

**JAQUELINE ALVES DE SOUZA**

**Conservação evolutiva e filogenia do miR-34a em mamíferos**

São José do Rio Preto, SP.

2025



**JAQUELINE ALVES DE SOUZA**

**Conservação evolutiva e filogenia do miR-34a em mamíferos**

Trabalho apresentado como requisito para conclusão da disciplina de Evolução genômica e Regulação da expressão gênica do Programa de Pós-graduação em Biociências.

Docentes: Profa. Dra. Claudia Márcia Aparecida Carareto

Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

São José do Rio Preto

2025

## 1.Introdução

### 1.1. Câncer de mama: classificação e fatores de risco

O câncer representa um grande desafio para a saúde pública, impactando negativamente a qualidade de vida das pacientes e aumentando as taxas de mortalidade (Wang; Lou, 2015; Orangi; Motovali-Bashi, 2019). A pandemia de coronavírus 2019 (COVID-19) causou atrasos significativos no diagnóstico e tratamento do câncer, principalmente devido aos *lockdowns*, que resultaram no fechamento e/ou restrição de serviços de saúde. Além disso, a crise provocou interrupções no emprego e no acesso a seguros de saúde, além de gerar medo generalizado de contágio ao novo coronavírus, afetando o acesso aos cuidados necessários (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024; Siegel *et al.*, 2023). Embora o maior impacto tenha sido observado em meados de 2020, a prestação de serviços de saúde ainda não se recuperou totalmente (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024; Siegel *et al.*, 2023). Atrasos no diagnóstico e tratamento podem causar um aumento de casos da doença em estágio avançado e da mortalidade associada (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024; Siegel *et al.*, 2023). Segundo Siegel e colaboradores (2023), essas e outras consequências secundárias da pandemia serão observadas ao longo dos anos, e será necessário algum tempo para quantificá-las a nível populacional, devido ao atraso de 2 a 3 anos nos dados de incidência e mortalidade por câncer.

O câncer de mama (CM) é o tipo mais comum entre as mulheres e a segunda principal causa de morte por câncer nesse grupo, seguido do câncer de pulmão (Giaquinto *et al.*, 2022; Mansoori *et al.*, 2021). Caracteriza-se por ser uma doença heterogênea, com diversos subtipos, envolvendo mecanismos biológicos complexos (Al-thoubaity, 2020). Apesar disso, estima-se que cerca de 30% dos casos de CM estejam relacionados a fatores de risco modificáveis, como excesso de peso, sedentarismo, etilismo, tabagismo, uso de outras drogas e, portanto, são preveníveis (Giaquinto *et al.*, 2022; Łukasiewicz *et al.*, 2021). Em 2022, a *American Cancer Society* estimou, aproximadamente 287 mil novos casos de câncer invasivo nos Estados Unidos, resultando em cerca de 43.250 mortes entre mulheres (Giaquinto *et al.*, 2022). Embora o CM ocorra predominantemente em mulheres, cerca de 2.710 casos e 530 mortes foram relatados em homens no mesmo ano (Giaquinto *et al.*, 2022). Devido à sua alta malignidade e agressividade, o tratamento ainda representa um grande desafio (Al-thoubaity, 2020; Han *et al.*, 2023). O carcinoma mamário é causado por mutações genéticas e somáticas nas células mamárias (Mansoori *et al.*, 2021). Alguns fatores podem influenciar o prognóstico e o tratamento do CM, tais como: fatores genéticos como alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CDHI* (Shahbandi; Nguyen; Jackson, 2020; Shiovitz; Korde, 2015), além de

aspectos como grau histológico, tipo e tamanho do tumor, metástase em linfonodos e expressão dos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2/neu) (Al-thoubaity, 2020). Segundo o *St. Gallen Consensus* de 2011, os subtipos moleculares de CM são classificados em Luminal A (ER+/PR+/HER2-/baixo Ki-67); Luminal B (ER +/PR+/HER2-/+/alto Ki-67); superexpressão de HER2 (ER-/PR-/HER2+) e câncer de mama triplo-negativo – CMTN – (ER-/PR-/HER2-) (Al-thoubaity, 2020; Goldhirsch *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Makdissi e colaboradores (2019) no Brasil revelou uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 89,9% para pacientes com câncer de mama. Apesar dos recentes avanços em tratamentos cirúrgicos, quimioterápicos, radioterápicos e hormonais, ainda existem pacientes em diferentes subgrupos de CM que apresentam alta morbidade, e as causas dessa resistência não são completamente compreendidas (Mansoori *et al.*, 2021). A recorrência, a metástase e a resistência à quimioterapia e à radioterapia continuam a resultar em prognósticos desfavoráveis, destacando a necessidade de novas abordagens terapêuticas (Mansoori *et al.*, 2021).

