 2,4586377          |
| LINC00487              | long intergenic non-protein coding RNA 487                 | 2,9055872          |
| LINC00665              | long intergenic non-protein coding RNA 665                 | -2,3505306         |
| LINC01420              | long intergenic non-protein coding RNA 1420                | 2,0062592          |
| LLPH                   | LLP homolog, long-term synaptic facilitation (Aplysia)     | -2,417522          |
| LMAN2L                 | lectin, mannose-binding 2-like                             | -7,6290016         |
| LMNA                   | lamin A/C                                                  | 2,1537256          |
| LMO4                   | LIM domain only 4                                          | 2,6166399          |
| lnc-DTYMK-3            | lnc-DTYMK-3:1                                              | 6,1174617          |
| lnc-SHCBP1L-1          | lnc-SHCBP1L-1:1                                            | -5,5707216         |
| LOC100128364           | uncharacterized LOC100128364                               | -6,1445427         |
| LOC100128851           | uncharacterized LOC100128851                               | 2,6016836          |
| LOC100133669           | uncharacterized LOC100133669                               | 2,820289           |
| LOC158435              | uncharacterized LOC158435                                  | 2,6348248          |
| LOC286437              | uncharacterized LOC286437                                  | 2,1285408          |
| LOC388242              | coiled-coil domain containing 101 pseudogene               | -2,128061          |
| LOC400558              | uncharacterized LOC400558                                  | 2,901923           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                       | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| LOC401286              | uncharacterized LOC401286                                              | 2,348128           |
| LOC642236              | FSHD region gene 1 pseudogene                                          | 2,1416333          |
| LOC645553              | uncharacterized LOC645553                                              | 2,276265           |
| LOC729680              | uncharacterized LOC729680                                              | -2,3718843         |
| LOC84214               | uncharacterized LOC84214                                               | -9,74521           |
| LOXL1                  | lysyl oxidase-like 1                                                   | 2,8443859          |
| LRP3                   | low density lipoprotein receptor-related protein 3                     | 2,3822818          |
| LRRC1                  | leucine rich repeat containing 1                                       | -2,6049619         |
| LRRC40                 | leucine rich repeat containing 40                                      | -9,223026          |
| LRRC41                 | leucine rich repeat containing 41                                      | 4,7372775          |
| LRRC59                 | leucine rich repeat containing 59                                      | -2,3598313         |
| LRRC8D                 | leucine rich repeat containing 8 family, member D                      | 2,3473847          |
| LRRC1                  | leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1              | -2,7617521         |
| LSM10                  | LSM10, U7 small nuclear RNA associated                                 | -3,2831774         |
| LSM14B                 | LSM14B, SCD6 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )                        | -2,3365686         |
| LSM6                   | LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> ) | 2,1878312          |
| LTBP4                  | latent transforming growth factor beta binding protein 4               | 8,375628           |
| LTK                    | leukocyte receptor tyrosine kinase                                     | 2,6920972          |
| LXN                    | latexin                                                                | -2,2855935         |
| LY6K                   | lymphocyte antigen 6 complex, locus K                                  | 2,6634526          |
| LYSMD2                 | LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2              | -2,438638          |
| LZTS2                  | leucine zipper, putative tumor suppressor 2                            | 2,5436757          |
| MACROD1                | MACRO domain containing 1                                              | 3,3397682          |
| MAD2L1BP               | MAD2L1 binding protein                                                 | 2,2378085          |
| MAGEA6                 | melanoma antigen family A, 6                                           | 2,0256233          |
| MAGED2                 | melanoma antigen family D, 2                                           | -3,9992306         |
| MAGIX                  | MAGI family member, X-linked                                           | 3,375846           |
| MALL                   | mal, T-cell differentiation protein-like                               | 2,9816036          |
| MAMLD1                 | mastermind-like domain containing 1                                    | -3,4400434         |
| MAN1A2                 | mannosidase, alpha, class 1A, member 2                                 | 3,8142953          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                     | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| MAP1LC3B               | microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta  | 2,1211917          |
| MAP2K1                 | mitogen-activated protein kinase kinase 1            | 2,0448606          |
| MAP2K2                 | mitogen-activated protein kinase kinase 2            | -3,523935          |
| MAP2K3                 | mitogen-activated protein kinase kinase 3            | -1544,6807         |
| MAP3K9                 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9     | -5,379696          |
| MARVELD2               | MARVEL domain containing 2                           | 2,367874           |
| MATN1-AS1              | MATN1 antisense RNA 1                                | 3,6508303          |
| MBD6                   | methyl-CpG binding domain protein 6                  | 3,9416842          |
| MBOAT7                 | membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 | -2,3436            |
| MCF2L                  | MCF.2 cell line derived transforming sequence-like   | 2,3461545          |
| MCM10                  | minichromosome maintenance complex component 10      | 3,4630032          |
| MCM5                   | minichromosome maintenance complex component 5       | 2,3995376          |
| MDFI                   | MyoD family inhibitor                                | 2,1004088          |
| MDP1                   | magnesium-dependent phosphatase 1                    | -6,2234206         |
| ME2                    | malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial      | -2,027716          |
| ME3                    | malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial     | -3,3387804         |
| MEA1                   | male-enhanced antigen 1                              | 3,0375922          |
| MEGF11                 | multiple EGF-like-domains 11                         | -4,3459706         |
| MESDC1                 | mesoderm development candidate 1                     | -4,384345          |
| MET                    | MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase         | 2,7771702          |
| METAP1                 | methionyl aminopeptidase 1                           | -2,100041          |
| METAP2                 | methionyl aminopeptidase 2                           | 6,219879           |
| METTTL17               | methyltransferase like 17                            | 15,007293          |
| METTTL22               | methyltransferase like 22                            | 2,6176908          |
| METTTL5                | methyltransferase like 5                             | 2,63522            |
| METTTL6                | methyltransferase like 6                             | 2,0450742          |
| METTTL8                | methyltransferase like 8                             | 2,3114557          |
| MEX3C                  | mex-3 RNA binding family member C                    | 2,0703413          |
| MFAP1                  | microfibrillar-associated protein 1                  | 2,3550222          |
| MFSD11                 | major facilitator superfamily domain containing 11   | -2,0886319         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                               | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| MGAT1                  | mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase                    | -2,265304          |
| MGLL                   | monoglyceride lipase                                                                           | 2,13102            |
| MIOS                   | missing oocyte, meiosis regulator, homolog (Drosophila)                                        | -2,6779008         |
| MIPEP                  | mitochondrial intermediate peptidase                                                           | -4,0158033         |
| MIR22HG                | MIR22 host gene (non-protein coding)                                                           | 4,263013           |
| MITD1                  | MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1                                | -2,5149474         |
| MKI67                  | marker of proliferation Ki-67                                                                  | -2,1425898         |
| MLLT1                  | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1 | -3,4037974         |
| MLLT6                  | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6 | 2,7670863          |
| MND1                   | meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)                                            | -10,128202         |
| MNS1                   | meiosis-specific nuclear structural 1                                                          | 3,6597524          |
| MNT                    | MAX network transcriptional repressor                                                          | 3,9369683          |
| MOK                    | MOK protein kinase                                                                             | -2,1247325         |
| MON1A                  | MON1 secretory trafficking family member A                                                     | -7,4067183         |
| MPHOSPH6               | M-phase phosphoprotein 6                                                                       | 2,2879198          |
| MPP3                   | membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)                               | -4,025318          |
| MPZL2                  | myelin protein zero-like 2                                                                     | -4,4702888         |
