

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta ____
será disponibilizado somente a partir
de DD/MM/AAAA.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Fernanda Cristina Fontes Moretto Arena

**PARTICIPAÇÃO DO T3 NO CONTROLE PÓS-
TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO DE *HIF1A* E
TGFA EM LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA E AVALIAÇÃO DO
ENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS miRNAs**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Titular Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Dra. Maria Teresa De Sibio

Fernanda Cristina Fontes Moretto Arena

**PARTICIPAÇÃO DO T3 NO CONTROLE PÓS-
TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO DE *HIF1A*
E *TGFA* EM LINHAGEM CELULAR DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA E AVALIAÇÃO
DO ENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS miRNAs**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Titular Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Dra. Maria Teresa De Sibio

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Arena, Fernanda Cristina Fontes Moretto.

Participação do T3 no controle pós-transcricional da expressão de *HIF1A* e *TGFA* em linhagem celular de adenocarcinoma de mama e avaliação do envolvimento de potenciais miRNAs / Fernanda Cristina Fontes Moretto Arena. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Coorientador: Maria Teresa De Sibio

Capes: 40101002

1. Mamas - Câncer. 2. Adenocarcinoma. 3. Fator 1 induzível por hipóxia. 4. Hormônios tireoidianos. 5. Fatores de crescimento transformadores. 6. MicroRNAs.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de mama; *HIF1A*; Hormônio tireoidiano; *TGFA*; miRNA.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

A **Deus**, por me capacitar e fazer com que meu sonho se tornasse realidade.

Aos **meus pais**, que estiveram ao meu lado em todos os momentos deste trabalho, me dando força e incentivo. Em especial a minha mãe **Fátima**, pelo amor incondicional e atenção, devo a você a pessoa que me tornei hoje, seus esforços e dedicação foram essenciais para as minhas conquistas. Amor eterno!

Ao meu irmão **Júnior**, pelo amor em todas as etapas da minha vida, por ser aquele que eu sei que sempre estará comigo “amor de irmão será sempre amor de irmão”.

Ao meu marido **Felipe**, pelo carinho, paciência, companheirismo e por todo apoio provido para a concretização de meus sonhos.

Agradecimentos

A *Deus*, por mais uma etapa concluída e nesse caminho se fez presente a cada instante. Agradeço ao Senhor Deus por possibilitar a realização de mais uma conquista e por ter me abençoado na realização desse trabalho!!

Aos meus pais, *Valério, Fátima* e meu irmão *Júnior*, que sempre me apoiaram e me deram forças para realizar cada objetivo. Vocês são fundamentais na minha vida!

Ao meu marido *Felipe*, pelos conselhos, paciência, carinho e compreensão. Sempre me apoiando em minha caminhada. Agradeço a Deus por ter você na minha vida.

À *minha família*, a todos os tios e tias que são como meus pais, aos primos e primas que são verdadeiros irmãos.

Aos *meus amigos*, que são a família que eu escolhi. Sem vocês tudo seria mais difícil e menos divertido.

À minha orientadora *Célia Regina Nogueira*, pela competência na orientação e oportunidade em realizar este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À *Regi, Maria Teresa e Helena* conhecer vocês fez toda diferença nessa caminhada. Obrigada pela paciência, pela dedicação e por tudo que me ensinaram, sempre prestativas e presentes em todas as etapas deste trabalho.

À *Laura Martin, Dani Vileigas e Dijon Campos* sempre prestativos! Obrigada por todo o conhecimento técnico e científico, torço muito por vocês!

À *Renata, Paulinha, Corina e Regina* por compartilharem momentos de alegrias e dificuldades, sempre prontas para me auxiliar em diversos assuntos. Obrigada pela amizade e pelos momentos que passamos juntas!

Aos *amigos do Laboratório “Bio Mol”*: *Regi, Maria Teresa, Helena, Dari, Bia, Lucas, Bruna, Miriane, Lari e Sarah*, sempre dispostos a ajudar no que é preciso. Obrigada pela amizade construída e muito sucesso a vocês!

Aos *amigos da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX)*, obrigada a todos pela amizade e pelos momentos que passamos juntos.