## 1.2. microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes, constituídas por cerca de 22 nucleotídeos, que participam da regulação gênica (Bartel, 2004; He; Hannon, 2004; Ho; Clark; Le, 2022; Mansoori *et al.*, 2021; Orangi; Motovali-Bashi, 2019). Os miRNAs participam de processos biológicos essenciais, como a proliferação e diferenciação celular, regulação do ciclo celular, apoptose e desenvolvimento (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Orangi; Motovali-Bashi, 2019; van Schooneveld *et al.*, 2015). A desregulação dos miRNAs pode contribuir para o desenvolvimento de enfermidades como o câncer (Calin; Croce, 2006; Lin; Lin; Yang, 2016; Orangi; Motovali-Bashi, 2019). Como resultado, os miRNAs têm sido cada vez mais reconhecidos como biomarcadores promissores para o diagnóstico e prognóstico do câncer (Esmailzadeh *et al.*, 2016; Mansoori *et al.*, 2021; Orangi; Motovali-Bashi, 2019).

A família miRNA-34 consiste em três membros, sendo o miR-34a expresso em todos os tecidos, com exceção do pulmonar (Bommer *et al.*, 2007; Orangi; Motovali-Bashi, 2019). O miR-34a regula genes que participam da regulação do ciclo celular, proliferação celular, senescência, apoptose, reparo de DNA e transição epitélio-mesenquimal (EMT) em células tronco-cancerosas (CSCs), demonstrando seu potencial prognóstico e terapêutico (Liu *et al.*, 2011; Mansoori *et al.*, 2021; Orangi; Motovali-Bashi, 2019; Wu *et al.*, 2014). Desse modo, moléculas de miRNA desempenham um papel fundamental em muitos processos celulares

(Ambros, 2004) e são reconhecidas por sua capacidade de inibir o crescimento tumoral, desempenhando um papel importante na regulação de várias vias de sinalização, como a via PI3K/AKT/mTOR (Imani *et al.*, 2017). Como a superexpressão desse miRNA pode inibir a migração e invasão de diversas células, observa-se que em células de câncer de mama metastático e tumores de mama primários com metástases linfonodais, a expressão do miR-34a encontra-se significativamente diminuído (Yang *et al.*, 2012). Assim, a expressão do miR-34a parece ser reduzida no CM, indicando que a expressão irregular pode influenciar negativamente a progressão do CM (Mansoori *et al.*, 2021; Si *et al.*, 2016). A evolução do miR-34a ainda não foi amplamente estudada, e seu mapeamento permanece limitado a algumas espécies modelos. Compreender a evolução molecular do miR-34a é fundamental, considerando seu papel regulatório em diversos processos celulares, o que pode contribuir para um melhor entendimento de sua participação em doenças, como o câncer de mama. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a evolução molecular e o grau de conservação da sequência do miR-34a entre diferentes grupos de mamíferos.

## **Objetivo**

Investigar a evolução molecular e a conservação da sequência do miR-34a entre diferentes grupos de mamíferos.