| MROH7                  | maestro heat-like repeat family member 7                                                       | -7,571638          |
| MRPL10                 | mitochondrial ribosomal protein L10                                                            | 4,043234           |
| MRPL11                 | mitochondrial ribosomal protein L11                                                            | 2,576238           |
| MRPL12                 | mitochondrial ribosomal protein L12                                                            | -4,7810516         |
| MRPL15                 | mitochondrial ribosomal protein L15                                                            | -2,111652          |
| MRPL37                 | mitochondrial ribosomal protein L37                                                            | -2,0561528         |
| MRPL38                 | mitochondrial ribosomal protein L38                                                            | 2,0994287          |
| MRPL44                 | mitochondrial ribosomal protein L44                                                            | -3,1907485         |
| MRPL52                 | mitochondrial ribosomal protein L52                                                            | 2,714643           |
| MRPL9                  | mitochondrial ribosomal protein L9                                                             | -2,021244          |
| MRPS14                 | mitochondrial ribosomal protein S14                                                            | -8,294388          |
| MRPS18B                | mitochondrial ribosomal protein S18B                                                           | 3,0533996          |
| MRPS27                 | mitochondrial ribosomal protein S27                                                            | 2,72196            |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                      | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| MRPS31                 | mitochondrial ribosomal protein S31                                   | 3,0614355          |
| MRRF                   | mitochondrial ribosome recycling factor                               | 2,074964           |
| MSL1                   | male-specific lethal 1 homolog (Drosophila)                           | -3,6912868         |
| MTA2                   | metastasis associated 1 family, member 2                              | 4,216759           |
| MTIF3                  | mitochondrial translational initiation factor 3                       | -2,133605          |
| MTMR2                  | myotubularin related protein 2                                        | -4,2249346         |
| MTX1                   | metaxin 1                                                             | 2,6627934          |
| MUC1                   | mucin 1, cell surface associated                                      | -3,9827657         |
| MUL1                   | mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1                           | 2,0465672          |
| MVK                    | mevalonate kinase                                                     | 4,761711           |
| MYBL1                  | v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1              | 3,9714503          |
| MYCBP2                 | MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase                    | -2,433464          |
| MYO18A                 | myosin XVIII A                                                        | -2,1742132         |
| MYO1B                  | myosin IB                                                             | 2,0833077          |
| MZF1                   | myeloid zinc finger 1                                                 | -2,1367526         |
| NAA11                  | N(alpha)-acetyltransferase 11, NatA catalytic subunit                 | 2,146826           |
| NAA35                  | N(alpha)-acetyltransferase 35, NatC auxiliary subunit                 | 2,5520775          |
| NACAP1                 | nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide pseudogene 1 | -3,5944815         |
| NACC1                  | nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing   | 2,3629844          |
| NAGPA                  | N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase    | -3,7149086         |
| NANOS1                 | nanos homolog 1 (Drosophila)                                          | -2,2158358         |
| NAPG                   | N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, gamma           | -2,8886425         |
| NARF                   | nuclear prelamin A recognition factor                                 | -2,0714912         |
| NBPF10                 | neuroblastoma breakpoint family, member 10                            | -2,1723578         |
| NBPF14                 | neuroblastoma breakpoint family, member 14                            | -14,071799         |
| NBR1                   | neighbor of BRCA1 gene 1                                              | 2,0389593          |
| NCEH1                  | neutral cholesterol ester hydrolase 1                                 | 2,5049593          |
| NCK2                   | NCK adaptor protein 2                                                 | -9,6238165         |
| NCKAP1                 | NCK-associated protein 1                                              | -8,311852          |
| NCSTN                  | nicastin                                                              | 5,7913637          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                   | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ND4L                   | NADH dehydrogenase, subunit 4L (complex I)                                         | 2,0450783          |
| NDUFA4                 | NDUFA4, mitochondrial complex associated                                           | 6,0510125          |
| NDUFAF3                | NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 3                       | 2,3275483          |
| NDUFS6                 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase)  | 2,324092           |
| NEK6                   | NIMA-related kinase 6                                                              | 2,7081485          |
| NETO2                  | neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2                                          | 2,8916917          |
| NEURL3                 | neuralized E3 ubiquitin protein ligase 3                                           | -4,629878          |
| NFKBIB                 | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta | 2,1371298          |
| NFU1                   | NFU1 iron-sulfur cluster scaffold                                                  | -2,7523935         |
| NGDN                   | neuroguidin, EIF4E binding protein                                                 | 2,0320392          |
| NICN1                  | nicolin 1                                                                          | -17,699469         |
| NINL                   | ninein-like                                                                        | -5,676535          |
| NIPBL                  | Nipped-B homolog (Drosophila)                                                      | -9,356858          |
| NIPSNAP3A              | nipsnap homolog 3A (C. elegans)                                                    | 2,1898394          |
| NKAP                   | NFKB activating protein                                                            | 3,1371949          |
| NKX2-3                 | NK2 homeobox 3                                                                     | -6,4227166         |
| NKX2-5                 | NK2 homeobox 5                                                                     | 3,4368546          |
| NLE1                   | notchless homolog 1 (Drosophila)                                                   | 2,1734939          |
| NOC2L                  | nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae)                             | 2,075798           |
| NOL11                  | nucleolar protein 11                                                               | 2,698736           |
| NPEPPS                 | aminopeptidase puromycin sensitive                                                 | -3,2333493         |
| NPIP15                 | nuclear pore complex interacting protein family, member B15                        | 2,9263508          |
| NRBP1                  | nuclear receptor binding protein 1                                                 | -2,2795053         |
| NRIP1                  | nuclear receptor interacting protein 1                                             | -7,608413          |
| NSD1                   | nuclear receptor binding SET domain protein 1                                      | -2,755815          |
| NSUN4                  | NOP2/Sun domain family, member 4                                                   | -15,305274         |
| NT5DC1                 | 5'-nucleotidase domain containing 1                                                | -2,7875335         |
| NT5M                   | 5',3'-nucleotidase, mitochondrial                                                  | 2,2451205          |
| NTN1                   | netrin 1                                                                           | 2,5895495          |
| NUBP1                  | nucleotide binding protein 1                                                       | -3,317799          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                     | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| NUDCD3                 | NudC domain containing 3                                                                             | -5,9216003         |
| NUDT15                 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15                                         | -2,6642203         |
| NUP54                  | nucleoporin 54kDa                                                                                    | -7,2021008         |
| NUS1                   | nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                       | -2,0448923         |
| NUTF2                  | nuclear transport factor 2                                                                           | -9,361492          |
| NVL                    | nuclear VCP-like                                                                                     | -7,659001          |
| NXF1                   | nuclear RNA export factor 1                                                                          | -4,034794          |
| NXT1                   | nuclear transport factor 2-like export factor 1                                                      | -3,2433312         |
| OARD1                  | O-acyl-ADP-ribose deacylase 1                                                                        | 3,2255085          |
| OCRL                   | oculocerebrorenal syndrome of Lowe                                                                   | -2,015249          |
