UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Alexia Correa Pereira Leite

Sistema de entrega de miR-200 através de vesículas extracelulares em linhagens de câncer de mama.

São José do Rio Preto
2026

Alexia Correa Pereira Leite

Sistema de entrega de miR-200 através de vesículas extracelulares em linhagens de câncer de mama.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP: 2024/09539-4

Orientadora: Profª. Drª. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari.
Supervisora: Profª. Drª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni.

São José do Rio Preto
2026

Alexia Correa Pereira Leite

Sistema de entrega de miR-200 através de vesículas extracelulares em linhagens de câncer de mama.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP: 2024/09539-4

Orientadora: Profª. Drª. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari.
Supervisora: Profª. Drª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni.

Data da defesa: 17/08/2026.
Comissão Examinadora.

Profª. Drª Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto.

Me. Lucas Pagliuca Martins
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto.

Ma. Daniele Enriquetto Mascarelli
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas.

São José do Rio Preto
2026

L533s

Leite, Álexia Correa Pereira

Sistema de entrega de miR-200 através de vesículas extracelulares em linhagens de câncer de mama. / Álexia Correa Pereira Leite. -- São José do Rio Preto, 2026

45 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. células-tronco mesenquimais. 2. miR-200. 3. câncer de mama triplo-negativo. 4. vesículas extracelulares. 5. transição epitélio-mesenquimal.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao meu pai, Josenilson Pereira Leite, à minha mãe, Elisangela Correa da Silva, e ao meu irmão, Nikolas Correa Pereira Leite, por sempre terem me apoiado durante minha jornada acadêmica. Nada disso seria possível sem todo suporte que me ofereceram desde o início. A oportunidade e sonho de estudar no IBILCE, longe de casa, por todos esses anos, só foi viável com a ajuda de vocês, que acreditaram em mim.

Aos meus amigos, que foram meu suporte todos os dias, me ouviram, aconselharam e incentivaram nos momentos mais difíceis, em especial minhas amigas Júlia de Oliveira Martinho, Maria Paula Martins Santana, Luara Jesus Ferrato, Luiza Prado de Paula e Carolina Risso, que não são apenas companheiras, mas também inspiração.

Sou grata à minha orientadora Profª. Drª. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari, pela oportunidade, e por todo carinho e cuidado. À Drª Caroline Patini de Rezende, por tudo que me ensinou durante meu caminho até aqui, e por todo esforço e zelo que teve com meu projeto durante nosso tempo trabalhando juntas. À Me. Daniele Enriquetto Mascarelli, por todas as risadas ensinamentos e companhia. E, por fim, à Profª. Drª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, agradeço por ter me incentivado a não desistir.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de pesquisa sob o processo nº 2024/09539-4.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e a todos os seus docentes e funcionários, por todo o conhecimento e auxílio transmitidos.

RESUMO

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) destaca-se por sua elevada agressividade, alta capacidade metastática e escassez de terapias-alvo eficazes. Nesse contexto, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) desempenha papel central na progressão tumoral, sendo regulada, entre outros fatores, pela família de microRNAs miR-200, reconhecida por modular a expressão dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2. Considerando o potencial terapêutico desses microRNAs, o presente estudo avaliou a utilização de vesículas extracelulares (VEs) derivadas de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MSCs) como sistema de entrega de miR-200 em modelos de linhagem celular de câncer de mama. Inicialmente, as MSCs foram cultivadas em diferentes condições e utilizadas para obtenção de vesículas extracelulares caracterizadas quanto à concentração, tamanho e morfologia por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O carregamento dos microRNAs foi realizado por eletroporação e sua inserção foi confirmada por RT-qPCR. Adicionalmente, foi realizado ensaio de viabilidade celular por MTT para investigação de possíveis efeitos citotóxicos do tratamento. Os resultados demonstraram que as MSCs mantiveram características morfológicas compatíveis com o descrito para o tipo celular e produziram vesículas extracelulares com perfil adequado para os experimentos subsequentes. Entretanto, a eletroporação promoveu alterações nos parâmetros físicos das vesículas e apresentou eficiência limitada para o carregamento de miR-200c. A análise por RT-qPCR indicou baixa incorporação do microRNA nas condições avaliadas. O ensaio de MTT demonstrou ausência de toxicidade significativa associada ao tratamento. Em conjunto, os resultados evidenciam o potencial das MSCs como fonte de vesículas extracelulares, mas indicam a necessidade de otimização dos protocolos de carregamento para aplicações envolvendo miR-200c. Estudos adicionais serão necessários para avaliar o impacto dessa estratégia sobre processos relacionados à EMT e à progressão tumoral.

Palavras-chave: câncer de mama triplo-negativo; vesículas extracelulares; células-tronco mesenquimais; miR-200; transição epitélio-mesenquimal.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by high aggressiveness, elevated metastatic potential, and the lack of effective targeted therapies. In this context, the epithelial–mesenchymal transition (EMT) plays a central role in tumor progression and is regulated, among other factors, by the miR-200 family of microRNAs, which modulates the expression of the transcription factors ZEB1 and ZEB2. Considering the therapeutic potential of these microRNAs, the present study evaluated the use of extracellular vesicles (EVs) derived from adipose tissue–derived mesenchymal stem cells (MSCs) as a delivery system for miR-200 in breast cancer cell line models. Initially, MSCs were cultured under different conditions and used for EV isolation. The vesicles were characterized in terms of concentration, size, and morphology by nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM). MicroRNA loading was performed by electroporation, and its incorporation was assessed by RT-qPCR. In addition, an MTT assay was conducted to investigate possible cytotoxic effects of the treatment. The results demonstrated that MSCs maintained morphological characteristics consistent with those described for this cell type and produced extracellular vesicles with a suitable profile for subsequent experiments. However, electroporation induced alterations in the physical parameters of the vesicles and showed limited efficiency for miR-200c loading. RT-qPCR analysis indicated low microRNA incorporation under the evaluated conditions. The MTT assay demonstrated the absence of significant treatment-associated toxicity. Overall, the findings highlight the potential of MSCs as a source of extracellular vesicles, while indicating the need for optimization of loading protocols for applications involving miR-200c. Further studies will be required to evaluate the impact of this strategy on EMT-related processes and tumor progression.

Keywords: triple-negative breast cancer; extracellular vesicles; mesenchymal stem cells; miR-200; epithelial–mesenchymal transition.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática da transição epitélio-mesenquimal (EMT) e da transição mesênquima-epitélio (MET). 16

Figura 2. Regulação de miR-200 na transição epitélio-mesenquimal (EMT), transição mesênquima-epitélio (MET) e manutenção das propriedades de célula-tronco (stemness). 19

Figura 3. Fotomicrografias das linhagens de câncer de mama. 30

Figura 4. Fotomicrografias da linhagem de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. 31

Figura 5. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas. 32

Figura 6. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) encapsuladas com miRNA-200c por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). 33

Figura 7. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) encapsuladas com miRNA-200b por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). 35

Figura 8. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). 36

Figura 9. Validação do carregamento de miRNA-200s em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). 37

Figura 10. Análise do efeito das VEs/miRNA-200b na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 através de ensaio de MTT 38

Tabela 1. Parâmetros utilizados para eletroporação de miRNA-200b em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais. 25

Tabela 2. Parâmetros utilizados para eletroporação de miRNA-200c em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais. 26

Tabela 3. Concentrações obtidas em cada teste após eletroporação de miRNA-200c em vesículas extracelulares (VEs). 33

Tabela 4. Concentrações obtidas em cada teste após eletroporação de miRNA-200b em vesículas extracelulares (VEs). 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CDH1	Cadherin 1 (E-caderina)
CMTN	Câncer de Mama Triplo-Negativo
Ct	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
EVs	Extracellular Vesicles
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GRHL2	Grainyhead-Like Transcription Factor 2
hAD-MSCs	Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF-1α	Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2
IGF1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
KLF4	Krüppel-Like Factor 4
KLF5	Krüppel-Like Factor 5
MCF-7	Linhagem de câncer de mama luminal A
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama humano triplo-negativo
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
miR-141	MicroRNA-141
miR-200a	MicroRNA-200a
miR-200b	MicroRNA-200b
miR-200C	MicroRNA-200c
miR-429	MicroRNA-429
miRNA	MicroRNA
MISEV	Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles

mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PR	Progesterone Receptor
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SIP1	Smad-Interacting Protein 1
small EVs	Small Extracellular Vesicles
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TEM	Transmission Electron Microscopy
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer
VE	Vesícula Extracelular
VIM	Vimentina
WNT	Wingless/Integrated Signaling Pathway
ZEB1	Zinc Finger E-box-Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-box-Binding Homeobox 2

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
×	Força centrífuga relativa
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
cm^2	Centímetro quadrado
g	Grama
h	Hora
kDa	Quilodalton
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
V	Volt
V/cm	Volts por centímetro
10^6	Um milhão de partículas/células por unidade experimental
ΔCt	Diferença entre valores de cycle threshold
$2^{-}\Delta\Delta Ct$	Método de quantificação relativa da expressão gênica

SUMÁRIO

1. Introdução 13
1.1 Câncer de mama: epidemiologia e transição epitélio-mesenquimal 13
1.2 Carregamento de vesículas extracelulares (VEs) com miRNAs 17
2. Objetivos 20
2.1 Objetivos específicos 20
3. Material e Métodos 20
3.1 Estabelecimento e manutenção das linhagens tumorais. 20
3.2 Estabelecimento e manutenção das células-tronco mesenquimais 21
3.3 Isolamento de EVs provenientes de células-tronco mesenquimais 22
3.4 Caracterização das VEs por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) 23
3.5 Padronização e caracterização da eletroporação de miRNA-200c e 200b em EVs de células-tronco mesenquimais adiposas. 23
3.6 Caracterização das EVs provenientes das MSCs e VEs/miRNA-200s por Microscopia eletrônica de transmissão. 26
3.7 Confirmação da inserção do miRNA-200b nas EVs através de PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). 26
3.8 Ensaio de viabilidade celular - MTT 27
3.9 Análises estatísticas 28
4. Resultados 28
4.1 Morfologia das linhagens celulares. 28
4.2 Padronização e caracterização de VEs provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas. 30
4.3 Padronização e caracterização da eletroporação de miRNA-200c e 200b em VEs de células-tronco mesenquimais adiposas. 31
4.4 Caracterização das VEs provenientes das MSCs e VEs/miRNA-200s por Microscopia eletrônica de transmissão (TEM). 35
4.5 Confirmação da inserção do miRNA-200s nas VEs através de PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). 36
4.6 Ensaio de viabilidade celular - MTT 37
5. Discussão 38
6. Conclusão 40
REFERÊNCIAS 42

1. Introdução

1.1 Câncer de mama: epidemiologia e transição epitélio-mesenquimal.

O câncer constitui uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, representando um importante desafio para os sistemas de saúde. Nos Estados Unidos, estima-se a ocorrência de aproximadamente 2 milhões de novos casos e mais de 600 mil óbitos relacionados à doença em 2025, sendo o câncer de mama a neoplasia mais frequentemente diagnosticada entre mulheres e uma das principais causas de morte por câncer nessa população (SIEGEL et al., 2026). No Brasil, o câncer de mama também apresenta elevada relevância epidemiológica, configurando-se como o tipo de câncer mais incidente na população feminina, desconsiderando-se os tumores de pele não melanoma. Segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), são esperados 78.610 novos casos de câncer de mama por ano no Brasil para cada ano do triênio 2026–2028, correspondendo a uma taxa bruta estimada de 71,57 casos por 100 mil mulheres. Esses dados reforçam a relevância do câncer de mama como um importante problema de saúde pública no cenário oncológico nacional (INCA, 2026).