A todos os *funcionários da UNIPEX*, pela convivência, colaboração e auxílios prestados.

À *Paulinha, Vick e Igor* por todo auxílio disponibilizado e ensinamentos. Muito obrigada pelo apoio!

À *Sueli Clara* pela amizade e sempre disponível para ajudar no que fosse necessário.

Aos funcionários da *Seção Técnica de Pós-Graduação* pela paciência e eficiência nas soluções de problemas

Aos membros da banca de qualificação *Dra. Márcia Guimarães e Dr. Robson Carvalho*, pelas correções e sugestões proferidas no exame geral de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Comissão Examinadora de Defesa de Tese *Dra. Paula Hokama, Dr. Robson Carvalho, Dra. Patrícia Saraiva e Dra. Nancy Figueiredo* pela disponibilidade.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pela concessão da bolsa de Doutorado e por viabilizar a realização deste estudo. Muito obrigada! (Processo: 2014/15209-5)

A todas as pessoas que estiveram envolvidas, direta ou indiretamente, em todas as etapas de execução deste estudo, contribuindo para que o mesmo fosse realizado da melhor maneira possível. Obrigada a todos!

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe.”

(Clarice Lispector)

“O sucesso nasce do querer,
da determinação e
persistência em se chegar a
um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca
e vence obstáculos, no mínimo
fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Resumo

O câncer de mama (CM) é o primeiro em taxa de mortalidade em mulheres no mundo e o segundo mais frequente entre as mulheres no Brasil. Os fatores de risco estão relacionados com a idade, fatores ambientais, comportamentais, genéticos/hereditários, história reprodutiva e hormonal, bem como os hormônios tireoidianos (HT) que têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM. A superexpressão do fator induzido por hipóxia 1 subunidade alfa (*HIF1A*) e o fator transformador de crescimento alfa (*TGFA*) está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas, porém não foi avaliada a participação do hormônio triiodotironina (T3) na expressão desses genes em vias extranucleares MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$. No CM, a desregulação na expressão de microRNAs (miRNA) têm sido detectada em casos metastáticos e de pior prognóstico, sugerindo funções importantes na oncogênese mamária e na progressão do câncer. Nosso objetivo foi verificar o envolvimento do T3 no controle pós-transcricional da expressão de mRNA *HIF1A* e *TGFA* e avaliar se os miRNAs envolvidos no CM, let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335-5p, são modulados por esse hormônio em células de adenocarcinoma de mama MCF7. A linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF7 foi submetida ao tratamento com T3 na dose suprafisiológica (10^{-8} M) por 1 hora, na presença ou ausência de drogas específicas para o bloqueio de vias de sinalização intracelulares para abordagem de ações extranucleares dos HT, como PD98059 (inibidor da MAPK/ERK), Peptídeo RGD (que se liga a integrina $\alpha\beta3$) e α -amanitina (inibidor específico da RNA polimerase II), com posterior análise de expressão gênica de *HIF1A* e *TGFA*, assim como, os miRNAs let-7a-5p, miR-200a-3p e miR-335-5p por meio da técnica de RT-qPCR. Os resultados demonstram que a ativação das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$ pelo T3 são necessárias para modular a expressão de

mRNA de *HIF1A* e *TGFA* e a inibição da transcrição gênica demonstra que o T3 não mantém a estabilidade pós-transcricional dos mRNAs estudados em células MCF7. O T3 exerceu efeito supressor na expressão do miRNA let-7a-5p, podendo estar correlacionado com pior progressão tumoral e não interfere na expressão de miR-200a-3p e miR-335-5p nessa linhagem celular.

Palavras-chave: Hormônio tireoidiano, Adenocarcinoma de mama, *HIF1A*, *TGFA* e miRNAs.