| OGFOD2                 | 2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 2                                      | -3,3443458         |
| OGFRL1                 | opioid growth factor receptor-like 1                                                                 | -5,821069          |
| OPA3                   | optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia)                            | -2,6944714         |
| OPTN                   | optineurin                                                                                           | 3,1797678          |
| OR2A42                 | olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 42                                                 | 5,498453           |
| OR7E156P               | olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 156 pseudogene                                     | -4,5150733         |
| OR7E37P                | olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 37 pseudogene                                      | 3,2122617          |
| ORC1                   | origin recognition complex, subunit 1                                                                | -3,0113776         |
| ORC3                   | origin recognition complex, subunit 3                                                                | 3,2239864          |
| OSBPL11                | oxysterol binding protein-like 11                                                                    | -5,8709254         |
| OSBPL2                 | oxysterol binding protein-like 2                                                                     | 2,3003104          |
| OSER1                  | oxidative stress responsive serine-rich 1                                                            | -2,0046868         |
| OSR2                   | odd-skipped related transcription factor 2                                                           | 2,072545           |
| OTUB1                  | OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 1                                                     | -13,095247         |
| OVOL2                  | ovo-like zinc finger 2                                                                               | -3,2847207         |
| P2RY2                  | purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2                                                        | 7,704723           |
| PABPC3                 | poly(A) binding protein, cytoplasmic 3                                                               | 3,0358295          |
| PACSIN3                | protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3                                            | 4,0988445          |
| PAICS                  | phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase | -3,7531726         |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                 | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|
| PAK1                   | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1                       | 2,268205           |
| PAK6                   | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6                       | 3,0450056          |
| PANK3                  | pantothenate kinase 3                                            | -2,345911          |
| PAPD4                  | PAP associated domain containing 4                               | -4,228498          |
| PAPD7                  | PAP associated domain containing 7                               | 2,00496            |
| PAQR6                  | progesterin and adipoQ receptor family member VI                 | -3,5788229         |
| PARL                   | presenilin associated, rhomboid-like                             | -2,804179          |
| PARPBP                 | PARP1 binding protein                                            | -4,148255          |
| PARVA                  | parvin, alpha                                                    | 2,964047           |
| PAXIP1                 | PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1 | -2,2586844         |
| PCBP4                  | poly(rC) binding protein 4                                       | -2,611007          |
| PCDH1                  | protocadherin 1                                                  | 2,405886           |
| PCF11                  | PCF11 cleavage and polyadenylation factor subunit                | -7,262643          |
| PCNXL4                 | pecanex-like 4 (Drosophila)                                      | -2,159922          |
| PCYOX1                 | prenylcysteine oxidase 1                                         | -2,0113184         |
| PDCD2                  | programmed cell death 2                                          | -6,826657          |
| PDDC1                  | Parkinson disease 7 domain containing 1                          | 2,4466872          |
| PDE8A                  | phosphodiesterase 8A                                             | 4,4790826          |
| PDGFC                  | platelet derived growth factor C                                 | -4,549255          |
| PDHB                   | pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta                          | -2,1047175         |
| PDIA3                  | protein disulfide isomerase family A, member 3                   | 2,4157617          |
| PDRG1                  | p53 and DNA-damage regulated 1                                   | -2,4085577         |
| PDSS1                  | prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1              | -6,2561007         |
| PELI1                  | pellino E3 ubiquitin protein ligase 1                            | -5,6348476         |
| PER3                   | period circadian clock 3                                         | 9,024761           |
| PEX7                   | peroxisomal biogenesis factor 7                                  | -4,893942          |
| PFKL                   | phosphofructokinase, liver                                       | 3,5242984          |
| PFKM                   | phosphofructokinase, muscle                                      | -2,9661412         |
| PFN1                   | profilin 1                                                       | 2,302902           |
| PFN1P2                 | profilin 1 pseudogene 2                                          | 2,3481328          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                          | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| PFN2                   | profilin 2                                                                | 2,315223           |
| PGA4                   | pepsinogen 4, group I (pepsinogen A)                                      | -2,3727612         |
| PHACTR4                | phosphatase and actin regulator 4                                         | -6,9711833         |
| PHF19                  | PHD finger protein 19                                                     | 214,90749          |
| PHF3                   | PHD finger protein 3                                                      | 3,3853993          |
| PHLDA2                 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 2                       | 3,0996163          |
| PHLDA3                 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 3                       | -2,344233          |
| PI3                    | peptidase inhibitor 3, skin-derived                                       | 2,920596           |
| PIAS2                  | protein inhibitor of activated STAT, 2                                    | 3,7601209          |
| PIAS3                  | protein inhibitor of activated STAT, 3                                    | 2,8205173          |
| PIGQ                   | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q                  | -5,674153          |
| PIGS                   | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S                  | -2,0836453         |
| PIK3C2A                | phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha | 7,799918           |
| PIM1                   | Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase                             | -2,1426742         |
| PKN2                   | protein kinase N2                                                         | -3,81427           |
| PLA2G16                | phospholipase A2, group XVI                                               | -2,144928          |
| PLCXD1                 | phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1      | -2,0111656         |
| PLD2                   | phospholipase D2                                                          | 2,0470731          |
| PLGRKT                 | plasminogen receptor, C-terminal lysine transmembrane protein             | 2,1764615          |
| PLOD2                  | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2                        | -4,8475027         |
| PLP2                   | proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)                       | 3,9883852          |
| PLS3                   | plastin 3                                                                 | 3,2211447          |
| PMS2                   | PMS2 postmeiotic segregation increased 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )         | -3,429573          |
| PNKD                   | paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia                                      | 3,160428           |
| PNRC2                  | proline-rich nuclear receptor coactivator 2                               | 2,6199663          |
| POLL                   | polymerase (DNA directed), lambda                                         | 4,2002845          |
| POLR1C                 | polymerase (RNA) I polypeptide C, 30kDa                                   | 2,4409087          |
| POLR2G                 | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G                          | -2,0496337         |
| POLR2J3                | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J3                         | 2,1713226          |
| POLR3GL                | polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)-like             | -3,4873812         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                               | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| POLRMT                 | polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)                                  | -4,7252097         |
| POMT1                  | protein-O-mannosyltransferase 1                                                | -2,9448597         |
| POP4                   | processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP subunit ( <i>S. cerevisiae</i> ) | 35,41072           |
| PPARD                  | peroxisome proliferator-activated receptor delta                               | -2,6392088         |
| PPIL3                  | peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3                                  | -10,783433         |
| PPM1B                  | protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1B          | 3,751812           |
| PPM1D                  | protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1D          | 2,6587331          |