## **Metodologia**

A partir do banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) foram selecionadas 10 espécies de mamíferos (*Homo sapiens*, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Macaca mulatta*, *Monodelphis domestica*, *Bos taurus*, *Equus caballus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*). As sequências do RNA precursor do miR-34a foram obtidas no NCBI e confirmadas no miRBase. As sequências foram obtidas em formato fasta no NCBI e alinhadas no software MAFFT versão 7 (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences). Posteriormente, o alinhamento foi submetido à etapa de trimagem no software TrimAl disponível na plataforma Galaxy Europe (usegalaxy.eu), a fim de remover regiões pouco informativas ou mal alinhadas, garantindo a qualidade e a confiabilidade das análises subsequentes. O arquivo gerado com as sequências alinhadas foi importado para o software MEGA 12. O teste para verificar o melhor modelo foi realizado segundo o Critério de Informação Bayesiano (BIC). Assim, com o resultado do teste anterior foi realizada a análise de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) para inferir as relações evolutivas entre as sequências do miR-34a. Adicionalmente, foi construída uma árvore filogenética pelo

método de Neighbor-Joining (NJ), empregando o mesmo modelo evolutivo, a fim de comparar a topologia das árvores e avaliar a consistência filogenética entre os métodos.

## **Resultados e Discussões**

### **Resultados**

Na tabela 1 estão apresentados os resultados do teste de modelos de ML. A análise de substituição nucleotídica do miR-34a foi conduzida com 10 sequências de mamíferos, totalizando 62 posições analisadas após exclusão de lacunas. O modelo com o menor valor de BIC foi o modelo Jukes-Cantor (JC) como apresentado na tabela 1 (352.956), sendo posteriormente selecionado como o modelo evolutivo mais adequado para o conjunto de dados. O padrão e as taxas de substituição foram estimados sob o modelo de Jukes-Cantor (1969) que está apresentado na tabela 2. Uma distribuição gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre locais (5 categorias, [+G], parâmetro = 200,0000). Para simplificar, a soma dos valores de  $r$  é feita igual a 100. As frequências de nucleotídeos foram 25,00% (A), 25,00% (T/U), 25,00% (C) e 25,00% (G). Para estimar os valores de ML, uma topologia de árvore foi computada automaticamente. A máxima verossimilhança logarítmica para este cálculo foi de -121,826. O procedimento analítico abrangeu 10 sequências de nucleotídeos codificadores, utilizando posições 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e não codificadoras. A opção de exclusão completa foi aplicada para eliminar posições contendo lacunas e dados ausentes, resultando em um conjunto de dados final composto por 62 posições. As taxas de substituição entre todas as bases foram equivalentes ( $r = 0.083$ ), veja na tabela 2, refletindo evolução homogênea e ausência de viés direcional entre tipos de substituição.

Além disso, se estimou o viés de Transição/Transversão (R) que foi 1,02. O valor estimado para o parâmetro de forma da Distribuição Gama foi 200,00. Em seguida, as taxas de substituição foram estimadas pelo modelo de 2 parâmetros de Kimura (1980). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios (5 categorias, [+G]) e as taxas evolutivas médias nessas categorias foram 0,90, 0,96, 1,00, 1,04 e 1,10 substituições por sítio. As frequências de nucleotídeos também foram 25,00% (A), 25,00% (T/U), 25,00% (C) e 25,00% (G).

**Tabela 1.** Análise de Máxima Verossimilhança (ML) dos modelos de substituição nucleotídica para o precursor do miR-34a em mamíferos.