Abstract

Breast cancer (BC) has the highest mortality rate among women in the world and is the second most frequent among women in Brazil. Risk factors are related to age, environmental, behavioral, genetic/hereditary, reproductive and hormonal history, as well as thyroid hormones (TH), that have been proposed to influence the development of BC. The overexpression of the hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (*HIF1A*) and the transforming growth factor alpha (*TGFA*) is positively related to tumor aggressiveness and malignant progression in human neoplasias, but the participation of the hormone triiodothyronine (T3) in the expression of these genes in extranuclear pathways MAPK / ERK and integrin $\alpha\beta3$. In BC, dysregulation in the expression of miRNAs has been detected in metastatic cases and worse prognosis, suggesting important functions in mammary oncogenesis and cancer progression. Our objective was to verify the pathways of T3 actions, through the use of specific drugs to block intracellular signaling pathways as an approach to mapping TH extranuclear actions in the expression of *HIF1A* and *TGFA*. We jointly evaluated whether the miRNAs involved in CM, let-7a-5p, miR-200a-3p and miR-335-5p are modulated by T3 in MCF7 breast adenocarcinoma cells. The MCF7 breast adenocarcinoma cell line was treated with T3 at the 10^{-8} M dose for 1 hour in the presence or absence of specific drugs for the blockade of intracellular signaling pathways to approach HT extranuclear actions such as PD98059 (MAPK/ERK inhibitor), RGD peptide (which binds $\alpha\beta3$ integrin) and α -amanitin (specific inhibitor of RNA polymerase II), with subsequent gene expression analysis of *HIF1A* and *TGFA*, as well as the miRNAs let-7a-5p, miR-200a-3p and miR-335-5p by the RT-qPCR technique. The results demonstrate that the activation of both the MAPK/ERK and $\alpha\beta3$ integrin pathways by T3 is required to modulate the gene expression of *HIF1A* and *TGFA* and by inhibiting gene transcription

we demonstrated that T3 does not maintain the post-transcriptional stability of the mRNAs studied in cells MCF7. T3 had a suppressive effect on the miRNA let-7a-5p expression, which may be correlated with worse tumor progression and does not interfere with miR-200a-3p and miR-335-5p expression in this cell line.

Keywords: Thyroid hormone, breast cancer, *HIF1A*, *TGFA* and miRNAs.

Capítulo 1 – Introdução estendida

Introdução.....	14
Objetivos.....	22
Referências.....	24

Capítulo 2 – Artigo científico

Capa.....	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	36
Resultados.....	38
Discussão e conclusão.....	42
Referências.....	45

Capítulo 3 – Anexos

Anexo 1 – Comitê de Ética.....	50
Anexo 2 – Tratamentos das células com hormônio e inibidores.....	52
Anexo 3 – Cultivo das células MCF7.....	53
Anexo 4 – Quantificação de RNA.....	54
Anexo 5 – Influência do T3 na expressão dos miRNAs 200a-3p e 335-5p em células MCF7.....	56

Capítulo 1
Introdução estendida

O câncer de mama (CM) é uma doença causada como consequência de alterações genéticas em algum conjunto de células da mama, podendo ocorrer tanto no ducto quanto nos glóbulos mamários. Esse processo é causado pela proliferação anormal e descontrolada de células oriundas de uma célula previamente normal, que sofreu uma ou mais mutações e que tem a capacidade de se espalhar pelo organismo podendo resultar em tumor maligno(1). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o CM é o primeiro em taxa de mortalidade em mulheres no mundo e o segundo mais frequente entre as mulheres no Brasil. A estimativa do número de casos novos de CM em mulheres no Brasil foi de 59.700, para o ano de 2018, correspondendo cerca de 29% dos casos novos a cada ano(1).

Inúmeros fatores de riscos ambientais, condições patológicas e agentes fisiológicos(2–5), bem como os hormônios tireoidianos (HT) têm sido propostos por influenciar o desenvolvimento de CM(6). Estudos do nosso grupo relatam relação entre o CM em mulheres na pós-menopausa e hipertireoidismo(7–9).