| PPM1F                  | protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1F          | 2,266691           |
| PPP1R10                | protein phosphatase 1, regulatory subunit 10                                   | -3,8157477         |
| PPP1R18                | protein phosphatase 1, regulatory subunit 18                                   | -4,9725695         |
| PPP1R8                 | protein phosphatase 1, regulatory subunit 8                                    | -2,0476525         |
| PPP2R5D                | protein phosphatase 2, regulatory subunit B', delta                            | -4,644274          |
| PPP3CA                 | protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme                        | -4,1644998         |
| PPP3CB                 | protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isozyme                         | 3,2454545          |
| PPP4C                  | protein phosphatase 4, catalytic subunit                                       | 2,1697314          |
| PPRC1                  | peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1        | 2,621718           |
| PRAF2                  | PRA1 domain family, member 2                                                   | 3,4635112          |
| PRDX1                  | peroxiredoxin 1                                                                | 3,7936633          |
| PRDX3                  | peroxiredoxin 3                                                                | -3,654062          |
| PRKACA                 | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha                               | 2,585389           |
| PRKAG2                 | protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit                   | -2,8231668         |
| PRKD3                  | protein kinase D3                                                              | 4,1380596          |
| PRKRIP1                | PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible)                                    | 2,1679623          |
| PRKY                   | protein kinase, Y-linked, pseudogene                                           | -15,856824         |
| PRMT6                  | protein arginine methyltransferase 6                                           | -2,317182          |
| PRPF8                  | pre-mRNA processing factor 8                                                   | 2,319155           |
| PRR15L                 | proline rich 15-like                                                           | -2,8023517         |
| PRR5                   | proline rich 5 (renal)                                                         | -4,4465814         |
| PRR5-ARHGAP8           | PRR5-ARHGAP8 readthrough                                                       | 3,1761346          |
| PRRC1                  | proline-rich coiled-coil 1                                                     | -4,3509007         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                    | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| PRSS22                 | protease, serine, 22                                                                | -3,917542          |
| PSCA                   | prostate stem cell antigen                                                          | -2,2139697         |
| PSENEN                 | presenilin enhancer gamma secretase subunit                                         | 5,3210034          |
| PSMB3                  | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3                               | 2,2820516          |
| PSMD10                 | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10                         | -2,0432782         |
| PSMD13                 | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13                         | 2,567699           |
| PSMD14                 | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14                         | 2,7448368          |
| PSMD5                  | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5                          | 4,2202353          |
| PSORS1C1               | psoriasis susceptibility 1 candidate 1                                              | -2,0196774         |
| PSRC1                  | proline/serine-rich coiled-coil 1                                                   | 4,35602            |
| PTAR1                  | protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1                         | 2,7142627          |
| PTCD1                  | pentatricopeptide repeat domain 1                                                   | -2,356011          |
| PTP4A2                 | protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2                                     | -3,2966716         |
| PTPLA                  | protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member A | 2,8569226          |
| PTPMT1                 | protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1                                       | 2,0792823          |
| PTPRU                  | protein tyrosine phosphatase, receptor type, U                                      | -3,3324885         |
| PTRF                   | polymerase I and transcript release factor                                          | 6,0153146          |
| PTRH2                  | peptidyl-tRNA hydrolase 2                                                           | 6,5054064          |
| PVALB                  | parvalbumin                                                                         | 3,444385           |
| PVRL4                  | poliovirus receptor-related 4                                                       | -2,1550992         |
| PWWP2A                 | PWWP domain containing 2A                                                           | -5,2987113         |
| PYCARD                 | PYD and CARD domain containing                                                      | -2,5483048         |
| QTRTD1                 | queuine tRNA-ribosyltransferase domain containing 1                                 | -2,4378216         |
| RAB13                  | RAB13, member RAS oncogene family                                                   | 3,555326           |
| RAB1B                  | RAB1B, member RAS oncogene family                                                   | -3,1992114         |
| RAB26                  | RAB26, member RAS oncogene family                                                   | -25,434748         |
| RAB2A                  | RAB2A, member RAS oncogene family                                                   | -3,6965513         |
| RAB43                  | RAB43, member RAS oncogene family                                                   | 2,237514           |
| RAB5B                  | RAB5B, member RAS oncogene family                                                   | -2,4949744         |
| RAB6A                  | RAB6A, member RAS oncogene family                                                   | -2,3482943         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                       | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| RABEP2                 | rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2                        | -2,4184587         |
| RALA                   | v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)           | -7,02061           |
| RANBP3                 | RAN binding protein 3                                                  | -2,2132535         |
| RANBP6                 | RAN binding protein 6                                                  | -2,2040665         |
| RARA                   | retinoic acid receptor, alpha                                          | 6,901033           |
| RARRES1                | retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1                | -2,1402543         |
| RARS2                  | arginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial                               | 6,3161283          |
| RASA1                  | RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1                | -2,0805624         |
| RBBP6                  | retinoblastoma binding protein 6                                       | 6,5856953          |
| RBCK1                  | RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1                     | -6,5024486         |
| RBM10                  | RNA binding motif protein 10                                           | -2,0703905         |
| RBM18                  | RNA binding motif protein 18                                           | -2,1837652         |
| RBMS2                  | RNA binding motif, single stranded interacting protein 2               | 3,2203069          |
| RBP4                   | retinol binding protein 4, plasma                                      | 2,4325938          |
| RBPJ                   | recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region | 2,156636           |
| RCAN3                  | RCAN family member 3                                                   | -2,0170083         |
| RCL1                   | RNA terminal phosphate cyclase-like 1                                  | -2,113308          |
| REEP4                  | receptor accessory protein 4                                           | -2,8841853         |
| RELL2                  | RELT-like 2                                                            | 2,112047           |
| REV3L                  | REV3-like, polymerase (DNA directed), zeta, catalytic subunit          | -2,920511          |
| RFWD2                  | ring finger and WD repeat domain 2, E3 ubiquitin protein ligase        | -3,3601866         |
| RFWD3                  | ring finger and WD repeat domain 3                                     | 2,1822839          |
| RGP1                   | RGP1 retrograde golgi transport homolog (S. cerevisiae)                | -3,822065          |
| RGS2                   | regulator of G-protein signaling 2                                     | -3,265715          |
| RHBDF2                 | rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)                                      | -2,2248616         |
| RHOBTB1                | Rho-related BTB domain containing 1                                    | -4,0841827         |
| RHOC                   | ras homolog family member C                                            | 3,1389673          |
| RHOQ                   | ras homolog family member Q                                            | 2,0787091          |
| RHOV                   | ras homolog family member V                                            | 3,761993           |
| RIC8A                  | RIC8 guanine nucleotide exchange factor A                              | -4,941522          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                        | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| RILPL1                 | Rab interacting lysosomal protein-like 1                                | -2,2090893         |
| RIN2                   | Ras and Rab interactor 2                                                | 3,1875272          |