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
JC	17	352.956	278.667	-121.825	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2	18	358.647	280.050	-121.456	n/a	n/a	1.02	0.250	0.250	0.250	0.250	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062
JC+I	18	359.386	280.789	-121.825	0.00	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G	18	359.388	280.791	-121.826	n/a	200.00	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92	19	364.500	281.602	-121.167	n/a	n/a	1.02	0.275	0.275	0.225	0.225	0.068	0.055	0.114	0.068	0.114	0.055	0.068	0.140	0.055	0.140	0.068	0.055
K2+I	19	365.076	282.178	-121.456	0.00	n/a	1.02	0.250	0.250	0.250	0.250	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062
K2+G	19	365.078	282.180	-121.457	n/a	200.00	1.02	0.250	0.250	0.250	0.250	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062
JC+G+I	19	365.817	282.919	-121.826	0.00	200.00	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92+I	20	370.929	283.737	-121.167	0.00	n/a	1.02	0.275	0.275	0.225	0.225	0.068	0.055	0.114	0.068	0.114	0.055	0.068	0.140	0.055	0.140	0.068	0.055
T92+G	20	370.931	283.739	-121.168	n/a	200.00	1.02	0.275	0.275	0.225	0.225	0.068	0.055	0.114	0.068	0.114	0.055	0.068	0.140	0.055	0.140	0.068	0.055
K2+G+I	20	371.508	284.316	-121.457	0.00	200.00	1.02	0.250	0.250	0.250	0.250	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062	0.126	0.062	0.126	0.062	0.062
HKY	21	374.528	283.049	-119.752	n/a	n/a	1.03	0.268	0.282	0.156	0.294	0.070	0.039	0.149	0.066	0.079	0.072	0.066	0.143	0.072	0.136	0.070	0.039
T92+G+I	21	377.361	285.882	-121.168	0.00	200.00	1.02	0.275	0.275	0.225	0.225	0.068	0.055	0.114	0.068	0.114	0.055	0.068	0.140	0.055	0.140	0.068	0.055
TN93	22	380.947	285.188	-119.746	n/a	n/a	1.03	0.268	0.282	0.156	0.294	0.070	0.039	0.156	0.066	0.073	0.073	0.066	0.132	0.073	0.143	0.070	0.039
HKY+I	22	380.958	285.199	-119.752	0.00	n/a	1.03	0.268	0.282	0.156	0.294	0.070	0.039	0.149	0.066	0.079	0.072	0.066	0.143	0.072	0.136	0.070	0.039
HKY+G	22	380.959	285.200	-119.753	n/a	200.00	1.03	0.268	0.282	0.156	0.294	0.070	0.039	0.149	0.066	0.079	0.072	0.066	0.143	0.072	0.136	0.070	0.039
HKY+G+I	23	387.389	287.358	-119.753	0.00	200.00	1.03	0.268	0.282	0.156	0.294	0.070	0.039	0.149	0.066	0.079	0.072	0.066	0.143	0.072	0.136	0.070	0.039
GTR	25	399.732	291.177	-119.494	n/a	n/a	0.76	0.268	0.282	0.156	0.294	0.075	0.075	0.119	0.071	0.071	0.069	0.129	0.129	0.056	0.109	0.067	0.030

Esta tabela apresenta a qualidade do ajuste para modelos de substituição múltipla, incluindo suas estimativas de parâmetros. As pontuações do Critério de Informação Bayesiano (BIC) são usadas para selecionar o modelo ótimo. O valor de Máxima Verossimilhança (lnL) de cada modelo, o valor do Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc), o BIC e o número de parâmetros são apresentados. A variação da taxa evolutiva entre os locais foi modelada usando uma distribuição Gama discreta (+G) com 5 categorias de taxa e uma fração dos locais foi permitida ser evolutivamente invariante (+I). As estimativas do parâmetro de forma gama e da fração de locais invariantes também são mostradas, conforme apropriado. Os valores assumidos ou estimados de viés de transição/transversão (R) também são mostrados para cada modelo. Eles são seguidos pelas frequências de nucleotídeos (f) e taxas de substituições de bases (r) para cada par de nucleotídeos. A soma das estimativas de r é definida como 1 para cada modelo, facilitando as comparações entre os modelos. As análises de ML foram conduzidas utilizando uma topologia de árvore gerada automaticamente. Para aumentar a eficiência computacional, os cálculos de ML foram omitidos para 6 modelos de substituição considerados provavelmente subótimos com base nos valores de BIC e AICc dos modelos base. O procedimento analítico abrangeu 10 sequências de nucleotídeos codificadores usando 1ª, 2ª, 3ª e posições não codificadoras. A opção de exclusão completa foi aplicada para eliminar posições contendo lacunas e dados ausentes, resultando em um conjunto de dados final composto por 62 posições. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA12 utilizando até 6 threads de computação paralela.

**Abreviações:** GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura de 3 parâmetros; K2: Kimura de 2 parâmetros; JC: Jukes-Cantor.