O câncer de mama é uma doença heterogênea que se origina principalmente nos ductos lactíferos ou nos lóbulos mamários, apresentando diferentes características moleculares, histopatológicas e clínicas. Atualmente, a classificação molecular é amplamente utilizada para definir os subtipos tumorais com base na expressão dos receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR), na superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e na taxa proliferativa avaliada pelo marcador Ki-67. Dessa forma, os tumores mamários são classificados em luminal A (ER+/PR+/HER2-/baixo Ki-67), luminal B (ER+/PR+/HER2-/+/alto Ki-67), HER2-positivo (ER-/PR-/HER2+) e câncer de mama triplo negativo (ER-/PR-/HER2-), subtipos que apresentam diferenças significativas quanto ao prognóstico, potencial metastático e resposta terapêutica (HARBECK et al., 2024; PARK et al., 2022).

Dentre os subtipos moleculares, o câncer de mama triplo negativo (TNBC) destaca-se por sua elevada agressividade biológica, alta heterogeneidade tumoral e maior capacidade metastática. Caracteriza-se pela ausência da expressão de ER, PR

e HER2, condição que limita as possibilidades de terapias-alvo e contribui para um prognóstico desfavorável. Além disso, o TNBC está associado a maiores taxas de recorrência, progressão tumoral acelerada e menor sobrevida global quando comparado aos demais subtipos de câncer de mama (FAN; HE, 2022; BISWAS et al., 2024). Os principais sítios de metástase incluem pulmões, fígado, ossos e cérebro, sendo particularmente relevante a maior tendência do TNBC à disseminação visceral e ao sistema nervoso central. Em um estudo realizado com pacientes com TNBC metastático, as metástases viscerais corresponderam a 41% dos casos, sendo o pulmão o sítio mais frequente de primeira metástase (33,3%). Além disso, estudos recentes destacam a associação do TNBC com maior ocorrência de metástases cerebrais, que estão relacionadas a um prognóstico desfavorável. Esses padrões de disseminação refletem diferenças biológicas entre os subtipos de câncer de mama e ressaltam a elevada capacidade metastática do TNBC (NOLAN et al., 2023; BUSTAMANTE et al., 2024; PIEDRA-DELGADO et al., 2024).

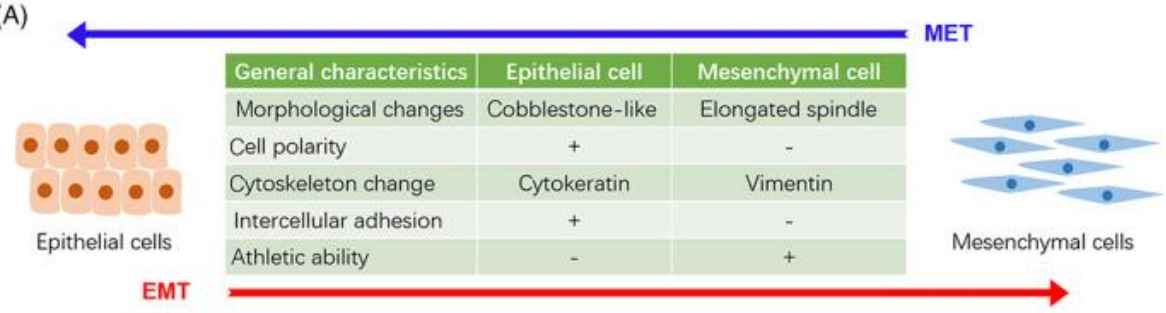
O avanço das terapias-alvo, terapias endócrinas e estratégias imunoterapêuticas tem contribuído de maneira significativa para a melhora do prognóstico, aumento da sobrevida e qualidade de vida de pacientes com câncer (PEROVANO FILHO et al., 2024). Apesar desses avanços, a metástase, processo caracterizado pela disseminação de células tumorais do sítio primário para órgãos e tecidos distantes, permanece como um dos principais desafios da oncologia contemporânea (NOLAN et al., 2023). Para que a metástase ocorra, as células tumorais precisam adquirir uma série de alterações moleculares e fenotípicas que possibilitem sua dissociação do tumor primário, invasão dos tecidos adjacentes e migração através da circulação sanguínea ou linfática, culminando na colonização de órgãos distantes e no estabelecimento de novos focos tumorais (LAMBERT; ZHANG; WEINBERG, 2024).

Nesse contexto, a transição epitélio-mesenquimal (epithelial-mesenchymal transition, EMT) desempenha papel central na progressão tumoral e disseminação metastática. A EMT caracteriza-se pela conversão de células epiteliais, normalmente polarizadas e fortemente aderidas entre si, em células com fenótipo mesenquimal, dotadas de maior plasticidade, motilidade e capacidade invasiva (THOMPSON et al., 2025; WANG et al., 2023). Durante esse processo, diverssas alterações no citoesqueleto celular e no padrão de expressão gênica ocorrem, incluindo redução da

expressão de moléculas de adesão celular, como a E-caderina, e aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como N-caderina e vimentina. Essas modificações favorecem a perda da adesão intercelular, remodelamento da matriz extracelular e aquisição de propriedades migratórias e invasivas, contribuindo diretamente para o potencial metastático das células tumorais (LI et al., 2023; YU; HU, 2024). Além disso, a EMT está associada a outras características que favorecem a metástase, como a aquisição de propriedades de células-tronco, alterações no metabolismo celular, evasão do sistema imunológico e resistência à quimioterapia (CELIÀ-TERRASSA; KANG. 2024).

A proteína de ligação à sequência caixa E do dedo de zinco 1 (ZEB1) exerce papel central na regulação da EMT, atuando diretamente na modulação de genes relacionados à plasticidade celular, proliferação, migração e invasão tumoral. Entre suas principais funções transcricionais, destaca-se a repressão da expressão de marcadores epiteliais, especialmente da E-caderina, codificada pelo gene *CDH1*, além de membros da família miR-200, promovendo simultaneamente o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como vimentina, codificada pelo gene *VIM*, e N-caderina, codificada pelo gene *CDH2* (Figura 1) (MERCKENS et al., 2023; WU et al., 2020). Assim, a redução da expressão de E-caderina está associada à perda da adesão intercelular e ao aumento do potencial invasivo das células tumorais. Estudos demonstram que pacientes com baixos níveis dessa proteína apresentam maior propensão ao desenvolvimento de metástases, menores intervalos livres de recorrência e redução da sobrevida global, evidenciando sua associação com prognóstico desfavorável no câncer de mama (MENG et al., 2023). Dessa forma, a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da EMT torna-se fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas à prevenção da progressão tumoral e da disseminação metastática.

(A)



General characteristics	Epithelial cell	Mesenchymal cell
Morphological changes	Cobblestone-like	Elongated spindle
Cell polarity	+	-
Cytoskeleton change	Cytokeratin	Vimentin
Intercellular adhesion	+	-
Athletic ability	-	+

(B)

	Epithelial biomarkers	Mesenchymal biomarkers
Adhesion molecule:	EPCAM, BCAM	MCAM
Cadherin:	CDH1/3	CDH2/6
Claudin:	CLDN1/4/7	
Cytoskeleton:	KRT7/8/15/16	VIM
Tight junction protein:	TJP3	
Collagen :		COL1A1, COL1A2···
Integrin:	ITGA2	ITGB3
Transcription factor:	OVOL1/2, GRHL2, ELF3, IRF6	ZEB1/2, SNAI1/2, TWIST1/2, TCF4
Matrix metalloproteinase:		MMP2/7/9
Serine protease:	PRSS8/22/ST14	PRSS23
Others:	C1ORF116, ZNF165, F11R, ESRP1/2	FN1, WISP2, ANPEP, FHL1

Figura 1. Representação esquemática da transição epitélio-mesenquimal (EMT) e da transição mesênquima-epitélio (MET). (A) Comparação entre células epiteliais e mesenquimais quanto à morfologia, polaridade celular, composição do citoesqueleto, adesão intercelular e capacidade migratória, evidenciando as alterações adquiridas durante o processo de EMT e sua reversão por meio da MET. (B) Principais biomarcadores associados aos fenótipos epitelial e mesenquimal, incluindo moléculas de adesão, componentes do citoesqueleto, fatores de transcrição e metaloproteinases envolvidos na progressão tumoral e no potencial metastático. Fonte: adaptado de LI et al. (2023).

Quanto aos modelos celulares empregados neste estudo, a linhagem MDA-MB-231 é amplamente utilizada como representante do TNBC, caracterizando-se por seu elevado potencial invasivo e pela presença de características associadas à EMT (HUANG; YU; TANG, 2020). Em contraste, a linhagem MCF-7 representa o subtipo molecular luminal A e apresenta fenótipo predominantemente epitelial, menor agressividade e reduzida capacidade invasiva, constituindo um importante modelo comparativo para a investigação de mecanismos relacionados à progressão tumoral e à supressão metastática (COMȘA; CÎMPEAN; RAICA, 2015).

Além das linhagens tumorais, este estudo utiliza células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (mesenchymal stem cells, MSCs), células multipotentes

adultas reconhecidas por sua elevada plasticidade, capacidade de autorrenovação e propriedades imunomoduladoras. As MSCs destacam-se também como fontes promissoras de vesículas extracelulares (EVs) uma vez que secretam grandes quantidades dessas nanopartículas biológicas, contendo proteínas, lipídeos e diferentes espécies de RNA capazes de modular o comportamento de células-alvo. Devido à sua biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e eficiência na produção de VEs, as MSCs têm sido amplamente exploradas em estratégias de engenharia vesicular para o transporte de moléculas terapêuticas, incluindo microRNAs. Nesse contexto, as VEs derivadas de MSCs representam uma plataforma promissora para a entrega de miRNAs capazes de modular processos relacionados à progressão tumoral (FIERABRACCI et al., 2023; WITWER et al., 2019).

1.2 Carregamento de vesículas extracelulares (VEs) com miRNAs

Vesículas extracelulares (VEs) englobam um conjunto heterogêneo de partículas delimitadas por bicamada lipídica e liberadas pelas células, desempenhando papel fundamental na comunicação intercelular por meio do transporte de proteínas, lipídeos, metabólitos e ácidos nucleicos, incluindo RNAs mensageiros (mRNAs) e microRNAs (miRNAs). Elas podem ser formadas a partir do compartimento endossomal, dando origem aos exossomos, do brotamento e desprendimento da membrana plasmática, originando microvesículas ou da fragmentação celular gerando os corpos apoptóticos. Essas vesículas participam de diversos processos fisiológicos e patológicos, atuando na transferência de informações moleculares entre células e tecidos (THÉRY et al., 2024).