| RINL                   | Ras and Rab interactor-like                                             | -2,0273151         |
| RLF                    | rearranged L-myc fusion                                                 | -3,5846853         |
| RNF10                  | ring finger protein 10                                                  | 2,0527291          |
| RNF114                 | ring finger protein 114                                                 | -2,1860766         |
| RNF139                 | ring finger protein 139                                                 | 2,1271074          |
| RNF141                 | ring finger protein 141                                                 | -5,035361          |
| RNF34                  | ring finger protein 34, E3 ubiquitin protein ligase                     | 2,0219495          |
| RNF38                  | ring finger protein 38                                                  | -8,609178          |
| RNMTL1                 | RNA methyltransferase like 1                                            | -6,0399027         |
| RNPC3                  | RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3                             | 4,0135145          |
| RP9                    | retinitis pigmentosa 9 (autosomal dominant)                             | 2,5720587          |
| RPA3                   | replication protein A3, 14kDa                                           | 2,063016           |
| RPF2                   | ribosome production factor 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )           | 2,2985206          |
| RPL13AP3               | ribosomal protein L13a pseudogene 3                                     | -2,4379401         |
| RPL13P5                | ribosomal protein L13 pseudogene 5                                      | 3,8848863          |
| RPL21P44               | ribosomal protein L21 pseudogene 44                                     | 2,1380186          |
| RPL4                   | ribosomal protein L4                                                    | 2,5560942          |
| RPS6KA2                | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2                       | -3,8274276         |
| RPS6KA4                | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4                       | 2,3992028          |
| RPTOR                  | regulatory associated protein of MTOR, complex 1                        | -3,322419          |
| RPUSD2                 | RNA pseudouridylate synthase domain containing 2                        | 5,350932           |
| RRAGC                  | Ras-related GTP binding C                                               | -2,6442049         |
| RRP1B                  | ribosomal RNA processing 1B                                             | -4,4065347         |
| RRP8                   | ribosomal RNA processing 8, methyltransferase, homolog ( <i>yeast</i> ) | -3,4723876         |
| RRS1                   | RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )     | -5,287889          |
| RSAD1                  | radical S-adenosyl methionine domain containing 1                       | -3,4863462         |
| RSC1A1                 | regulatory solute carrier protein, family 1, member 1                   | -2,0600846         |
| RSL24D1                | ribosomal L24 domain containing 1                                       | -3,8415678         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| RSRC2                  | arginine/serine-rich coiled-coil 2                                                            | -2,5232003         |
| RTN3                   | reticulon 3                                                                                   | -3,2990348         |
| RUFY1                  | RUN and FYVE domain containing 1                                                              | -2,7548616         |
| RUNX3                  | runt-related transcription factor 3                                                           | -2,4666731         |
| RUSC2                  | RUN and SH3 domain containing 2                                                               | -3,0045116         |
| RWDD2B                 | RWD domain containing 2B                                                                      | 2,238523           |
| RXRA                   | retinoid X receptor, alpha                                                                    | -2,9216192         |
| SACM1L                 | SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (yeast)                                             | -20,67895          |
| SAP130                 | Sin3A-associated protein, 130kDa                                                              | 2,1513095          |
| SAPCD2                 | suppressor APC domain containing 2                                                            | -3,5798771         |
| SARNP                  | SAP domain containing ribonucleoprotein                                                       | 2,0103998          |
| SART3                  | squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3                                       | -4,3965287         |
| SAV1                   | salvador family WW domain containing protein 1                                                | -2,2498307         |
| SBF1P1                 | SET binding factor 1 pseudogene 1                                                             | -5,5015492         |
| SCAP                   | SREBF chaperone                                                                               | -2,9565217         |
| SCARA3                 | scavenger receptor class A, member 3                                                          | 7,207585           |
| SCO1                   | SCO1 cytochrome c oxidase assembly protein                                                    | -3,340212          |
| SDF2L1                 | stromal cell-derived factor 2-like 1                                                          | -2,2985373         |
| SDSL                   | serine dehydratase-like                                                                       | 2,3514879          |
| SEC22B                 | SEC22 vesicle trafficking protein homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> ) (gene/pseudogene)        | -2,478342          |
| SEC63                  | SEC63 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )                                                        | -2,013001          |
| SEH1L                  | SEH1-like ( <i>S. cerevisiae</i> )                                                            | -2,212751          |
| SELENBP1               | selenium binding protein 1                                                                    | -2,6047251         |
| SELK                   | selenoprotein K                                                                               | -3,2385495         |
| SELT                   | selenoprotein T                                                                               | -2,272748          |
| SERF1B                 | small EDRK-rich factor 1B (centromeric)                                                       | -2,407211          |
| SERINC1                | serine incorporator 1                                                                         | 2,2478998          |
| SERINC3                | serine incorporator 3                                                                         | -3,220904          |
| SERPINB6               | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6                                     | 3,1894896          |
| SERPINE2               | serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 | -3,9739006         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                         | <b>Fold change</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| SERTAD1                | SERTA domain containing 1                                                                | 2,5230117          |
| SETDB1                 | SET domain, bifurcated 1                                                                 | -3,033262          |
| SF3A2                  | splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa                                                     | 2,0685465          |
| SF3B4                  | splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa                                                     | -3,1699            |
| SFT2D2                 | SFT2 domain containing 2                                                                 | 2,1890073          |
| SFTPA2                 | surfactant protein A2                                                                    | 4,273118           |
| SGCD                   | sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)                            | 9,853295           |
| SGOL2                  | shugoshin-like 2 (S. pombe)                                                              | -7,0446887         |
| SGTA                   | small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha                    | -2,0206149         |
| SH3BGRL3               | SH3 domain binding glutamate-rich protein like 3                                         | 2,1033251          |
| SH3GLB1                | SH3-domain GRB2-like endophilin B1                                                       | -12,159431         |
| SH3KBP1                | SH3-domain kinase binding protein 1                                                      | -4,910074          |
| SH3PXD2B               | SH3 and PX domains 2B                                                                    | -3,0100112         |
| SHARPIN                | SHANK-associated RH domain interactor                                                    | 2,0203316          |
| SIGMAR1                | sigma non-opioid intracellular receptor 1                                                | 7,3367887          |
| SIPA1                  | signal-induced proliferation-associated 1                                                | -2,2420254         |
| SKAP2                  | src kinase associated phosphoprotein 2                                                   | -2,88229           |
| SKIV2L                 | superkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae)                                  | -3,2252824         |
| SKIV2L2                | superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S. cerevisiae)                                | -2,0227144         |
| SKP2                   | S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase                         | 3,5977538          |
| SLC15A4                | solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 4                            | 2,0522957          |
| SLC16A2                | solute carrier family 16, member 2 (thyroid hormone transporter)                         | -2,1157668         |
| SLC25A1                | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1          | 2,6674752          |
| SLC25A29               | solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier), member 29      | 2,0970397          |