Durante a progressão tumoral, ocorre um processo dependente da formação de novos vasos, denominado angiogênese tumoral(10). A angiogênese consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, sendo essencial em processos fisiopatológicos, tais como o desenvolvimento e a disseminação dos tumores(11). Quando a proliferação de células cancerosas ultrapassa a taxa de angiogênese, resulta em hipóxia tecidual(12). A adaptação celular à hipóxia é considerada um dos estímulos mais importantes para a angiogênese em tumores malignos(13) e um passo fundamental na progressão do tumor(14). Essa adaptação é regulada principalmente pelo fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1), que é conhecido por desempenhar um papel essencial na homeostase(15–19), sendo fundamental na resposta celular em condições de baixa concentração de oxigênio(13).

A hipóxia estimula as proteínas HIF-1, que ativa a transcrição de genes envolvidos nos aspectos da biologia celular, regulando processos, como metabolismo, angiogênese, proliferação celular, apoptose e remodelamento celular(20). Esse fator é composto por duas subunidades, a alfa (α) e a beta (β), ambas membros de uma família de proteínas (bHLH). A subunidade α é a funcional, regulada pelo oxigênio e apresenta 3 tipos diferentes de unidades (1α , 2α e 3α)(21). Já a β , é constitutiva, mantida em níveis constantes de expressão, independente da concentração de oxigênio(20,22,23).

Em condições de normóxia tecidual são detectadas pequenas quantidades de *HIF1A* sendo sintetizado e degradado, na condição de hipóxia há aumento significativo dessa expressão(24,25), além disso, tumores submetidos à hipóxia parecem ser mais agressivos, com redução da apoptose e aumento de resistência a drogas(26–28).

Um estudo realizado por Zong et al.(29), mostrou que *HIF1A* é superexpresso em vários tumores humanos (côlon, mama, estômago, pulmão, pele, ovário, próstata, renal e carcinomas pancreáticos) quando comparado com tecidos normais, sendo também mais expresso em lesões pré-malignas do que em lesões benignas(29). Esses resultados enfatizam que *HIF1A* desempenha um papel importante no crescimento do tumor e na progressão a metástase(30).

A superexpressão de *HIF1A* no CM humano apresenta importância funcional e provavelmente prognóstica, estando relacionados à carcinogênese mamária e modificações moleculares decorrentes do processo de vascularização tumoral(31) sugerindo potencial de lesões pré-cancerosas(29) o que o torna um alvo promissor para o tratamento preventivo(32,33).

Além do *HIF1A*, o fator transformador de crescimento alfa (*TGFA*) também é secretado por muitos tumores e possui propriedades angiogênicas(34).

O gene *TGFA* é um fator de crescimento característico dos mamíferos, sua expressão ocorre em diversos tecidos desde a embriogênese até a fase adulta(35). Seu principal efeito é o estímulo da proliferação celular(36), sendo potente indutor de mitoses durante o desenvolvimento da mama(37). É secretado por vários tipos de células e estimula sua proliferação, diferenciação e desenvolvimento(38). Sua expressão foi detectada durante diferentes estágios de desenvolvimento mamário(39). Têm sido descrito como um fator produzido por células tumorais(34) e sua superexpressão pode ocorrer durante a progressão maligna(40).

A literatura indica que as citocinas interleucina-17A (IL-17A) e *TGFA* estão envolvidas na iniciação e progressão de doenças mamárias estando correlacionado com tumor mamário(38,41,42).

Em estudo recente, os níveis séricos de *TGFA* em pacientes com carcinoma ductal foram significativamente maior em relação a indivíduos saudáveis, sugerindo que o *TGFA* pode promover o desenvolvimento de tumores e estar associado a um estágio clínico mais grave de carcinoma. Assim, essa citocina pode ser desenvolvida como biomarcadores diagnósticos e prognósticos do câncer(43).

Estudos anteriores demonstraram que a superexpressão de *HIF1A* e *TGFA* está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com a progressão maligna em neoplasias humanas(40,44,45).

Em trabalho prévio demonstramos que o tratamento com triiodotironina (T3) na dose supra-fisiológica (10^{-8} M), em células de adenocarcinoma de mama MCF7, promove aumento da expressão de mRNA de *HIF1A* e *TGFA*(46).