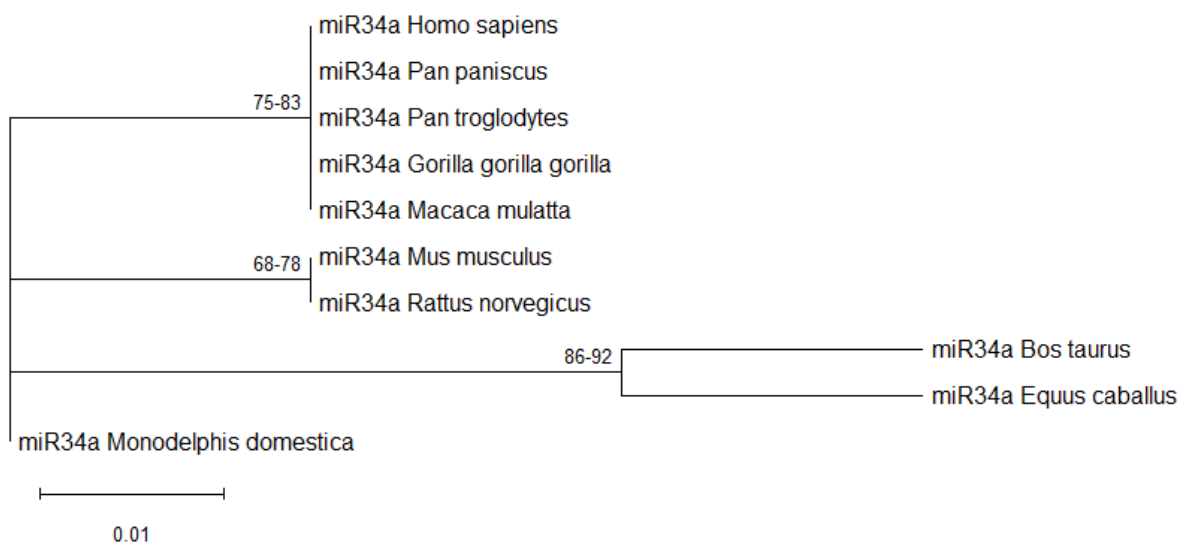
**Tabela 2.** Matriz de estimativa de máxima verossimilhança de substituição

	A	T/U	C	G
A	-	8.33	8.33	8.33
T/U	8.33	-	8.33	8.33
C	8.33	8.33	-	8.33
G	8.33	8.33	8.33	-

Cada entrada é a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna). As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA12.

A filogenia construída foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) e pelo modelo de Jukes-Cantor de substituições nucleotídica. A árvore com a maior log-verossimilhança (-121,83) está apresentada na figura 1. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam é apresentada acima dos ramos, sendo que o número de replicações (82) foi determinado de forma adaptativa. A árvore inicial para a busca heurística foi selecionada com base na maior log-verossimilhança entre uma árvore de Neighbor-Joining (NJ) e uma árvore de Máxima Parcimônia (MP). A árvore NJ foi gerada a partir de uma matriz de distâncias pareadas calculada pelo modelo de Jukes-Cantor (1969).

**Figura 1.** Análise evolutiva pelo método da Máxima Verossimilhança



A árvore MP teve o menor comprimento entre 10 buscas em árvores MP, cada uma realizada com uma árvore inicial gerada aleatoriamente. As diferenças na taxa evolutiva entre os sítios foram modeladas usando uma distribuição gama discreta em 5 categorias (+G, parâmetro = 200,0000). O procedimento analítico abrangeu 10 sequências de nucleotídeos codificadores usando 1ª, 2ª, 3ª e posições não codificadoras. A opção de exclusão completa foi aplicada para eliminar posições contendo lacunas e dados ausentes, resultando em um conjunto de dados final composto por 62 posições. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA12 utilizando até 6 threads de computação paralela.



## Discussões

Os resultados obtidos sugerem que o precursor de miR-34a pode ser altamente conservado entre mamíferos, com baixa divergência nucleotídica e substituições ocorrendo de forma neutra ou sob seleção purificadora. A razão transição/transversão próxima de 1 e o parâmetro gama elevado reforçam a ideia de que a maioria dos sítios podem ter evoluído de forma homogênea e sob forte restrição funcional, o que é coerente com o papel essencial do miR-34a na regulação gênica e supressão tumoral (Liu *et al.*, 2011; Mansoori *et al.*, 2021; Orangi; Motovali-Bashi, 2019; Wu *et al.*, 2014). A ausência de diferenças significativas entre as taxas de substituição pode indicar que o miR-34a manteve sua sequência primária praticamente inalterada ao longo da evolução dos mamíferos. Portanto, esses resultados apoiam a hipótese de que o miR-34a está sob seleção purificadora.