| SLC25A33               | solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33                      | 2,2788875          |
| SLC25A46               | solute carrier family 25, member 46                                                      | -6,951515          |
| SLC26A2                | solute carrier family 26 (anion exchanger), member 2                                     | 2,277344           |
| SLC2A4RG               | SLC2A4 regulator                                                                         | -2,215196          |
| SLC35A2                | solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2                          | -7,389941          |
| SLC35B3                | solute carrier family 35 (adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter), member B3 | -2,0505476         |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                  | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| SLC35E2                | solute carrier family 35, member E2                                                               | 2,0974743          |
| SLC36A1                | solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1                                  | -8,390696          |
| SLC38A7                | solute carrier family 38, member 7                                                                | 2,6033585          |
| SLC39A14               | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14                                            | 2,0711884          |
| SLC44A3                | solute carrier family 44, member 3                                                                | 2,1212401          |
| SLC4A1AP               | solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, adaptor protein                              | 9,322781           |
| SLITRK6                | SLIT and NTRK-like family, member 6                                                               | -28,054071         |
| SLMO1                  | slowmo homolog 1 (Drosophila)                                                                     | -4,5708756         |
| SLMO2                  | slowmo homolog 2 (Drosophila)                                                                     | -7,2449107         |
| SLTM                   | SAFB-like, transcription modulator                                                                | -2,2121608         |
| SMAD1                  | SMAD family member 1                                                                              | 2,4419594          |
| SMAGP                  | small cell adhesion glycoprotein                                                                  | -3,8672416         |
| SMARCC1                | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1 | 2,0716925          |
| SMARCC2                | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2 | 7,786864           |
| SMC3                   | structural maintenance of chromosomes 3                                                           | 2,896915           |
| SMEK2                  | SMEK homolog 2, suppressor of mek1 (Dictyostelium)                                                | -3,4656985         |
| SMIM3                  | small integral membrane protein 3                                                                 | -10,14641          |
| SMYD2                  | SET and MYND domain containing 2                                                                  | -5,011086          |
| SNF8                   | SNF8, ESCRT-II complex subunit                                                                    | 3,2431104          |
| SNRNP27                | small nuclear ribonucleoprotein 27kDa (U4/U6.U5)                                                  | 2,2476494          |
| SNW1                   | SNW domain containing 1                                                                           | -2,1991887         |
| SNX5                   | sorting nexin 5                                                                                   | -3,3926914         |
| SON                    | SON DNA binding protein                                                                           | -8,377569          |
| SORT1                  | sortilin 1                                                                                        | -3,533814          |
| SOSTDC1                | sclerostin domain containing 1                                                                    | 3,552395           |
| SPATA5L1               | spermatogenesis associated 5-like 1                                                               | -3,5159378         |
| SPATS2L                | spermatogenesis associated, serine-rich 2-like                                                    | -4,889378          |
| SPDEF                  | SAM pointed domain containing ETS transcription factor                                            | -4,368834          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| SPG7                   | spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)                                               | 2,5483165          |
| SPHK2                  | sphingosine kinase 2                                                                                          | -2,9061425         |
| SPIN1                  | spindlin 1                                                                                                    | -5,155939          |
| SPINT1                 | serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1                                                                     | -2,5802891         |
| SPPL2A                 | signal peptide peptidase like 2A                                                                              | -5,7733836         |
| SPRY1                  | sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)                                                   | 2,5069985          |
| SPTLC1                 | serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1                                                        | 2,7153933          |
| SRRM1                  | serine/arginine repetitive matrix 1                                                                           | 2,065064           |
| SRSF9                  | serine/arginine-rich splicing factor 9                                                                        | -2,7949739         |
| SSB                    | Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)                                                                   | -6,350672          |
| SSX2IP                 | synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein                                                          | 2,8540545          |
| ST6GALNAC5             | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5 | 2,2716012          |
| ST8SIA1                | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1                                                  | -2,2360694         |
| STAG2                  | stromal antigen 2                                                                                             | -4,5647855         |
| STAG3L2                | stromal antigen 3-like 2 (pseudogene)                                                                         | 7,522934           |
| STAU1                  | staufen double-stranded RNA binding protein 1                                                                 | 2,0159452          |
| STAU2                  | staufen double-stranded RNA binding protein 2                                                                 | 2,0394223          |
| STK11IP                | serine/threonine kinase 11 interacting protein                                                                | 2,920843           |
| STK25                  | serine/threonine kinase 25                                                                                    | -3,162058          |
| STK3                   | serine/threonine kinase 3                                                                                     | -2,1217213         |
| STK4                   | serine/threonine kinase 4                                                                                     | -13,715168         |
| STX10                  | syntaxin 10                                                                                                   | 3,7498074          |
| STX4                   | syntaxin 4                                                                                                    | -2,526585          |
| SUDS3                  | suppressor of defective silencing 3 homolog (S. cerevisiae)                                                   | 9,220771           |
| SUPV3L1                | suppressor of var1, 3-like 1 (S. cerevisiae)                                                                  | -2,311805          |
| SURF2                  | surfeit 2                                                                                                     | 2,4143393          |
| SUV39H2                | suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)                                                          | -2,1928031         |
| SYNGR1                 | synaptogyrin 1                                                                                                | -2,5151637         |
| SYTL1                  | synaptotagmin-like 1                                                                                          | 2,4436388          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                                        | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| TAF5L                  | TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa | 2,157357           |
| TANC1                  | tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1                   | -4,6105533         |
| TBC1D1                 | TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1                                  | -2,6768115         |
| TBC1D10B               | TBC1 domain family, member 10B                                                          | 3,4655862          |
| TBPL1                  | TBP-like 1                                                                              | -26,399572         |
| TBRG4                  | transforming growth factor beta regulator 4                                             | -3,2642052         |
| TCAP                   | titin-cap                                                                               | 2,4225934          |
| TCEA1                  | transcription elongation factor A (SII), 1                                              | -3,649379          |
| TCEB3                  | transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kDa, elongin A)             | -6,307108          |
| TCF15                  | transcription factor 15 (basic helix-loop-helix)                                        | -2,0521579         |
| TCP1                   | t-complex 1                                                                             | -3,4339786         |
