

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) é um subtipo particularmente agressivo de câncer de mama, caracterizado pela ausência de expressão de receptores de estrogênio (ER-negativo), progesterona (PR-negativo) e pela não superexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/neu). Essa falta de alvos moleculares específicos limita as opções terapêuticas, tornando a quimioterapia o principal recurso de tratamento. No entanto, o TNBC está associado a altas taxas de recidiva e a um prognóstico desfavorável (Lehman et al., 2024; Irvin e Carey, 2014). Esse subtipo acomete com maior frequência mulheres jovens e portadoras de mutações no gene BRCA1, sendo, na maioria dos casos, classificado no subtipo molecular basal-like. Apesar da elevada taxa de resposta inicial à quimioterapia, os pacientes apresentam risco aumentado de recorrência precoce e metástase, contribuindo para a baixa sobrevida global (Schlam et al., 2024; Wu et al., 2015; Foulkes et al., 2010; Diallo-Danebrock et al., 2007).

Avanços recentes na biologia molecular e na epigenética revelam que a regulação gênica aberrante no TNBC envolve os long non-coding RNAs (lncRNAs), RNAs com mais de 200 nucleotídeos que não codificam proteínas, mas modulam a expressão gênica e a progressão tumoral (Palma et al., 2025; Singh et al., 2023; Alberts, 2017). Um dos mecanismos-chave é a interação desses lncRNAs com os complexos SWI/SNF (switching defective/sucrose nonfermenting), remodeladores de cromatina dependentes de ATP, que organizam a estrutura da cromatina e regulam o acesso de fatores de transcrição aos seus genes-alvo (Sheng et al., 2025; Hao et al., 2025; Tang et al., 2017; Masliah-Planchon, 2015). Os lncRNAs podem modular a atividade dos complexos SWI/SNF de diferentes maneiras, funcionando como guias para direcionar os complexos a regiões específicas do genoma, como plataformas estruturais para a montagem do complexo, ou modulando diretamente sua função, impactando genes oncogênicos e supressores tumorais (Oo, et al., 2024; Hao, et al. 2025).

No TNBC, fatores de transcrição como o receptor de glicocorticoides (GR), GATA6, MYC e AP-1 (Wolf et al., 2023; Jones et al., 2022) regulam diferentes programas gênicos que controlam a proliferação celular, a invasão tumoral e a resistência à quimioterapia. O complexo SWI/SNF desempenha um papel central nesse processo, ao remodelar a cromatina e permitir que esses fatores de transcrição alcancem as regiões regulatórias necessárias para ativar seus genes-alvo. Estudos recentes mostram que a inibição da atividade do SWI/SNF interrompe simultaneamente vários desses programas oncogênicos, o que reduz o crescimento do tumor e aumenta a sensibilidade das células cancerígenas ao tratamento (Hao et al., 2025; Singh et al., 2023).

O dataset GSE261989 (Jansen et al., 2025) investigou os mecanismos moleculares do TNBC, usando a linha celular BT549, submetida a três tipos de intervenções: ativação do receptor de glicocorticoides (GR) com dexametasona (DEX), silenciamento do fator de transcrição GATA6 por siRNA e inibição da remodelação de cromatina mediada pelo complexo SWI/SNF por meio do inibidor BRM014. Essas manipulações têm como objetivo compreender como diferentes fatores regulatórios controlam redes de expressão gênica associadas à progressão tumoral. Os autores aplicaram o RNA-seq (sequenciamento de RNA de alto rendimento), permitindo o mapeamento global da expressão de genes codificantes e não codificantes (lncRNAs) em cada condição experimental. A partir desses dados, é possível identificar padrões de co-expressão gênica, genes reguladores centrais (hubs) e vias biológicas ativadas ou silenciadas, fornecendo subsídios para explorar vulnerabilidades do TNBC e potenciais alvos terapêuticos, como a dependência do tumor em relação ao complexo SWI/SNF.

Nesse contexto, destaca-se a utilização do pacote WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis), amplamente empregado para a identificação de módulos de genes altamente correlacionados em dados de expressão gênica e sua associação com características fenotípicas externas (Langfelder e Horvath, 2008; Zhang e Horvath, 2005). O WGCNA parte da construção de redes de coexpressão ponderadas, seguidas pela detecção de módulos por meio de clusterização hierárquica dinâmica, permitindo calcular medidas de conectividade, identificar genes hubs e relacionar módulos a variáveis experimentais de interesse (Barabási e Oltvai, 2004). No presente estudo, essa abordagem será aplicada ao dataset GSE261989, com o objetivo de identificar módulos enriquecidos em lncRNAs e caracterizar potenciais hubs regulatórios. A estrutura resultante será representada em forma de grafo, no qual os nós correspondem a lncRNAs diferencialmente expressos e mRNAs, enquanto as arestas representam relações de coexpressão significativa e associações derivadas do WGCNA. Cada elemento do grafo será anotado com atributos quantitativos obtidos nas análises, como log2FC e FDR (expressão diferencial), kME (centralidade em módulos) e NES/FDR (enriquecimento funcional). Essa representação integrativa permite não apenas mapear redes regulatórias complexas, mas também gerar hipóteses testáveis sobre o papel dos lncRNAs na progressão tumoral do TNBC (Sheng et al., 2025; Hao et al., 2025; Tang et al., 2017; Masliah-Planchon, 2015).