## Conclusões

O *miR-34a* parece apresentar alta conservação evolutiva entre mamíferos, com taxas de substituição homogêneas e ausência de sinais de seleção positiva. Esses achados sustentam seu papel essencial e ancestral como regulador, sendo um candidato robusto para estudos comparativos e terapias baseadas em miRNAs.

## Referências

- AL-THOUBAITY, Fatma Khinaifis. Molecular classification of breast cancer: a retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, v. 49, p. 44-48, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.11.021>
- BARTEL, David P. MicroRNAs. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, jan. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
- BOMMER, Guido T. et al. p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current Biology*, v. 17, n. 15, p. 1298-1307, ago. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068>.
- CALIN, George A.; CROCE, Carlo M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 11, p. 857-866, nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc1997>.
- ESMAILZADEH, Sahar et al. siRNA-Mediated Silencing of HMGA2 Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Colorectal Carcinoma. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, v. 48, n. 2, p. 156-163, 14 set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12029-016-9871-z>.

GIAQUINTO, Angela N. et al. Breast cancer statistics, 2022. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 3 out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21754>.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. Annals of Oncology, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>.

HE, Lin; HANNON, Gregory J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Reviews Genetics, v. 5, n. 7, p. 522-531, 1 jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg1379>.

HO, Phuong T. B.; CLARK, Ian M.; LE, Linh T. T. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 13, p. 7167, 28 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>.

IMANI, Saber et al. The diagnostic role of microRNA-34a in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget, v. 8, n. 14, p. 23177-23187, 20 fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15520>.

JUKES T.H.; CANTOR C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-132, Academic Press, New York.

KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. **Molecular Biology and Evolution**, 21 dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>. Acesso em: 28 out. 2025.

LIN, Ching-Wen; LIN, Pei-Ying; YANG, Pan-Chyr. Noncoding RNAs in Tumor Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Stem Cells International, v. 2016, p. 1-13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/2732705>

LIU, Can et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. Nature Medicine, v. 17, n. 2, p. 211-215, 16 jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2284>.

ŁUKASIEWICZ, Sergiusz et al. Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. Cancers, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.

MAKDISSI, Fabiana Baroni *et al.* Breast cancer survival in a brazilian cancer center: a cohort study of 5,095 patients. **Mastology**, v. 29, n. 1, p. 37-46, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.29289/2594539420190000437>.

MANSOORI, Behzad *et al.* miR-34a and miR-200c Have an Additive Tumor-Suppressive Effect on Breast Cancer Cells and Patient Prognosis. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 267, 12 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes12020267>.

ORANGI, Elham; MOTOVALI-BASHI, Majid. Evaluation of miRNA-9 and miRNA-34a as potential biomarkers for diagnosis of breast cancer in Iranian women. **Gene**, v. 687, p. 272-279, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.036>.

SAITOU N.; NEI M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.

SHAHBANDI, Ashkan; NGUYEN, Hoang D.; JACKSON, James G. TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. **Trends in Cancer**, v. 6, n. 2, p. 98-110, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.007>.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291-1299, jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>.

SI, Wentao *et al.* MiR-34a inhibits breast cancer proliferation and progression by targeting wnt1 in wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 352, n. 2, p. 191-199, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.05.002>.

SIEGEL, Rebecca L.; GIAQUINTO, Angela N.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2024. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, p. 12-49, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21820>.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17-48, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

VAN SCHOONEVELD, Eleni *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, 18 fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0526-y>.

WANG, Wei; LUO, Yun-ping. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 16, n. 1, p. 18-31, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1631/jzus.b1400184>.

WU, Mei-Yi et al. MiR-34a regulates therapy resistance by targeting HDAC1 and HDAC7 in breast cancer. *Cancer Letters*, v. 354, n. 2, p. 311-319, nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.031>.

YANG, S. et al. MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1. *Oncogene*, v. 32, n. 36, p. 4294-4303, 24 set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.432>.