| TCTEX1D2               | Tctex1 domain containing 2                                                              | 2,2536688          |
| TECPR1                 | tectonin beta-propeller repeat containing 1                                             | 3,8928092          |
| TEN1                   | TEN1 CST complex subunit                                                                | 2,36617            |
| TEP1                   | telomerase-associated protein 1                                                         | -5,710217          |
| TERF1                  | telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1                                    | -2,2129726         |
| TET1                   | tet methylcytosine dioxygenase 1                                                        | -2,8198452         |
| TEX261                 | testis expressed 261                                                                    | -2,2972012         |
| TEX41                  | testis expressed 41 (non-protein coding)                                                | -3,5508351         |
| TFCP2L1                | transcription factor CP2-like 1                                                         | 3,5874422          |
| TGIF1                  | TGFB-induced factor homeobox 1                                                          | 2,4742448          |
| THAP3                  | THAP domain containing, apoptosis associated protein 3                                  | -5,9146624         |
| THBS1                  | thrombospondin 1                                                                        | -2,831994          |
| THRA                   | thyroid hormone receptor, alpha                                                         | -5,6858563         |
| TIMELESS               | timeless circadian clock                                                                | -2,0792217         |
| TIMM10B                | translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog B (yeast)                        | 2,4665444          |
| TIMM17A                | translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)                        | -2,3153179         |
| TIMM9                  | translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)                           | 2,8614957          |
| TIPIN                  | TIMELESS interacting protein                                                            | -8,296387          |
| TIPRL                  | TOR signaling pathway regulator                                                         | 2,6130462          |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                             | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| TLDC1                  | TBC/LysM-associated domain containing 1                      | 4,111244           |
| TLE2                   | transducin-like enhancer of split 2                          | -3,0331438         |
| TM2D1                  | TM2 domain containing 1                                      | -9,540548          |
| TM2D3                  | TM2 domain containing 3                                      | 15,043198          |
| TM9SF1                 | transmembrane 9 superfamily member 1                         | -2,925409          |
| TM9SF2                 | transmembrane 9 superfamily member 2                         | 2,037123           |
| TMC4                   | transmembrane channel-like 4                                 | -4,4445157         |
| TMED4                  | transmembrane emp24 protein transport domain containing 4    | -2,1289911         |
| TMED7-TICAM2           | TMED7-TICAM2 readthrough                                     | 2,507329           |
| TMED9                  | transmembrane emp24 protein transport domain containing 9    | 3,4893782          |
| TMEM109                | transmembrane protein 109                                    | 2,1510186          |
| TMEM159                | transmembrane protein 159                                    | 2,8309758          |
| TMEM160                | transmembrane protein 160                                    | 2,3621833          |
| TMEM201                | transmembrane protein 201                                    | -2,6642778         |
| TMEM203                | transmembrane protein 203                                    | -8,954825          |
| TMEM229B               | transmembrane protein 229B                                   | -9,470547          |
| TMEM237                | transmembrane protein 237                                    | 8,229196           |
| TMEM243                | transmembrane protein 243, mitochondrial                     | -2,4865067         |
| TMEM248                | transmembrane protein 248                                    | 2,177961           |
| TMEM263                | transmembrane protein 263                                    | -6,024109          |
| TMEM42                 | transmembrane protein 42                                     | -2,1935294         |
| TMEM55B                | transmembrane protein 55B                                    | -2,2911813         |
| TMEM65                 | transmembrane protein 65                                     | 2,3623471          |
| TMEM88B                | transmembrane protein 88B                                    | 2,8080482          |
| TMTC1                  | transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1      | 87,32958           |
| TNFAIP1                | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial) | -3,3916867         |
| TNFAIP2                | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2               | -5,8657894         |
| TNK1                   | tyrosine kinase, non-receptor, 1                             | 2,208473           |
| TNK2                   | tyrosine kinase, non-receptor, 2                             | -4,863847          |
| TNRC6A                 | trinucleotide repeat containing 6A                           | -3,6993906         |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                               | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------|
| TNXB                   | tenascin XB                                                    | -7,679137          |
| TOMM40                 | translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast) | 2,359421           |
| TOR2A                  | torsin family 2, member A                                      | 2,9576156          |
| TP53I3                 | tumor protein p53 inducible protein 3                          | 3,4301887          |
| TPGS2                  | tubulin polyglutamylase complex subunit 2                      | 4,131586           |
| TPI1P2                 | triosephosphate isomerase 1 pseudogene 2                       | 2,3189802          |
| TPR                    | translocated promoter region, nuclear basket protein           | 2,4402506          |
| TPRKB                  | TP53RK binding protein                                         | -2,752175          |
| TPT1-AS1               | TPT1 antisense RNA 1                                           | 2,103861           |
| TRAF4                  | TNF receptor-associated factor 4                               | 2,4989374          |
| TRAF6                  | TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase  | 2,0258996          |
| TRIAP1                 | TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1                        | -7,193096          |
| TRIM11                 | tripartite motif containing 11                                 | -2,210765          |
| TRIM13                 | tripartite motif containing 13                                 | -2,2386577         |
| TRIM25                 | tripartite motif containing 25                                 | -3,5872595         |
| TRIM44                 | tripartite motif containing 44                                 | 5,016039           |
| TRIM65                 | tripartite motif containing 65                                 | -3,0737584         |
| TRIP10                 | thyroid hormone receptor interactor 10                         | 2,6281137          |
| TRIP12                 | thyroid hormone receptor interactor 12                         | 2,0932775          |
| TRIP6                  | thyroid hormone receptor interactor 6                          | -2,3735533         |
| TRMT5                  | tRNA methyltransferase 5                                       | 3,3965375          |
| TRRAP                  | transformation/transcription domain-associated protein         | -10,616649         |
| TSACC                  | TSSK6 activating co-chaperone                                  | -2,8278522         |
| TSEN54                 | TSEN54 tRNA splicing endonuclease subunit                      | 2,5742753          |
| TSPAN3                 | tetraspanin 3                                                  | -3,947653          |
| TSPAN6                 | tetraspanin 6                                                  | -4,973161          |
| TTC27                  | tetratricopeptide repeat domain 27                             | 2,2930799          |
| TTC3                   | tetratricopeptide repeat domain 3                              | -2,2550712         |
| TTC5                   | tetratricopeptide repeat domain 5                              | -4,603736          |
| TTC7B                  | tetratricopeptide repeat domain 7B                             | 3,017805           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                               | <b>Fold change</b> |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------|
| TTK                    | TTK protein kinase                                             | -4,449438          |
| TUBG2                  | tubulin, gamma 2                                               | 2,5482247          |
| TULP3                  | tubby like protein 3                                           | 2,1998446          |
| TWF1                   | twinfilin actin-binding protein 1                              | -2,0769594         |
| TWF2                   | twinfilin actin-binding protein 2                              | -3,9187114         |
| TXN2                   | thioredoxin 2                                                  | -2,258559          |
| UBA1                   | ubiquitin-like modifier activating enzyme 1                    | -2,2587187         |
| UBA5                   | ubiquitin-like modifier activating enzyme 5                    | -6,33297           |
| UBALD2                 | UBA-like domain containing 2                                   | 2,0946214          |
| UBC                    | ubiquitin C                                                    | 2,1872122          |
| UBE2F                  | ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)                    | -7,159458          |
| UBE3C                  | ubiquitin protein ligase E3C                                   | -2,682547          |
| UBR2                   | ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2             | -4,2320256         |