A via de sinalização dos hormônios tireoidianos (HT) é complexa e altamente regulada devido à expressão de transportadores específicos, presença de múltiplas isoformas de receptores de HT (TRs) e interações que ocorrem entre esses mediadores

nas células e tecidos(47,48). Além disso, em muitos casos, as vias de sinalização dos HT estão envolvidas em uma variedade de outras vias de sinalização(49,50).

As ações dos HT podem ser iniciadas no núcleo(51) ou por meio de mecanismos denominados extranucleares por terem sítio de ativação na membrana plasmática, citoplasma ou nas mitocôndrias das células(52).

No modelo nuclear de indução da expressão gênica pelos HT, os TRs ligam-se como heterodímeros em associação com o receptor de ácido retinóico (RXR) ou como homodímeros aos elementos responsivos aos hormônios tireoidianos (TRE) (Fig. 1)(51).

A ligação de alta afinidade do HT ao receptor pode induzir ou suprimir a expressão de genes alvos. Nos genes alvos regulados positivamente, a ausência do ligante favorece o recrutamento de co-repressores, enquanto que na presença de T3 ocorre liberação de co-repressores e recrutamento de complexos co-ativadores, levando à ativação da transcrição gênica. Este mecanismo atrai um grande número de proteínas incluindo o complexo da RNA polimerase II para a transcrição do gene alvo. A ação nuclear também pode levar ao aumento da expressão de genes desprovidos de TRE, os quais são genes alvos para fatores de transcrição induzidos por este mecanismo(52).

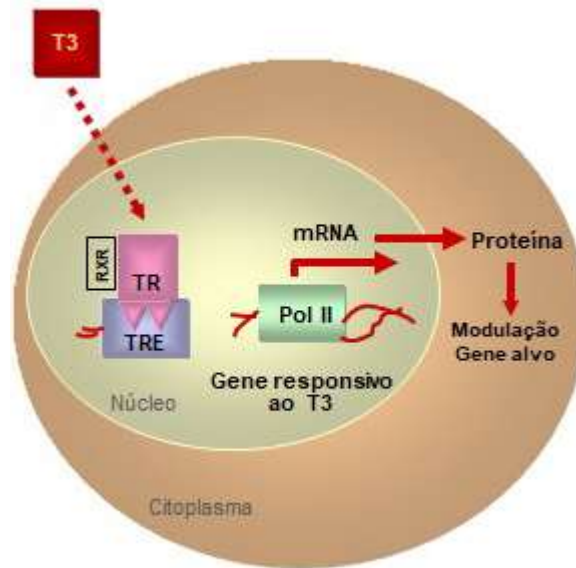


Figura 1. Ação nuclear dos hormônios tireoidianos (HT). Ação nuclear requer elemento responsivo ao hormônio tireoidiano (TRE) para transcrição de genes alvos. T3, triiodotironina; TR, receptores de HT; RXR, receptor de ácido retinóico; Pol II, polimerase II; mRNA, ácido ribonucleico mensageiro.

Estudos demonstram que os HT podem agir por meio de outros mecanismos (Fig. 2), além da ação nuclear TR/TRE(51), esses mecanismos podem ser denominados extranucleares por terem o sítio de iniciação na membrana plasmática ou no citoplasma. Os sítios de iniciação são proteínas caracterizadas como receptores de iodo-tironinas(47). Os mecanismos denominados extranucleares podem influenciar potencialmente a expressão gênica. O início da via de ação é extranuclear, por dependerem de vias alternativas, mas as consequências incluem aumento da transcrição(51). Isto demonstra que pode haver uma inter-relação entre ação nuclear e extranuclear dos HT.