As VEs podem ser classificadas de acordo com sua biogênese, tamanho, densidade e composição molecular, no entanto, as diretrizes mais recentes da *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) recomendam a utilização do termo genérico “vesículas extracelulares”, uma vez que a determinação da via de biogênese de cada população vesicular nem sempre é possível. Nesses casos, recomenda-se a classificação baseada em características como tamanho e densidade (THÉRY et al., 2024). Dessa forma, termos como *small extracellular vesicles* (small EVs) e *large extracellular vesicles* (large EVs) podem ser empregados para descrever populações enriquecidas em determinadas faixas de tamanho, embora seus limites não sejam universalmente estabelecidos e possam variar conforme a metodologia de isolamento utilizada. No presente estudo, o foco foi direcionado às *small extracellular*

vesicles, uma população geralmente enriquecida em vesículas de menor diâmetro e frequentemente associada ao transporte de moléculas bioativas envolvidas na comunicação intercelular e na progressão tumoral, incluindo a regulação de processos como invasão, metástase e EMT (THÉRY et al., 2024; PEGTEL; GOULD, 2024).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, com aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos, que atuam como importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Após sua maturação, a fita guia do miRNA é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced silencing complex, RISC), cuja proteína central pertence à família Argonauta (AGO). O complexo miRNA-RISC reconhece sequências complementares presentes, em geral, na região 3' não traduzida (3'UTR) dos mRNAs-alvo, promovendo repressão da tradução ou degradação do transcrito, regulando assim diversos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular (SHANG et al., 2023).

Os microRNAs membros da família miR-200 são reconhecidos como um dos principais reguladores da EMT, pois atuam diretamente na manutenção do fenótipo epitelial por meio da repressão dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2. O controle da EMT pela família miR-200 ocorre por meio de um circuito de retroalimentação dupla negativa (*double-negative feedback loop*) entre os miRNAs da família miR-200 e os fatores de transcrição ZEB1/ZEB2. Enquanto os miR-200 inibem a tradução dos transcritos de ZEB1 e ZEB2, esses fatores, por sua vez, reprimem a transcrição dos genes da família miR-200. Esse mecanismo funciona como um interruptor molecular capaz de regular a plasticidade celular, permitindo a transição entre estados epiteliais, mesenquimais e híbridos (Figura 2). Quando os níveis de miR-200 são elevados, predomina a expressão de genes epiteliais, como a E-caderina; em contrapartida, a redução da expressão desses miRNAs favorece o aumento de ZEB1 e ZEB2, induzindo a EMT, a reorganização do citoesqueleto, a perda da adesão celular e a aquisição de características invasivas e metastáticas (BRACKEN; GOODALL; GREGORY, 2024).

Entre os integrantes da família miR-200, o miR-200b e o miR-200c pertencem ao mesmo agrupamento funcional, e compartilham uma mesma sequência de reconhecimento inicial e ligação complementar aos mRNAs alvo, conferindo capacidade semelhante de reconhecimento e inibição de alvos moleculares

relacionados à plasticidade celular e progressão tumoral. (Park et al., 2008; Leighton et al., 2015).

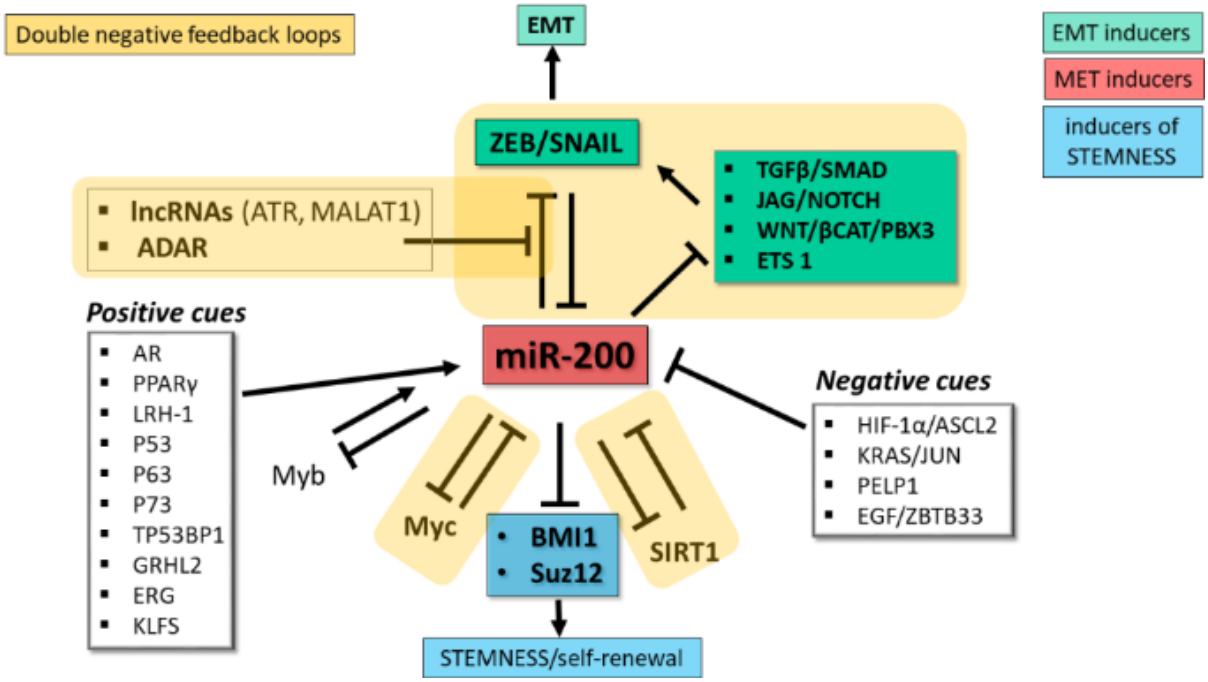


Figura 2. Regulação de miR-200 na EMT, MET e manutenção das propriedades de célula-tronco (stemness). A família miR-200 reprime os fatores de transcrição ZEB1/ZEB2 (ZEB/SNAIL), enquanto estes inibem a expressão de miR-200, formando um circuito responsável pelo controle da EMT. Indutores de EMT, incluindo as vias TGFβ/SMAD, JAG/NOTCH, WNT/β-CAT/PBX3 e ETS1, estimulam a expressão de ZEB/SNAIL e favorecem o fenótipo mesenquimal. Em contraste, o aumento de miR-200 promove características epiteliais e está associado à indução de MET. A expressão de miR-200 também é modulada positivamente por fatores como AR, PPARγ, LRH-1, p53, p63, p73, TP53BP1, GRHL2, ERG e KLF5, e negativamente por HIF-1α/ASCL2, KRAS/JUN, PELP1 e EGF/ZBTB33. Além disso, miR-200 regula genes associados à pluripotência e autorrenovação celular, incluindo BMI1, Suz12 e SIRT1, influenciando processos relacionados à aquisição e manutenção de propriedades de células-tronco tumorais (stemness). Fonte: CAVALLARI et al., 2021.

Considerando o papel central desse eixo regulatório na progressão tumoral, o presente trabalho propõe padronizar o carregamento dos miR-200c e 200b em vesículas extracelulares provenientes de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo. Posteriormente, VEs/miRNA-200s poderão ser utilizadas como estratégia modulação da expressão de ZEB1 em células de câncer de mama. A utilização de VEs derivadas de células-tronco mesenquimais (MSCs) apresentam várias vantagens como biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, baixo risco de tumorigênese e alta

capacidade de encapsulamento com a capacidade de proteger biomoléculas internalizadas através de sua estrutura de membrana lipídica (Kou et al. 2022).

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo padronizar o carregamento de miR-200c e 200b em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas e avaliar o seu potencial em células de câncer de mama.

2.1 Objetivos específicos

1. Estabelecer a linhagem de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MSCs) e as linhagens celulares de câncer de mama *in vitro*;
2. Isolar e caracterizar as VEs provenientes da linhagem de MSCs por rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
3. Padronizar o carregamento dos miR-200c e 200b nas VEs por meio da técnica de eletroporação;
4. Avaliar a eficiência de carregamento dos miRNA-200s nas VEs por RT-PCR;
5. Avaliar os efeitos das VEs enriquecidas com miR-200c e 200b sobre a viabilidade celular das linhagens de interesse por MTT.

3. Material e Métodos

3.1 Estabelecimento e manutenção das linhagens tumorais.

As linhagens celulares tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 obtidas da ATCC (American Type Culture Collection) foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado pelo calor e 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Pen/Strep) a 37°C em atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO_2. Durante a fase logarítmica de crescimento, as células foram periodicamente subcultivadas em frascos contendo meio de cultura fresco, visando assegurar a manutenção da atividade proliferativa.

O processo de tripsinização celular foi realizado com uma solução de tripsina contendo EDTA (Gibco ®) (0,25% de tripsina e 1mM de EDTA). Previamente à tripsinização, a monocamada celular foi lavada com solução salina tamponada com

fosfato (PBS) (Gibco®), a fim de remover resíduos de SFB, os quais podem interferir na atividade da tripsina. Em seguida, a solução de tripsina/EDTA foi adicionada, e as células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2, por um período de 5 minutos.

Após o desprendimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura completo e submetidas à contagem em hemocitômetro, sendo a viabilidade celular avaliada por meio da exclusão do corante azul de tripan, que cora de azul apenas as células não viáveis (Louis and Siegel, 2011). Posteriormente, após confirmação de viabilidade celular superior a 90%, bem como a verificação da ausência de contaminantes microbiológicos e de alterações morfológicas, as linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 foram submetidas ao processo de criopreservação. Para esse procedimento, foi preparada uma solução de congelamento composta por 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), agente crioprotetor amplamente utilizado para prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares e preservar a integridade celular durante o congelamento.

3.2 Estabelecimento e manutenção das células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hAD-MSCs) foram adquiridas comercialmente da Invitrogen (StemPro® Human Adipose-Derived Stem Cells, Gibco, nº R7788110). As células são provenientes de tecido adiposo humano obtido de um único doador adulto, por meio de procedimento de lipoaspiração, conforme protocolos éticos e de consentimento previamente estabelecidos pelo fornecedor. De acordo com as especificações do fabricante, as células foram previamente expandidas por uma passagem antes da criopreservação e fornecidas em criotubos contendo 1 mL de suspensão celular, na concentração de 1×10^6 células/mL.

Inicialmente, a linhagem celular foi cultivada em meio específico para manutenção e expansão de células-tronco mesenquimais, MesenPro RS™ Basal Medium (Gibco, REF 12748-018), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina e 2% de MesenPro RS™ Growth Supplement (Gibco). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, as células foram submetidas à dissociação enzimática por tripsinização e, posteriormente, criopreservadas com o objetivo de estabelecer um banco celular inicial.

A continuidade da utilização do meio de cultura específico para MSCs mostrou-se inviável devido ao seu elevado custo. Dessa forma, após revisão da literatura científica, as hAD-MSCs passaram a ser cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium com baixa concentração de glicose (DMEM Low Glucose; Nova Biotecnologia), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor. Estudos prévios demonstram que o DMEM low glucose suplementado com FBS é capaz de sustentar adequadamente a viabilidade, a proliferação e as características morfológicas e fenotípicas das células-tronco mesenquimais, incluindo aquelas derivadas de tecido adiposo (PITTENGER et al., 1999; DOMINICI et al., 2006; BUNNELL et al., 2008).