| UBR7                   | ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)  | -8,962198          |
| UBXN8                  | UBX domain protein 8                                           | 2,0034802          |
| UCA1                   | urothelial cancer associated 1 (non-protein coding)            | -2,3608088         |
| UCHL5                  | ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5                       | -2,937233          |
| UGCG                   | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase                       | 3,310008           |
| UIMC1                  | ubiquitin interaction motif containing 1                       | -2,4053364         |
| UNC119B                | unc-119 homolog B (C. elegans)                                 | -2,6080039         |
| UNC93A                 | unc-93 homolog A (C. elegans)                                  | -12,402666         |
| UNC93B1                | unc-93 homolog B1 (C. elegans)                                 | -2,827142          |
| USE1                   | unconventional SNARE in the ER 1 homolog (S. cerevisiae)       | -2,6523364         |
| USP3                   | ubiquitin specific peptidase 3                                 | 4,1291723          |
| USP34                  | ubiquitin specific peptidase 34                                | -8,9589405         |
| USP5                   | ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)                | -3,7760797         |
| USP54                  | ubiquitin specific peptidase 54                                | -3,7058926         |
| UTP14C                 | UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C (yeast) | -13,675254         |
| VAMP3                  | vesicle-associated membrane protein 3                          | -2,9269469         |
| VANGL1                 | VANGL planar cell polarity protein 1                           | 4,285936           |

| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                                              | <b>Fold change</b> |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| VARS                   | valyl-tRNA synthetase                                                         | 2,6144302          |
| VEZT                   | vezatin, adherens junctions transmembrane protein                             | -2,6210673         |
| VIM                    | vimentin                                                                      | 21,144852          |
| VIMP                   | VCP-interacting membrane protein                                              | -7,583621          |
| VKORC1L1               | vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1                         | 3,0710754          |
| VPS18                  | vacuolar protein sorting 18 homolog (S. cerevisiae)                           | -2,3601387         |
| VPS26B                 | vacuolar protein sorting 26 homolog B (S. pombe)                              | 2,9529767          |
| VPS37B                 | vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)                         | 2,0318928          |
| VPS4A                  | vacuolar protein sorting 4 homolog A (S. cerevisiae)                          | 2,4602554          |
| VTA1                   | vesicle (multivesicular body) trafficking 1                                   | -2,3686934         |
| VTCN1                  | V-set domain containing T cell activation inhibitor 1                         | -2,0515049         |
| WARS                   | tryptophanyl-tRNA synthetase                                                  | 2,0477986          |
| WDR12                  | WD repeat domain 12                                                           | 2,7915413          |
| WDR33                  | WD repeat domain 33                                                           | -4,5998573         |
| WDR74                  | WD repeat domain 74                                                           | 2,0252712          |
| WIPI1                  | WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1                              | 10,740844          |
| WLS                    | wntless Wnt ligand secretion mediator                                         | -6,472284          |
| WRNIP1                 | Werner helicase interacting protein 1                                         | 7,577097           |
| WSB1                   | WD repeat and SOCS box containing 1                                           | 2,3663163          |
| XIAP                   | X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase                  | -4,4193206         |
| XLOC_12_013383         |                                                                               | 2,454724           |
| YBX1                   | Y box binding protein 1                                                       | -2,7052205         |
| YIPF2                  | Yip1 domain family, member 2                                                  | -6,6131387         |
| YIPF5                  | Yip1 domain family, member 5                                                  | -7,972864          |
| YOD1                   | YOD1 deubiquitinase                                                           | -2,8595245         |
| YTHDF2                 | YTH N(6)-methyladenosine RNA binding protein 2                                | -3,044119          |
| YTHDF3                 | YTH N(6)-methyladenosine RNA binding protein 3                                | 4,7978315          |
| YWHAQ                  | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta | -2,067938          |
| YWHAZ                  | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta  | 2,1649892          |
| ZADH2                  | zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2                        | -4,090282          |

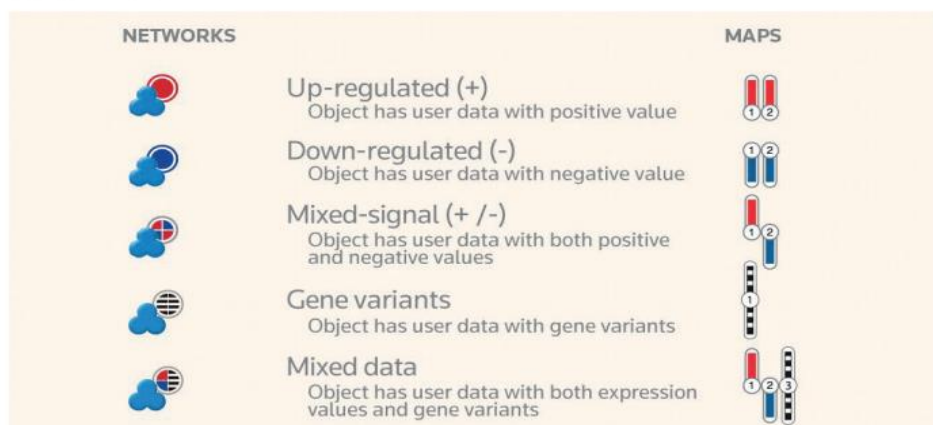
| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                                             | <b>Fold change</b> |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| ZAK                    | sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK | -2,224072          |
| ZASP                   | ZO-2 associated speckle protein                              | -4,6947803         |
| ZBED3                  | zinc finger, BED-type containing 3                           | 2,2760873          |
| ZBTB2                  | zinc finger and BTB domain containing 2                      | 2,5022087          |
| ZC3H15                 | zinc finger CCCH-type containing 15                          | 2,1074405          |
| ZC3H7A                 | zinc finger CCCH-type containing 7A                          | -4,1084933         |
| ZC3HC1                 | zinc finger, C3HC-type containing 1                          | -3,2593787         |
| ZDHHC23                | zinc finger, DHHC-type containing 23                         | -3,0622246         |
| ZDHHC9                 | zinc finger, DHHC-type containing 9                          | -2,488141          |
| ZFYVE16                | zinc finger, FYVE domain containing 16                       | 2,4376597          |
| ZHX3                   | zinc fingers and homeoboxes 3                                | -2,0430353         |
| ZMPSTE24               | zinc metalloproteinase STE24                                 | -9,849352          |
| ZNF106                 | zinc finger protein 106                                      | -2,2369313         |
| ZNF131                 | zinc finger protein 131                                      | -2,5379877         |
| ZNF142                 | zinc finger protein 142                                      | -3,4232502         |
| ZNF219                 | zinc finger protein 219                                      | -6,62275           |
| ZNF22                  | zinc finger protein 22                                       | -8,378957          |
| ZNF226                 | zinc finger protein 226                                      | -3,0378973         |
| ZNF239                 | zinc finger protein 239                                      | 2,6720576          |
| ZNF252P                | zinc finger protein 252, pseudogene                          | 2,2694392          |
| ZNF286B                | zinc finger protein 286B                                     | -8,384904          |
| ZNF335                 | zinc finger protein 335                                      | 2,9562259          |
| ZNF354A                | zinc finger protein 354A                                     | 3,6701796          |
| ZNF37A                 | zinc finger protein 37A                                      | 2,2515202          |
| ZNF385A                | zinc finger protein 385A                                     | -2,213719          |
| ZNF398                 | zinc finger protein 398                                      | -2,4078364         |
| ZNF436-AS1             | ZNF436 antisense RNA 1                                       | 3,114444           |
| ZNF438                 | zinc finger protein 438                                      | -11,142755         |
| ZNF467                 | zinc finger protein 467                                      | -11,883827         |
| ZNF469                 | zinc finger protein 469                                      | 2,4026952          |



| <b>Símbolo do gene</b> | <b>Descrição</b>                             | <b><i>Fold change</i></b> |
|------------------------|----------------------------------------------|---------------------------|
| ZNF511                 | zinc finger protein 511                      | -4,7703466                |
| ZNF528-AS1             | ZNF528 antisense RNA 1                       | -5,073515                 |
| ZNF574                 | zinc finger protein 574                      | -6,616291                 |
| ZNF627                 | zinc finger protein 627                      | -8,185733                 |
| ZNF692                 | zinc finger protein 692                      | -3,380562                 |
| ZNF713                 | zinc finger protein 713                      | 4,1269565                 |
| ZNF727                 | zinc finger protein 727                      | -2,1034365                |
| ZNF787                 | zinc finger protein 787                      | 2,4585402                 |
| ZNF816                 | zinc finger protein 816                      | 3,8342474                 |
| ZNF837                 | zinc finger protein 837                      | -2,1904764                |
| ZNF839                 | zinc finger protein 839                      | -2,0060124                |
| ZNRD1                  | zinc ribbon domain containing 1              | -4,1860924                |
| ZRANB2                 | zinc finger, RAN-binding domain containing 2 | 2,6747217                 |
| ZSWIM7                 | zinc finger, SWIM-type containing 7          | 2,0717041                 |
| ZYX                    | zyxin                                        | 2,1661315                 |

## Anexo C - Legenda dos símbolos apresentados nas análises *in silico* pelo software Metacore®

### User Data



### Network Objects