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) representa um desafio clínico e científico devido à sua agressividade, heterogeneidade molecular e à ausência de alvos terapêuticos específicos. Alterações em fatores de transcrição como GATA6 e MYC, na sinalização mediada pelo receptor de glicocorticoides (GR) e na atividade de complexos remodeladores de cromatina SWI/SNF estão intimamente associadas ao desenvolvimento tumoral e à progressão da doença (Wolf et al., 2023; Jones et al., 2022; Hao et al., 2025). Esses fatores desempenham papéis centrais na regulação da proliferação, invasão e resposta ao estresse celular, tornando-se elementos críticos para a compreensão da biologia do TNBC.

Paralelamente, avanços recentes destacam a importância dos RNAs longos não codificantes (lncRNAs) como reguladores-chave nessas mesmas vias. Os lncRNAs podem atuar como reguladores transcricionais diretos, scaffolds para proteínas de remodelação cromatínica ou ainda como moduladores da resposta celular a estresses ambientais e farmacológicos (Palma et al., 2025; Singh et al., 2023; Alberts, 2017). No contexto do TNBC, sua capacidade de interagir com fatores de transcrição e complexos remodeladores como o SWI/SNF sugere que esses transcritos funcionam como elementos regulatórios integrativos, conectando diferentes níveis de controle da expressão gênica (Sheng et al., 2025; Tang et al., 2017; Masliah-Planchon, 2015).

Diante disso, a integração de lncRNAs em análises de redes de coexpressão, como aquelas geradas pelo WGCNA, representa uma abordagem estratégica para compreender a biologia sistêmica do TNBC. Essa perspectiva possibilita não apenas a identificação de módulos gênicos associados a fenótipos tumorais e a detecção de hubs regulatórios, mas também a geração de hipóteses testáveis sobre a contribuição dos lncRNAs para a progressão tumoral e a resistência terapêutica.

## **OBJETIVO GERAL**

Investigar as vias regulatórias associadas ao câncer de mama triplo-negativo (TNBC) por meio da integração de RNAs longos não codificantes (lncRNAs) em análises de expressão gênica, considerando a ativação do receptor de glicocorticoides (GR) por dexametasona (DEX), o silenciamento de GATA6 via siRNA e a inibição da ATPase do complexo SWI/SNF pelo inibidor BRM014, utilizando a linhagem celular BT549 de TNBC.

**PERGUNTAS EXPERIMENTAIS**

- Existem lncRNAs sendo coexpressos com o receptor de glicocorticoide (GR), GATA6, o oncoproteína chave MYC e fatores de transcrição AP-1?
- Os lncRNAs estão presentes em módulos associados aos tratamentos?
- Há lncRNAs identificados como hubs?
- Vias importantes e enriquecidas estão sendo afetadas pela presença de lncRNAs?
- Algum lncRNA está diferencialmente expresso de forma significativa?
- Existem lncRNAs coexpressos com outros lncRNAs?

**METODOLOGIA**

Nosso estudo irá utilizar duas classes de tratamentos: perturbação genética por siRNA e tratamento químico (Tabela 1). Serão usadas duas bibliotecas distintas: uma com a técnica ChIP-Seq (GSE261988) e outra sem (GSE261989), ambas classificadas como Expression profiling by high throughput sequencing na plataforma Illumina NovaSeq 6000. Ambas serão baixadas usando SRA Toolkit (v3.2.1) do NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Tabela 1 - Condição e Tratamento por Categoria (Elaborado pelo autor.)

Categoria	Condição / Tratamento
siRNA / Perturbação genética	siCtl (controle)
	siGATA6
	siFRA1
	siJUN
Exposição a ligante / fármaco (tratamentos químicos)	VEH / Veh (controle do veículo)
	+DEX (dexametasona)
	DMSO (4 h, 24 h)
	BRM014 (4 h, 24 h)
	DEX + DMSO (4 h, 24 h)
	DEX + BRM014 (4 h, 24 h)

A primeira etapa será a integração das anotações dos lncRNA no arquivo de anotação genética do genoma humano (GRCh38), versão 46, ambos disponíveis no GENCODE, utilizando o programa AGAT (GENCODE - Human Release 46), de acordo com a anotação de lncRNA descrita em Palma et al. (2025).