3.3 Isolamento de EVs provenientes de células-tronco mesenquimais

As vesículas extracelulares foram isoladas conforme protocolo descrito previamente por Théry, Amigorena e Raposo (2006), com adaptações. As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano foram cultivadas em meio de cultura suplementado com FBS até a completa adesão e estabelecimento do crescimento celular. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, o meio de cultura foi substituído por meio com FBS depletado de vesículas extracelulares, e as células foram mantidas nessas condições por 48 horas, a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2, conforme recomendado para minimizar a contaminação por EVs exógenas (THÉRY et al., 2024).

Após o período de condicionamento, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e submetido a uma série de centrifugações diferenciais sequenciais: inicialmente a 2.000 × g por 15 minutos, a 4 °C, para remoção de células intactas e debris celulares; seguida de centrifugação a 10.000 × g por 30 minutos, a 4 °C, utilizando centrífuga refrigerada (Thermo Fisher Sorvall Legend RT), para eliminação de partículas maiores. O sobrenadante resultante foi então filtrado em filtro de membrana com poro de 0,22 µm e submetido à ultracentrifugação a 100.000 × g por 2 horas, a 4 °C, em ultracentrífuga Optima TLX (Beckman Coulter), para a sedimentação das vesículas extracelulares pequenas. Ao final do processo, o pellet obtido foi ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS) estéril para posterior caracterização e análises experimentais, em conformidade com as diretrizes da ISEV (THÉRY et al., 2024). O isolamento das vesículas extracelulares foi realizado a partir

de culturas celulares mantidas em meio MesenPro RS™ e em meio DMEM com baixa concentração de glicose, seguido de caracterização por análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA), utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical).

3.4 Caracterização das VEs por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de distribuição de tamanho e a quantificação das preparações de VEs foram realizadas em NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) equipado com captura rápida de vídeo e software de rastreamento de partículas. As vesículas purificadas foram diluídas em 1 mL de PBS. Cada amostra foi injetada em cubículo amostral do aparelho para análise. As configurações de dispersão e captura de fluorescência (como foco, câmera e configurações de ganho) foram otimizadas para tornar as faixas de partículas visíveis e, em seguida, as medições foram obtidas em triplicata e analisadas usando o software NanoSight NS300 (versão 3.2.16). Os dados sobre os tamanhos das EVs foram expressos como as médias calculadas ± DP de distribuição de tamanho.

3.5 Padronização e caracterização da eletroporação de miRNA-200c e 200b em EVs de células-tronco mesenquimais adiposas.

O carregamento do miRNA-200b e 200c mimético (hsa-miR-200b-3p mimics Synbio Technologies, Estados Unidos; hsa-miR-200c-3p mimics ThermoFischer Scientific; 5nmols) em vesículas extracelulares (VEs) derivadas de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo foi realizado por meio da técnica de eletroporação. A padronização do procedimento baseou-se em protocolos previamente descritos na literatura (MOMEN-HERAVI et al., 2014; SHOJAEI et al., 2023; SANTOS et al., 2023), com adaptações experimentais.

Para o procedimento, uma concentração de 1×10^{10} EVs/mL, obtidas a partir do sobrenadante de células-tronco mesenquimais cultivadas em meio DMEM com baixa concentração de glicose, foi misturada a tampões específicos para eletroporação na proporção de 1:1. Foram empregados dois tampões distintos: Tampão 1, composto por NaCl (137 mM), KCl (5 mM), dextrose (6 mM), $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (0,7 mM) e HEPES (21 mM), ajustado para pH 7,15; e Tampão 2, composto por ácido cítrico (0,02 M), fosfato de sódio bibásico (0,03 M) e EDTA (0,1

mM), ajustado para pH 4,4. As concentrações de miRNA-200c avaliadas foram de 100 nmol e 200 nmol e para o miRNA-200b foi de 10 nmol,100 nmol e 200 nmol.

A eletroporação foi realizada utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, Estados Unidos), com cubetas de 1 mm e volume final de 100 µL, empregando-se os parâmetros descritos na Tabela 1 e 2. Após a aplicação dos pulsos elétricos, as amostras foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de PBS estéril e mantidas em repouso por 10 a 20 minutos à temperatura ambiente, visando à recuperação da integridade da membrana vesicular. Em seguida, as amostras foram tratadas com RNase (10 mg/mL) por 15 minutos, a 37 °C, com o objetivo de degradar miRNAs não encapsulados. Para a remoção de miRNAs livres remanescentes, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação a 100.000 × g por 2 horas, a 4°C, utilizando ultracentrífuga Optima TLX (Beckman Coulter). Por fim, os pellets contendo as VEs eletroporadas foram ressuspensos em PBS estéril e armazenados a −80 °C até a realização das análises subsequentes.

A caracterização das EVs eletroporadas com miRNA-200b foi realizada por meio da análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis-NTA), considerando a concentração (EVs/mL) e o diâmetro médio das partículas (nm).

Tabela 1. Parâmetros utilizados para eletroporação de miRNA-200b em vesículas extracelulares provenientes de células-tronco mesenquimais.

Teste	Tampão	Concentração miRNA-200b	Programa
1	T.1	10 nmol	Square wave; 150V; 10ms; 1 pulso
2	T.1	100 nmol	Square wave; 150V; 10ms; 10 pulsos
3	T.2	10 nmol	Square wave; 150V; 10ms; 10 pulsos
4	T.2	100 nmol	Square wave; 750V; 5ms; 2 pulsos
5	T.1	100 nmol	Exponencial decay; 200V;100μF;1 pulso
6	T.1	100 nmol	Exponencial decay; 150V;100μF;1 pulso
7	T.1	100 pmol	Exponencial decay; 150V;100μF;1 pulso
8	T.1	200 pmol	Exponencial decay; 350V;100μF;1 pulso

Tabela 2. Parâmetros utilizados para eletroporação de miRNA-200c em vesículas extracelulares provenientes de células-tronco mesenquimais.

Teste	Tampão	Concentração miRNA-200c	Programa
1	T.1	100 pmol	Exponencial decay; 150V;100μF;1 pulso
2	T.1	200 nmol	Exponencial decay; 150V;100μF;1 pulso

Legenda: T.1 (Tampão 1); T.2 (Tampão 2); V (voltagem); ms (milissegundo).

3.6 Caracterização das EVs provenientes das MSCs e VEs/miRNA-200s por Microscopia eletrônica de transmissão.

As amostras de VEs das MSCs e as EVs/miRNA-200c e 200b foram incubadas com glutaraldeído 2% mais paraformaldeído 2 % em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7.4) por 2 horas, na temperatura de 4 ºC. Posteriormente, as amostras foram ultracentrifugadas 100.000×g a 4ºC por 1hora e o pellet obtido foi ressuspendido em 200μl de tampão de cacodilato de sódio. As imagens de TEM foram obtidas utilizando o microscópio JEOL JEM-1400 Flash (Programa de Equipamentos Multiusuário FAPESP EMU - Processo: 22/11494-3) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da FMRP-USP.

3.7 Confirmação da inserção do miRNA-200b nas EVs através de PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR).

A eficiência da eletroporação foi avaliada por meio da quantificação da expressão do miRNA-200c e 200b por RT-PCR, sendo selecionadas para essa análise apenas as vesículas extracelulares (EVs) eletroporadas correspondentes aos testes 1 e 2 (Tabela 2) para o miR-200c e os testes 2,6 e 7(Tabela 1) para o miR-200b, com base nos resultados obtidos pelo NanoSight NS300 (NTA), que indicaram melhor concentração e perfil de tamanho dessas amostras.

Para os ensaios funcionais, células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de seis poços, na densidade de 5 × 10^5 células/ml, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Pen/Strep). Após 24 horas de cultivo, o meio foi substituído por meio contendo soro fetal bovino depletado de vesículas extracelulares (dSFB), e as células foram tratadas com as EVs eletroporadas com miRNA-200b (testes 2,6,7) e miRNA-200c (testes 1 e 2) nas concentrações de 1×10^6 EVs/ml (teste 2, 6,7 – tabela 1 e testes 1 e 2 – tabela 2), 1×10^7 EVs/ml (teste 7 – tabela 1) e 1×10^8 EVs/ml (teste 2 – tabela 1). Após 24 horas de estímulo, as células foram lisadas para extração de miRNA utilizando o kit miRNeasy (Cat.No.217004, Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo instruções do fabricante, com o objetivo de avaliar a eficiência de internalização e entrega funcional do miRNA mediada pelas EVs eletroporadas.

A concentração e a pureza do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), por meio da avaliação das razões de absorbância 260/280 e 260/230. O miRNA foi convertido em DNA complementar (cDNA) por meio de reações de transcrição reversa utilizando o kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Cat. No. 4366596, Applied Biosystems). A expressão relativa dos miRNAs foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) empregando os ensaios TaqMan™ MicroRNA Assays (Cat. No. 4427975, Applied Biosystems) em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os níveis de expressão dos miRNAs foram normalizados utilizando o RNA U6 como controle endógeno, e a quantificação relativa foi calculada pelo método 2^-ΔΔCt. As reações de qPCR foram conduzidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 30 s, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 s e anelamento/extensão a 60°C por 20 s.

3.8 Ensaio de viabilidade celular - MTT

A viabilidade celular após o tratamento com EVs carregadas com miR-200b foi avaliada pelo ensaio de MTT. Nesta etapa inicial do estudo, foram utilizadas apenas EVs eletroporadas com 100 nmol de miR-200b, sendo que experimentos adicionais se encontram em andamento para a avaliação de outras condições de eletroporação.

As linhagens de câncer de mama foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5 × 10^4 células/poço, utilizando meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com 1 × 10^6, 1 × 10^7 ou 1 × 10^8 EVs derivadas de células-tronco mesenquimais, bem como com as mesmas concentrações de EVs/miR-200b, utilizando meio contendo FSB depletado de vesículas extracelulares. Um grupo controle não tratado, contendo apenas meio de cultura, foi incluído em todas as análises. Após 24, 48 e 72 h de tratamento, foram adicionados a cada poço 100 µL de meio RPMI-1640 suplementado com FSB depletado e 10 µL da solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] a 5 mg/mL. As placas foram incubadas por 4 h a 37°C para a formação dos cristais de formazan. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os cristais foram solubilizados com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi determinada a 540 nm utilizando leitor de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

3.9 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida dos testes de comparações múltiplas de Bonferroni e Sidak. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. Resultados

4.1 Morfologia das linhagens celulares.

O estabelecimento dessas linhagens no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) permitiu confirmar as características essenciais relatadas na literatura das células MDA-MB-231 e MCF-7, observando células mais alongadas e com rápida expansão para MDA-MB-231 e formato mais arredondado, poligonal para MCF-7 (Figura 3).