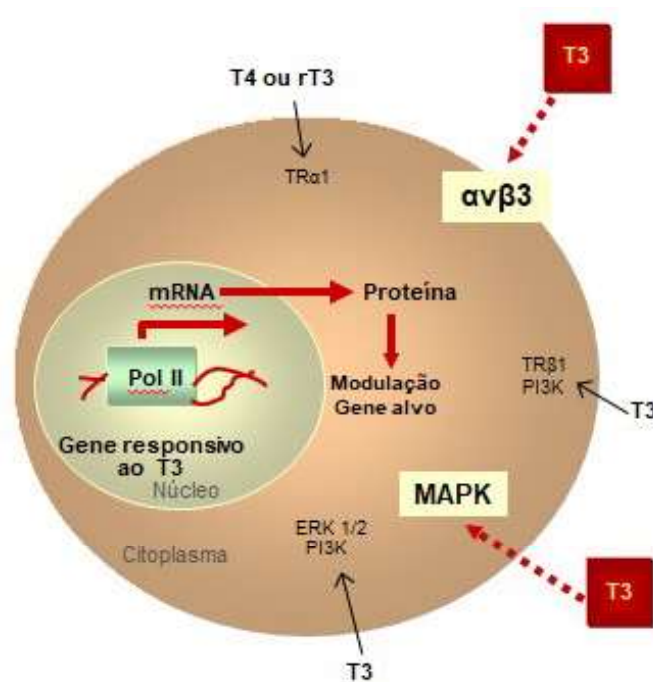


Figura 2. Representação esquemática de ações extranucleares dos hormônios tireoidianos. 1) Ações de HT via integrina $\alpha\beta3$. 2) Ações de HT via MAPK. 3) Algumas ações de HT via $TR\alpha$, receptor alfa dos HT; $TR\beta1$, receptor beta dos HT; PI3K, fosfatidilinositol 3 quinase (modificado de Cheng et al., 2010(47)).

Sobre as ações extranucleares dos HT, as evidências são de que existem sítios localizados na membrana plasmática, ribossomos, mitocôndrias, citosol com os quais os HT podem interagir(53–55). Neste tipo de mecanismo, seus locais de iniciação podem estar na membrana plasmática, como na ativação da integrina $\alpha\beta3$, que ativa a ERK1/2 e culmina nas ações locais de membrana nos sistemas de transporte de íons, tais como Na^+/H^+ , ou em eventos celulares complexos ou no citoplasma(51,56,57).

Há evidências de que o HT pode afetar a organização do citoesqueleto, mecanismo pelo qual poderia interferir com o tráfego de vesículas para a membrana, e que parece envolver a integrina $\alpha\beta3$ ou um $TR\alpha$ truncado, receptor de HT que não apresenta domínio de ligação ao DNA, ficando no citoplasma, onde pode se associar com outras proteínas/enzimas(47). Dessa maneira, vêm duas diferentes possibilidades

pelas quais os HT poderiam atuar num mesmo evento, sendo uma delas por uma ação na membrana e outra intracelularmente.

Bergh et al.(58) demonstraram a existência de um sítio ligante com alta afinidade pelos HT, numa proteína estrutural de membrana plasmática, a integrina $\alpha\beta3$. Esta reconhece proteínas de matriz extracelular que apresentam o domínio RGD (Arg-Gly-Asp). A integrina $\alpha\beta3$ possui dois sítios de ligação ao HT denominados Sítio 1 (S1) e 2 (S2). O S1 se liga somente ao T3 e o S2 se liga ao T4 com maior afinidade do que o T3(59). A ligação de S1 ao T3 ativa por meio da cinase Src, a enzima fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K) e a ligação de T4 ou T3 a S2 ativa a via da via MAPK/ERK1/2(51,59). Da interação dos HT com a integrina, ocorre a ativação da via da MAPK, a qual medeia os efeitos extranucleares do T3 sobre a angiogênese(58).

Pelo receptor de integrina os HT estimulam as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteínas pertencentes ao grupo das MAPK, como as quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2)(47). Ao ser estimulada pelos HT, a MAPK ativa a proliferação de células tumorais ou a angiogênese. Por meio da fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C ($PKC\alpha$), o hormônio ativa a ERK1/2 promovendo o transporte de proteínas específicas situadas no citoplasma para o núcleo, onde ocorre a fosforilação de nucleoproteínas, assim fosforilando proteínas alvo, como receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) ou $TR\beta1$ (57).

Estudos envolvendo o perfil genômico completo de seres humanos e banco de dados do genoma humano, têm reportado desregulações (aumento ou diminuição) em microRNAs (miRNAs) envolvidos no CM, como let-7a, miR-200a e miR-335(60–65).