Para o pré-processamento das amostras, será utilizada a pipeline nf-core/rnaseq (v3.13.0). A raw count matrix que será gerada durante o pré-processamento será utilizada para a Análise de Expressão Diferencial entre controle e tratamento nas condições estudadas, usando a pipeline nf-core/differentialabundance (v1.2.0) (Ewels et al., 2020). Essa matriz também servirá como entrada para os procedimentos de normalização, empregando os métodos TMM e RPKM, seguidos pela correção de efeito de lote.

Subsequentemente, os dados normalizados serão utilizados para a construção e análise de uma rede de coexpressão com o WGCNA (v1.72-1) em (Langfelder & Horvath, 2008), resultando na identificação de módulos gênicos e suas associações com os tratamentos estudados. Para identificar os principais hub genes em cada módulo, será aplicada a função chooseTopHubInEachModule do pacote WGCNA.

As funções biológicas dos módulos significativos serão inferidas por meio de análises de enriquecimento e interpretação funcional utilizando o QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA), que possibilita investigar vias canônicas associadas aos módulos identificados, prever redes regulatórias upstream (como fatores de transcrição, lncRNAs ou proteínas sinalizadoras potenciais responsáveis pelas alterações observadas), identificar doenças e funções moleculares relacionadas, além de explorar interações gene-gene ou gene-proteína em um contexto biológico amplo. Neste estudo, o IPA será a ferramenta principal de enriquecimento funcional. No entanto, para garantir reprodutibilidade e acessibilidade, destacamos que existem alternativas open source, como o clusterProfiler (v4.8.3, R) com as bases públicas Reactome, KEGG e GO, além do Cytoscape (v3.10.2) para visualização de redes, que podem ser utilizadas por outros grupos de pesquisa sem acesso a plataformas proprietárias.

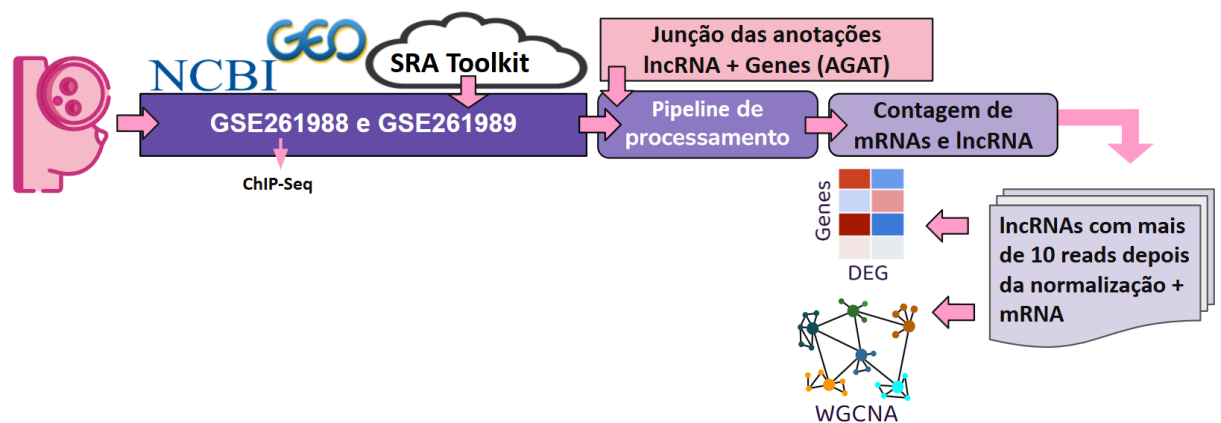


Figura 1 - Visão Geral da metodologia (Elaborado pelo autor).

## **RESULTADOS ESPERADOS**

Espera-se, em primeiro lugar, a detecção de lncRNAs com expressão robusta (acima de 10 leituras após normalização) no dataset GSE261989, garantindo a confiabilidade estatística dos transcritos considerados. A partir da análise de coexpressão, prevê-se a identificação de módulos associados aos tratamentos experimentais (ativação do GR por DEX, silenciamento de GATA6 e inibição do SWI/SNF por BRM014), enriquecidos em funções relevantes para a biologia tumoral, com destaque para vias relacionadas a proliferação, invasão e resistência ao tratamento.

Adicionalmente, espera-se a presença de lncRNAs atuando como hubs regulatórios dentro de alguns módulos, refletindo sua função de elementos centrais na rede e sugerindo um papel mais conectado do que muitos genes codificantes. Também se prevê a coexpressão entre diferentes lncRNAs, o que pode indicar potenciais interações regulatórias ou estruturais, sugerindo a formação de complexos funcionais mais amplos. Por fim, projeta-se a detecção de lncRNAs diferencialmente expressos de forma significativa entre os tratamentos, fornecendo evidências adicionais de sua participação nos mecanismos de resposta do TNBC.