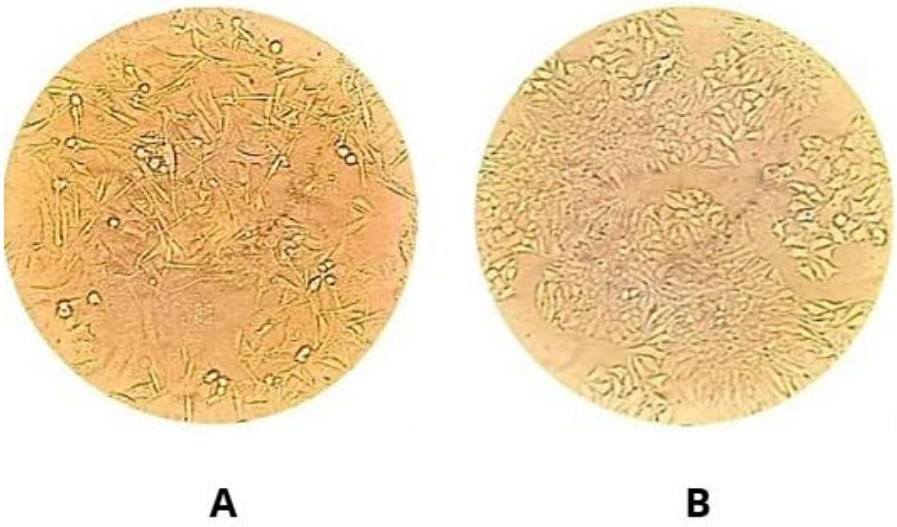


Figura 3. Fotomicrografias das linhagens de câncer de mama (A) MDA-MB-231 e (B) MCF-7 obtidas da ATCC (American Type Culture Collection). Fonte: autoral.

Para as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hAD-MSCs), foi observada a manutenção do padrão morfológico fibroblastoide, com projeções citoplasmáticas e núcleo ovalado característico das MSCs (DOMINICI et al., 2006) (Figura 4) durante o cultivo em DMEM low glicose, bem como crescimento celular compatível com o descrito na literatura para esse tipo celular.

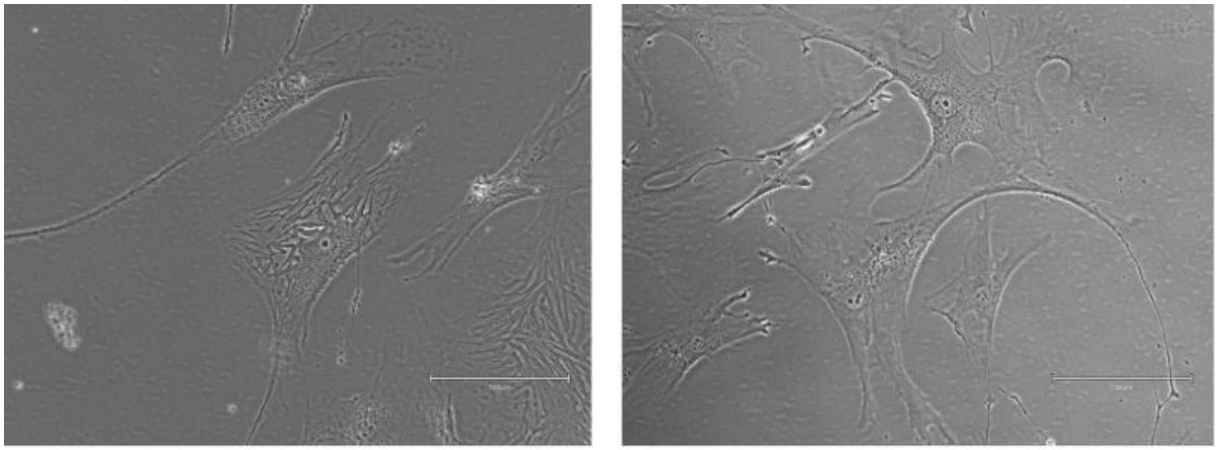


Figura 4. Fotomicrografias da linhagem de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (StemPro™ Human Adipose-Derived Stem Cell Kit – GibcoTM) adquirida da ThermoFisher Scientific. Em (A) célula-tronco mesenquimal com núcleo ovalado evidente, e (B) célula-tronco mesenquimal de formato fusiforme, com extremidades afiladas exibindo projeções citoplasmáticas. Fonte: autor.

4.2 Padronização e caracterização de VEs provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas.

As VEs de DMEM low glicose apresentaram concentração de $2{,}28\times10^{10}$ VEs/ml com média de 121,1 nm e moda de 85,6 nm (Figura 5A). Por sua vez, as VEs provenientes de MesenPRO apresentaram concentração de $1{,}29\times10^{10}$ VEs/ml, com média de 118,8 nm e moda de 85,5 nm (Figura 5B). Foi possível observar um perfil semelhante de concentração e tamanho das VEs obtidas dos meios de cultura DMEM low glicose e MesenPRO, comprovando a não influência dos meios de cultura no isolamento e caracterização das VEs. Portanto, estabelecemos o isolamento de VEs provenientes de DMEM low glicose para os experimentos futuros.

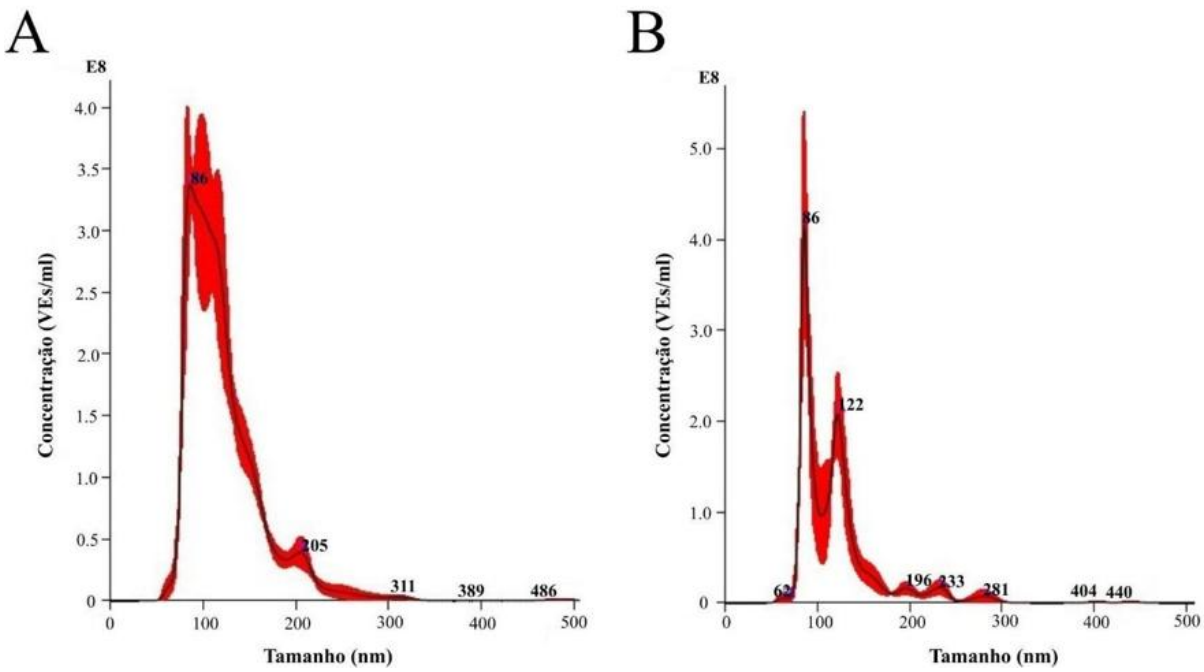


Figura 5. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas. Concentração (VEs/ml) e tamanho (nm) das VEs provenientes do sobrenadante de cultura celular em meio DMEM low glicose (A) e MesenPRO (B) por NanoSight NS300.

4.3 Padronização e caracterização da eletroporação de miRNA-200c e 200b em VEs de células-tronco mesenquimais adiposas.

As amostras de VEs/miRNA-200c apresentaram concentração de 1,53 × 10^9 VEs/mL, com tamanho médio de 148,7 nm e moda de 120,1 nm (teste 1; Tabela 3; Figura 6A), e concentração de 1,09 × 10^9 VEs/mL, com tamanho médio de 152,5 nm e moda de 104,1 nm (teste 2; Tabela 2; Figura 6B). Outros ensaios de eletroporação com o miRNA-200c também foram realizados; entretanto, observaram-se baixa concentração de VEs e perfil fragmentado nas análises de NTA, sugerindo possível degradação das vesículas

Tabela 3. Concentrações obtidas em cada teste após eletroporação de miRNA-200c em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais.

Teste	Tampão	Concentração miRNA-200c	Programa	Concentração de VEs obtidas
1	T.1	100 pmol	Exponencial decay; 150V;100µF;1 pulso	$1,53\times10^9$ VEs/ml
2	T.1	200 nmol	Exponencial decay; 150V;100µF;1 pulso	$1,09\times10^9$ VEs/ml

Legenda: T.1 (Tampão 1); T.2 (Tampão 2); V (voltagem); ms (milissegundo).

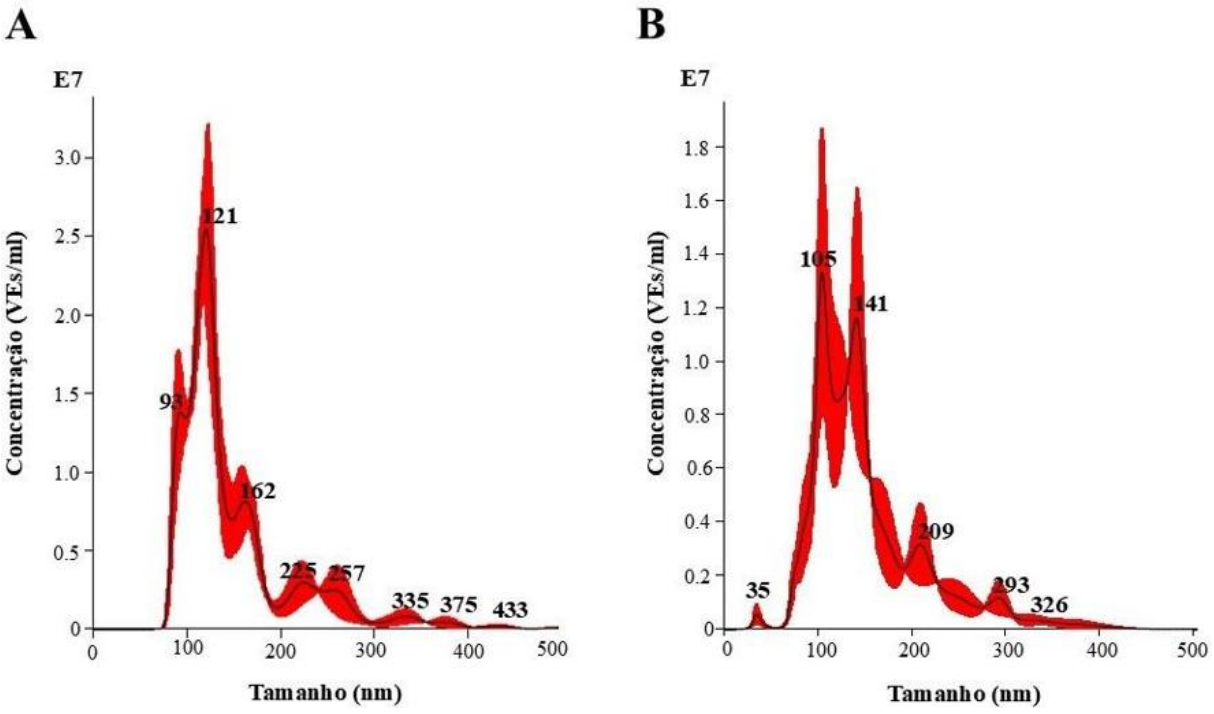


Figura 6. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) encapsuladas com miRNA-200c por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). VEs provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas foram eletroporadas com parâmetros variados e caracterizadas de acordo com a concentração (VEs/ml) e tamanho (nm) por NanoSight NS300 (A) teste 1 – 100 pmol; (B) teste 2 – 200 nmol.