Os miRNAs são uma classe de pequenas moléculas não codificadoras de proteínas que regulam a expressão gênica durante a etapa de tradução. Esta regulação é feita por meio do pareamento de bases com o mRNA alvo, resultando na supressão da tradução

Referências

1. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Tipos de câncer: Câncer de Mama. [Internet]. [cited 2018 Oct 11]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>
2. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: Role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*. 2001;18(4):243–59.
3. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*. 2003;22(21):3213–20.
4. Pavelic K, Hrascan R, Kapitanovic S, Karapandza N, Vranes Z, Belicza M, et al. Multiple genetic alterations in malignant metastatic insulinomas. *J Pathol*. 1995;177:395–400.
5. Moretto FCF, De Sibio MT, Luvizon AC, Olimpico RMC, De Oliveira M, Alves CAB, et al. Triiodothyronine (T3) induces HIF1A and TGFA expression in MCF7 cells by activating PI3K. *Life Sci*. 2016;154:52–7.
6. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999;59(22):5830–5.
7. Kaur B. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2005;7(2):134–53.
8. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36(1):1–12.
9. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003;2:1–10.
10. Post DE, Devi NS, Li Z, Brat DJ, Kaur B, Nicholson A, et al. Cancer therapy with a replicating oncolytic adenovirus targeting the hypoxic microenvironment of tumors. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8603–12.
11. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(5):1558–62.
12. Plath A, Einspanier R, Peters F, Sinowatz F, Schams D. Expression of transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine

- mammary gland during different stages of development and lactation. *J Endocrinol.* 1997;155(3):501–11.
13. Booth BW, Smith GH. Roles of transforming growth factor- α in mammary development and disease. *Growth Factors.* 2007;25(4):227–35.
 14. Verheul HMW, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol.* 2004;202(1):5–13.
 15. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834–8.
 16. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor α and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem.* 2008;283(45):31079–86.
 17. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065–70.
 18. Sun X, Qin S, Fan C, Xu C, Du N, Ren H. Let-7: A regulator of the ER α signaling pathway in human breast tumors and breast cancer stem cells. *Oncol Rep.* 2013;29(5):2079–87.
 19. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* 2011;4(SUPPL. 1):S6.
 20. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal.* 2006;4:3–6.
 21. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 2005;146(7):2864–71.
 22. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409–16.
 23. Nogueira CR, Brentani MM. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;59(3–4):271–9.
 24. Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 Human breast cancer cells surviving exposure to

- diethylstilbestrol. *Cancer Res.* 1983;43(6):2831–5.
25. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers. *Mol Endocrinol.* 2004;18(12):2854–65.
 26. McGuire WL, Chamness GC, Costlow ME, Shepherd RE. Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism.* 1974;23:75–100.
 27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta CT) Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
 28. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721–32.
 29. Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(24):3233–47.
 30. Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, Sistonen L, Nikinmaa M. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem.* 2001;276(23):19699–705.
 31. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):1–10.
 32. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep.* 2013;3:1–10.
 33. Lv Z, Liu M, Shen J, Xiang D, Ma Y, Ji Y. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor- α levels with human benign and malignant breast diseases. *Exp Ther Med.* 2018;15(6):5475–80.
 34. Incerpi S, Luly P, De Vito P, Farias RN. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: High molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology.* 1999;140(2):683–9.
 35. Slepko E, Fliegel L. Regulation of expression of the Na⁺/H⁺ exchanger by thyroid hormone. *Vitam Horm.* 2004;69:249–69.
 36. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene.* 2001;265(1–2):11–23.
 37. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD et al.

- Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;10:147–52.
38. Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, et al. miR2Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 1):98–104.
 39. Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F SE. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2010;29:4194–204.
 40. Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med*. 2010;16(6):257–67.
 41. Silveri L, Tilly G, Vilotte JL, Le Provost F. MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. *Reprod Nutr Dev*. 2006;46(5):549–56.
 42. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799–803.
 43. Zhao Y, Deng C, Wang J, Xiao J, Gatalica Z, Recker RR, et al. Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(1):69–80.