As amostras de VEs/miRNA-200b apresentaram concentrações de 6,65 × 10⁹, 5,96 × 10⁹ e 1,29 × 10⁹ VEs/mL nos testes 1, 2 e 6, respectivamente (Figura 7A, 7B e

7F). Nos testes 3 a 5 e 7 a 8, as concentrações variaram entre 4,80 × 10^8 e 8,40 × 10^8 VEs/mL (Figura 7C–E, 7G e 7H) (Tabela 4). Os valores de média e moda do tamanho das partículas foram, respectivamente: 115,4 nm e 62,9 nm (teste 1); 136,4 nm e 87,1 nm (teste 2); 172,8 nm e 140,4 nm (teste 3); 218,9 nm e 105,6 nm (teste 4); 129,6 nm e 98,8 nm (teste 5); 129,8 nm e 97,1 nm (teste 6); 173,2 nm e 116,8 nm (teste 7); e 163,1 nm e 160,1 nm (teste 8).

Tabela 4. Concentrações obtidas em cada teste após eletroporação de miRNA-200b em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais.

Teste	Tampão	Concentração miRNA-200b	Programa	Concentração de VEs obtidas
1	T.1	10 nmol	Square wave; 150V; 10ms; 1 pulso	6,65×10^9 VEs/ml
2	T.1	100 nmol	Square wave; 150V; 10ms; 10 pulsos	5,96×10^9 VEs/ml
3	T.2	10 nmol	Square wave; 150V; 10ms; 10 pulsos	5,8×10^8 VEs/ml
4	T.2	100 nmol	Square wave; 750V; 5ms; 2 pulsos	4,8×10^8 VEs/ml
5	T.1	100 nmol	Exponencial decay; 200V;100μF;1 pulso	8,23×10^8 VEs/ml
6	T.1	100 nmol	Exponencial decay; 150V;100μF;1 pulso	1,29×10^9 VEs/ml
7	T.1	100 pmol	Exponencial decay; 150V;100μF;1 pulso	8,40×10^8 VEs/ml
8	T.1	200 pmol	Exponencial decay; 350V;100μF;1 pulso	6,43×10^8 VEs/ml

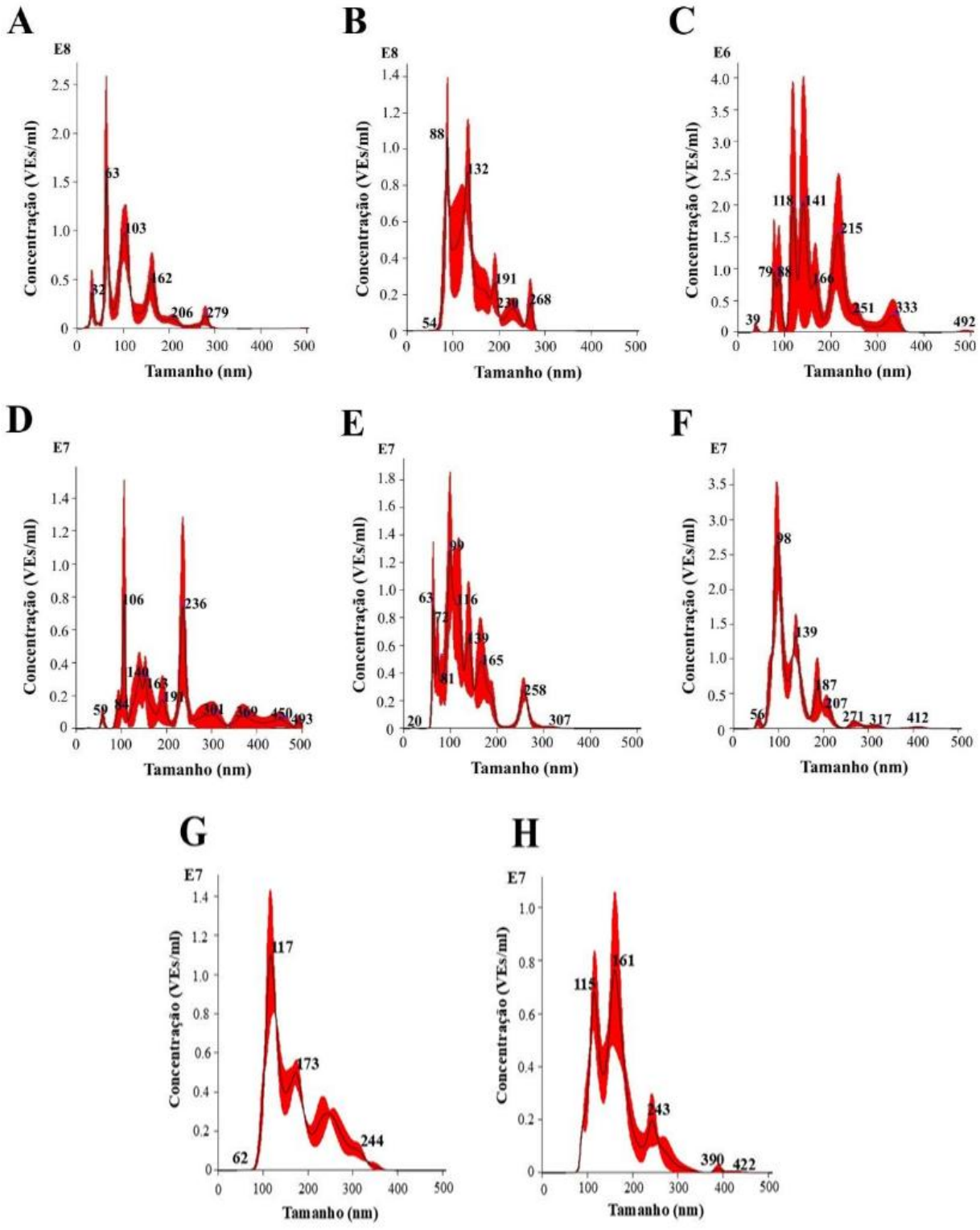


Figura 7. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) encapsuladas com miRNA-200b por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). VEs provenientes de células-tronco mesenquimais adiposas foram eletroporadas com parâmetros variados e caracterizadas de acordo com a concentração (VEs/ml) e tamanho (nm) por NanoSight NS300 (A) teste 1; (B) teste 2; (C) teste 3; (D) teste 4; (E) teste 5; (F) teste 6; (G) teste 7; (H) teste 8.

Dessa forma, considerando a concentração e a distribuição de tamanho das VEs/miRNA-200s, foram selecionados os testes 1 e 2 (Tabela 3) e os testes 2, 6 e 7 (Tabela 4) para a quantificação da expressão dos miRNA-200s por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

4.4 Caracterização das VEs provenientes das MSCs e VEs/miRNA-200s por Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Nas amostras provenientes de células-tronco mesenquimais (MSCs), observou-se a morfologia clássica em forma de taça (cup-shaped), frequentemente descrita na literatura para VEs (Szatanek et al., 2017; Jung & Mun, 2018). As VEs eletroporadas com miRNA-200b também apresentaram morfologia compatível com vesículas extracelulares preservadas, exibindo estruturas esféricas bem definidas e bicamada lipídica mais evidente e delimitada. Esses achados sugerem que as condições de eletroporação utilizadas permitiram a incorporação do miRNA sem comprometer significativamente a integridade estrutural das vesículas, corroborando os resultados obtidos nas análises de NTA. Por outro lado, não foi possível identificar estruturas compatíveis com VEs nas amostras eletroporadas com miRNA-200c, sendo necessária nova caracterização.

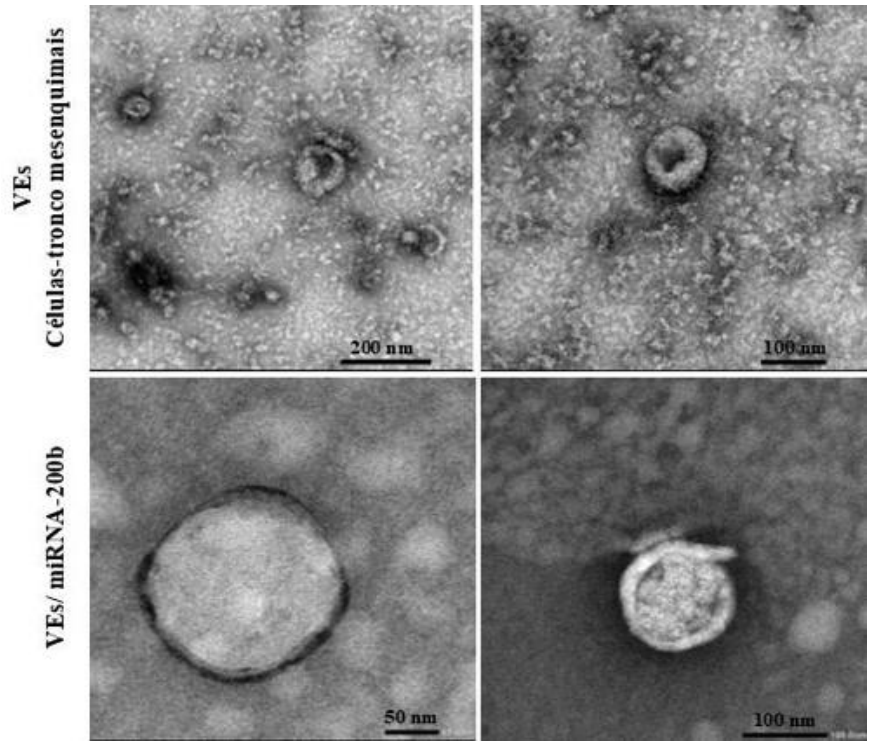


Figura 8. Caracterização das vesículas extracelulares (VEs) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Amostras de VEs provenientes de células-tronco mesenquimais e VEs/miRNA-200b com detecção de morfologia clássica. Escala de barra: 50, 100 e 200.

4.5 Confirmação da inserção do miRNA-200s nas VEs através de PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR).

Nossos resultados demonstraram aumento da expressão relativa de miRNA-200b no teste 2.1, submetido ao estímulo de 1×10^{8} VEs/mL, e nos testes 6 e 7, utilizando estímulo de 1×10^{6} VEs/mL. Esse aumento também foi observado nas VEs naturalmente derivadas das MSCs. Em contrapartida, os estímulos de 1×10^{6} e 1×10^{7} VEs/mL utilizando VEs eletroporadas provenientes dos testes 2 e 7.1 apresentaram redução da expressão relativa de miRNA-200b quando comparados ao grupo controle (células não tratadas) (Figura 9A). Em relação ao miRNA-200c, observou-se baixa expressão relativa após o processo de eletroporação sugerindo que a eletroporação não foi satisfatória, podendo ser explicado por degradação das VEs e miRNA durante a aplicação dos pulsos e voltagem e confirmado também pela dificuldade de caracterização das VEs dessas amostras por TEM. De forma inesperada, foi observado aumento significativo da expressão de miRNA-200c nas VEs derivadas de MSCs quando comparadas às VEs submetidas à eletroporação com miRNA-200c (Figura 9B).

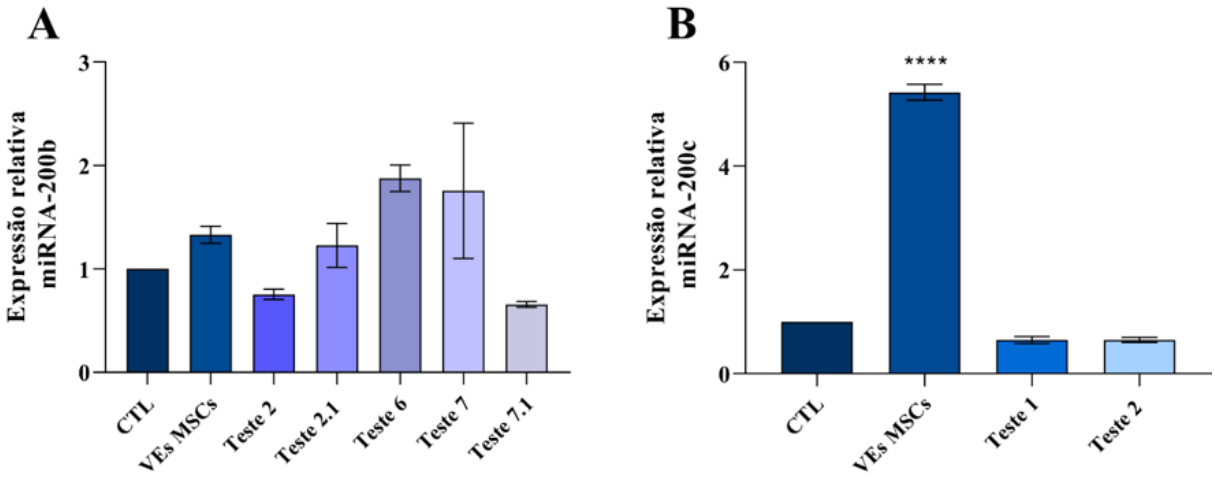


Figura 9. Validação do carregamento de miRNA-200s em vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). Expressão relativa de miRNA-200b (A) e miRNA-200c (B) em VEs carregadas por diferentes testes de eletroporação em comparação ao controle. U6 foi utilizado como controle endógeno. A análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett's múltiplas comparações. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão da média. * $p < 0,05$.

4.6 Ensaio de viabilidade celular - MTT

Os resultados mostraram que, no tratamento com 10^7 VEs/ml em 24h, houve diminuição da viabilidade celular para 87,5% nas VEs/miRNA-200b comparadas as VEs provenientes das células-tronco mesenquimais (Figura 10 A), entretanto a viabilidade celular se reestabelece nos tempos posteriores analisados (Figura 10 B, C). O tratamento com 10^6 VEs/ml apresentou discreta redução da viabilidade celular para 92,33% nos tempos de 24h e 48h com redução significativa para 86.5% no tempo de 72h (Figura 10 A-C). Por sua vez, o tratamento com 10^8 VEs/ml não mostrou eficácia na diminuição da viabilidade celular (Figura 10 A-C). É possível inferir que as VEs/miRNA-200b não apresentaram efeito citotóxico nas células MDA-MB-231.

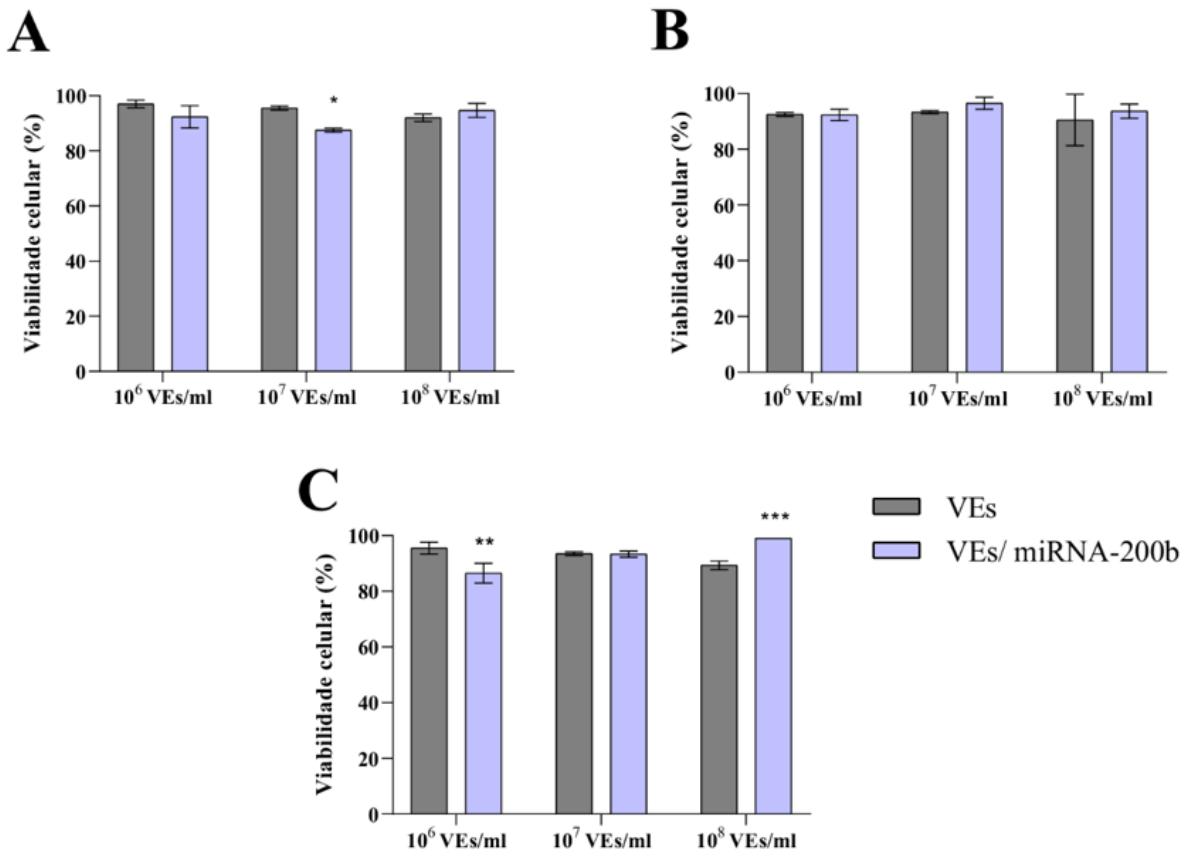


Figura 10. Análise do efeito das VEs/miRNA-200b na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 através de ensaio de MTT. As células MDA-MB-231 foram tratadas com VEs controle e VEs/miRNA-200b nas concentrações de 106, 107 e 108 VEs/ml nos tempos de 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. * $p < 0,05$.

5. Discussão

Inicialmente, observou-se que as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano mantiveram características morfológicas compatíveis com aquelas descritas na literatura, mesmo após adaptação para cultivo em meio DMEM low glucose. A preservação do padrão fibroblastoide e do crescimento celular adequado sugere que essa condição experimental foi suficiente para manutenção das características básicas das MSCs, permitindo sua utilização como fonte de vesículas extracelulares. Além disso, a adoção desse meio de cultura representou uma alternativa economicamente viável para a continuidade do projeto sem comprometer a qualidade biológica das células utilizadas.

A caracterização das vesículas extracelulares demonstrou que os meios de cultivo DMEM low glucose e MesenPRO produziram populações vesiculares com concentrações e distribuições de tamanho semelhantes. Esses resultados sugerem que a substituição do meio específico para MSCs por DMEM low glucose não exerceu influência substancial sobre os parâmetros avaliados das vesículas isoladas. Dessa forma, os dados obtidos sustentam a utilização das MSCs cultivadas em DMEM low glucose para os experimentos subsequentes, contribuindo para a padronização metodológica do estudo. Além disso, a caracterização demonstrou distribuição de tamanho compatível com populações enriquecidas em small extracellular vesicles, conforme descrito pelas diretrizes MIESEV2023. Segundo a *International Society for Extracellular Vesicles*, a caracterização adequada dessas partículas deve incluir análises complementares de concentração, distribuição de tamanho e morfologia, uma vez que nenhuma técnica isolada é capaz de confirmar plenamente a identidade das vesículas extracelulares (THÉRY et al., 2024). Nesse contexto, a combinação de análises de rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão empregadas neste trabalho contribuem para aumentar a confiabilidade da caracterização das amostras analisadas.

Em relação ao carregamento dos miRNAs por eletroporação, os resultados evidenciaram um dos principais desafios observados ao longo do trabalho. Embora essa técnica seja amplamente utilizada para a incorporação de moléculas terapêuticas em vesículas extracelulares, os parâmetros empregados durante o procedimento podem influenciar significativamente a eficiência de encapsulamento, bem como a integridade estrutural e a recuperação das partículas após o processamento (LENER

et al., 2015). No presente estudo, observou-se redução considerável da concentração de vesículas após determinados protocolos de eletroporação, especialmente em algumas condições empregadas para o miR-200c. O perfil heterogêneo das VEs pode estar relacionado às diferentes voltagens e ao número de pulsos empregados durante a eletroporação. Com base nos resultados obtidos neste estudo e em outros ensaios realizados pelo laboratório, observou-se melhor preservação da integridade das VEs quando utilizado o tampão 1, na voltagem de 150 V, com 1 ou 10 pulsos, empregando os programas square wave e exponential decay. Adicionalmente, verificou-se aumento do diâmetro médio das partículas em determinados grupos experimentais, o que pode estar relacionado à agregação vesicular ou a alterações da membrana induzidas pelos pulsos elétricos. Resultados semelhantes já foram descritos por Kooijmans et al. (2013), que demonstraram que a eletroporação pode promover agregação de RNA e interferir na interpretação da eficiência de carregamento em vesículas extracelulares. Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão reforçam essa hipótese. Enquanto as vesículas derivadas das MSCs eletroporadas com miR-200b apresentaram morfologia compatível com a literatura (THÉRY et al., 2024), não foi possível identificar estruturas vesiculares preservadas nas amostras eletroporadas com miR-200c. Entretanto, a ausência de estruturas visualizadas por microscopia eletrônica não constitui evidência direta de degradação das vesículas extracelulares, uma vez que fatores como baixa concentração de partículas, perdas durante o preparo das grades, agregação vesicular e limitações inerentes à própria técnica de microscopia podem comprometer a detecção adequada das amostras (THÉRY et al., 2024; WELSH et al.,2024). Dessa forma, análises complementares serão necessárias para determinar com maior precisão se as alterações observadas decorreram dos parâmetros de eletroporação empregados ou de limitações associadas aos métodos de caracterização utilizados.

A validação do carregamento dos miRNAs por RT-qPCR demonstrou que a eficiência da incorporação dos miRNAs para as células-alvo foi limitada. Embora alguns grupos tratados com vesículas contendo miR-200b tenham apresentado aumento da expressão relativa desse miRNA, os resultados foram heterogêneos entre as diferentes condições experimentais. De maneira particularmente relevante, observou-se baixa expressão relativa de miR-200c nas amostras submetidas à eletroporação. Esse achado sugere que os parâmetros de eletroporação utilizados

podem não ter sido adequados para promover carregamento eficiente do miR-200c, ou que parte do material introduzido não tenha permanecido associada às vesículas após as etapas de processamento e purificação. Outro aspecto que merece destaque é a possibilidade de que os mecanismos endógenos de empacotamento de miRNAs presentes nas MSCs sejam mais eficientes do que a incorporação artificial promovida pela eletroporação. Evidências recentes indicam que a seleção de RNAs para carregamento em vesículas extracelulares não ocorre de maneira aleatória, mas envolve processos biológicos altamente regulados, dependentes da interação entre proteínas ligantes de RNA e sequências específicas dos transcritos, o que contribui para o enriquecimento seletivo de determinados miRNAs nas vesículas (Mateescu et al., 2017; Shurtleff et al., 2016). Dessa forma, a simples introdução exógena de miRNAs nem sempre resulta em encapsulamento eficiente, sendo essa uma limitação reconhecida nas estratégias experimentais de carregamento artificial de vesículas extracelulares (Mateescu et al., 2017).

A avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT foi realizada com o objetivo de investigar possíveis efeitos citotóxicos decorrentes da exposição das células MDA-MB-231 às vesículas extracelulares carregadas com miR-200b. Os resultados demonstraram que o tratamento não promoveu redução expressiva da viabilidade celular nas condições analisadas, indicando que as vesículas utilizadas não apresentaram toxicidade significativa para as células-alvo. Embora tenha sido observada discreta redução da viabilidade em alguns grupos experimentais, especialmente após 72 horas de tratamento com a concentração de 10^6 VEs/mL, tais alterações foram pouco pronunciadas e não sugerem efeito citotóxico relevante.

Esse resultado é particularmente importante considerando a proposta terapêutica do estudo, uma vez que a utilização de vesículas extracelulares como sistemas de entrega de miRNAs depende da manutenção de um perfil de segurança adequado. Nesse contexto, a ausência de toxicidade significativa sugere que tanto as vesículas extracelulares derivadas de MSCs quanto o processo de carregamento empregado não comprometeram substancialmente a viabilidade celular nas condições experimentais avaliadas.

6. Conclusão

Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que as MSCs constituem uma fonte viável de vesículas extracelulares e que o protocolo de isolamento empregado

permitiu a obtenção de partículas com características compatíveis com aquelas descritas na literatura. Entretanto, os dados também evidenciam que a etapa de eletroporação ainda requer otimização, especialmente para o carregamento do miR-200c. A baixa eficiência observada na incorporação desse miRNA limita, até o momento, a avaliação conclusiva de seu potencial como estratégia para modulação da EMT em células de câncer de mama. Dessa forma, estudos futuros deverão concentrar-se na padronização dos parâmetros de eletroporação, na confirmação da eficiência de encapsulamento e na realização de ensaios funcionais voltados à análise de migração, invasão celular e expressão de genes associados à EMT, permitindo uma compreensão mais abrangente do potencial terapêutico dessa abordagem.

REFERÊNCIAS

BISWAS, S. et al. Triple-negative breast cancer: advances in molecular mechanisms and therapeutic strategies. **Cancers**, v. 16, n. 3, p. 1–28, 2024. Acesso em: 27 maio 2026.

BRACKEN, C. P.; GOODALL, G. J.; GREGORY, P. A. RNA regulatory mechanisms controlling TGF-β signaling and EMT in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 102–103, p. 4–16, 2024. Acesso em: 30 maio 2026.

BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. **Methods, Amsterdam**, v. 45, n. 2, p. 115–120, 2008. Acesso em: 01. jun. 2026.

BUSTAMANTE, E. et al. Brain Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. **The Breast Journal**, 2024, 8816102. DOI: 10.1155/2024/8816102. Acesso em: 03 set. 2026.

CAVALLARI, Ilaria *et al.* The miR-200 family of microRNAs: Fine tuners of epithelial-mesenchymal transition and circulating cancer biomarkers. **Cancers**, v. 13, n. 23, p. 5874, 2021. 01. jun. 2026.

CELIÀ-TERRASSA, T.; KANG, Y. How important is EMT for cancer metastasis? **PLoS biology**, v. 22, n. 2, p. e3002487, 2024. Acesso em: 27 Maio. 2026.

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147, 2015. Acesso em: 27 Maio. 2026.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy, Oxford**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Acesso em: 01 jun. 2026.

FAN, Y.; HE, S. The characteristics of tumor microenvironment in triple negative breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 14, p. 1–17, 2022. Acesso em: 27 maio 2026.

FIERABRACCI, A.; DEL FATTI, A.; MURACA, M. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: state-of-the-art and therapeutic applications. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, 2023. Acesso em: 1 jun. 2026.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, n. 1, p. 1–31, 2024. Acesso em: 27 maio 2026.

HUANG, Z.; YU, P.; TANG, J. Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 5395–5405, 2020. Acesso em: 27 maio 2026.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2026: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2026. Acesso em: 03 set. 2026.

JUNG, M. K.; MUN, J. Y. A new approach for isolating extracellular vesicles by applying a combination of ultrafiltration and size-exclusion chromatography. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1526351, 2018. Disponível em:https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1526351. Acesso em: 1 jun. 2026.

KOOIJMANS, S. A. A.; STREMERSCH, S.; BRAECKMANS, K.; et al. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 1, p. 229–238, 2013. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.08.014. Acesso em: 5 ago. 2026.

LAMBERT, A. W.; ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Cell-intrinsic and microenvironmental determinants of metastatic colonization**. Nature Cell Biology**, v. 26, 2024. DOI: 10.1038/s41556-024-01409-8. Acesso em: 03 set. 2026.

LEIGHTON, J.; KELLY, L. M.; et al. The miR-200 and miR-221/222 microRNA families: opposing effects on epithelial identity. *Cell Cycle*, v. 14, n. 7, p. 1067–1075, 2015. DOI: 10.1080/15384101.2015.1010922. Acesso em: 26 Maio. 2026.

LENER, T.; GIMONA, M.; AIGNER, L.; et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, p. 30087, 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.30087. Acesso em: 5 ago. 2026.

LI, D. et al. Heterogeneity and plasticity of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer metastasis: Focusing on partial EMT and regulatory mechanisms. **Cell Proliferation**, v. 56, n. 6, e13423, 2023. Acesso em: 27 maio 2026.

LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. J**ournal of Extracellular Vesicles**, v. 3, p. 26913, 2014. Acesso em: 03. jun. 2026.

LOUIS, K. S., & Siegel, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, *740*, 7–12, 2011 . Acesso em: 1 Jun. 2026.

MATEESCU, B.; KOWAL, E. J. K.; VAN BALKOM, B. W. M.; et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper. Journal of Extracellular Vesicles, v. 6, n. 1, p. 1286095, 2017. DOI: 10.1080/20013078.2017.1286095. Acesso em: 5 ago. 2026.

MENG, X. et al. Association of quantitative analysis of intratumoral reduced E-cadherin expression with lymph node metastasis and prognosis in patients with breast cancer. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2023. Acesso em: 27 Maio. 2026.

MERCKENS, A. et al. Altered phenotypes of breast epithelial × breast cancer hybrids after ZEB1 knock-out. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 24, p. 17310, 2023. Acesso em: 27 Maio. 2026.

MOMEN-HERAVI, F.; BALA, S.; BUKONG, T.; SZABO, G. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, p. 1517–1527, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.03.014. Acesso em: 24 jan. 2026.

NOLAN, E. et al. Mechanisms of organ-specific metastasis of breast cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 13, n. 11, 2023. DOI: 10.1101/cshperspect.a041255. Acesso em: 03 set. 2026.

PARK, M. et al. Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications**. International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 12, p. 6806, 2022. Acesso em: 27 maio 2026.

PARK, S. M. et al. The miR-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nature Cell Biology**, v. 10, p. 593–601, 2008. DOI: 10.1038/ncb1722. Acesso em: 27 maio 2026.

PEGTEL, D. M.; GOULD, S. J. Exosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 93, p. 783–810, 2024. Acesso em: 30 maio 2026.

PEROVANO FILHO, José Ricardo. et al. Imunoterapia e terapias-alvo: rumo a uma revolução no tratamento do câncer. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, *[S. l.]*, v. 10, n. 1, p. 1565–1571, 2024. Acesso em: 27 maio 2026.

PIEDRA-DELGADO, L. et al. Survival according to the site of metastasis in triple-negative breast cancer patients: The Peruvian experience. **PLOS ONE**, v. 19, n. 2, e0293833, 2024. DOI: 10.1371/journal.pone.0293833. Acesso em: 03 set. 2026.

PITTENGER, M. F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. npj **Regenerative Medicine**, v. 4, n. 22, 2019. Acesso em: 01 jun. 2026.

SANTOS, J. C. et al. Electroporation as a method to load small RNAs into extracellular vesicles: advantages and technical challenges. **Molecular Therapy – Methods & Clinical Development**, v. 29, p. 215–226, 2023. Acesso em: 24 jan. 2026.

SHANG, R. et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 24, p. 816–833, 2023. Acesso em: 30 maio 2026.

SHOJAEI, S. et al. Efficient loading of therapeutic microRNAs into extracellular vesicles by optimized electroporation protocols. **Journal of Extracellular Vesicles,** v. 12, n. 3, e12345, 2023. Acesso em: 24 jan. 2026.

SHURTLEFF, M. J.; YAO, J.; QIN, Y.; et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. **eLife**, v. 5, e19276, 2016. DOI: 10.7554/eLife.19276. Acesso em: 5 ago. 2026.

SIEGEL, Rebecca. L.; WAGLE, N. S.; JEMAL, A. Leading cancer deaths in people younger than 50 years. **JAMA**, v. 335, n. 7, p. 632–634, 2026. Acesso em: 27 maio 2026.

SZATANEK, Rafał; BAJ-KRZYWORZEKA, Monika; ZIMOCH, Jakub; LEKKA, Małgorzata; SIEDLAR, Maciej; BARAN, Jarek. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1153, 2017. Disponivel em: DOI: 10.3390/ijms18061153. Acesso em: 1 jun. 2026.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2023 (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, e12404, 2024. Acesso em: 29 maio 2026.

THOMPSON, Erik W. *et al.* EMT and cancer: what clinicians should know. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 22, n. 10, p. 711–733, 2025. Acesso em: 27 maio 2026.

VANTANGOLI, Marguerite M. et al. MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. ***PLoS One***, v. 10, n. 8, e0135426, 12 ago. 2015. Acesso em: 01 jun. 2026.

WANG, H. et al. The role of DYNLT3 in breast cancer proliferation, migration, and invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 14, p. 15289–15303, 2023. Acesso em: 27 Maio. 2026.

WELSH, J. A.; JONES, J. C.; ERB, U.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, e12404, 2024. DOI: 10.1002/jev2.12404. Acesso em: 5 ago. 2026.

WITWER, K. W. et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, 1609206, 2019. Acesso em: 1 jun. 2026.

WU, H.-T. et al. Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor ZEB1 in breast cancer. **Journal of translational medicine**, v. 18, n. 1, 2020. Acesso em: 27 Maio. 2026.

YU, H.; HU, J. Ferroptosis and EMT resistance in cancer: a comprehensive review of the interplay. **Frontiers in Oncology**, v. 14, 1344290, 2024. Acesso em: 27 maio 2026.