



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Maria Vitória Cavalheiro Issler

**Modelo da influência de miRNAs nas vias de autofagia e apoptose em câncer de mama
triplo negativo**

Florianópolis
2021

Maria Vitória Cavalheiro Issler

Modelo da influência de miRNAs nas vias de autofagia e apoptose em câncer de mama triplo negativo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. André Avelino Pasa

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Issler, Maria Vitória Cavalheiro

Modelo da influência de miRNAs nas vias de autofagia e apoptose em câncer de mama triplo negativo / Maria Vitória Cavalheiro Issler ; orientador, André Avelino Pasa, coorientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, 2021.

110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Física, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Física. 2. Câncer de mama triplo negativo. 3. Autofagia e Apoptose. 4. miRNAs. 5. Modelagem . I. Pasa, André Avelino. II. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Física. IV. Título.

Maria Vitória Cavalheiro Issler

Modelo da influência de miRNAs nas vias de autofagia e apoptose em câncer de mama triplo negativo

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ney Lemke
Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a. Evelyn Winter da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a. Júlia Cisilotto
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Física.

Prof. Dr. Ivan Helmuth Bechtold
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. André Avelino Pasa
Orientador

Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa
Coorientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, por todo apoio e esforço que depositaram em mim durante todos esses anos. Minha querida mãe, sem você eu não teria chegado até aqui.

Aos professores André Avelino Pasa e Tânia Creczynski-Pasa, que me receberam em seus grupos de pesquisa, meu muito obrigada pela orientação, pelas oportunidades e ensinamentos nesses dois anos.

Ao Willian, que se tornou meu porto seguro nesses últimos quatro anos, pelo companheirismo e apoio incansável sempre que precisei.

À Ketlien, que consegue me fazer sorrir mesmo nos piores dias. Tu és a melhor amiga que uma pessoa poderia ter.

Aos meus colegas do LFFS, pelas experiências compartilhadas e convivência.

Por fim, meu agradecimento à UFSC, ao PPGFSC e ao CNPQ, pela possibilidade da realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado e com a maior taxa de mortalidade em mulheres. O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é um tipo altamente agressivo de câncer de mama que está associado a piores prognósticos. O começo de doenças desse tipo acontece em nível celular, quando células tumorais proliferam-se incontrolavelmente, destruindo tecidos do corpo e possivelmente espalhando-se para outras regiões. Erros no sistema de reparo das células podem induzir o desenvolvimento de células cancerosas. Caso o dano no DNA seja muito extenso, não sendo possível a progressão do ciclo celular, mecanismos de defesa impedem que células malignas se proliferem. Tais mecanismos incluem os processos considerados neste trabalho: apoptose e autofagia. A apoptose é um processo de morte celular programada que usualmente ocorre durante o desenvolvimento, envelhecimento e principalmente como mecanismo de defesa. Em contraste, a autofagia é um processo de autodigestão em que os componentes celulares são degradados de forma a fornecer energia para a célula. Um dos muitos reguladores de apoptose e autofagia são os MicroRNAs (miRNAs), que regulam ambos os processos através da alteração do nível de expressão de proteínas envolvidas nas respectivas vias de sinalização. O *cross-talk* entre autofagia e apoptose é a interação entre reguladores de ambos os processos. Neste trabalho, buscamos entender como as vias de apoptose e autofagia interagem em células de TNBC e qual a influência que diferentes miRNAs desempenham nesses processos. Com esse propósito, propomos a utilização do formalismo lógico e do formalismo baseado em equações diferenciais ordinárias (EDO) para estudar o comportamento dinâmico deste tipo de sistema. Assim, desenvolvemos um modelo que considera a influência de miRNAs nos processos de autofagia e apoptose em células de TNBC, utilizando aqueles que estão subexpressos/superexpressos em células de TNBC como *inputs*. Através das simulações do modelo, foram realizadas análise de estabilidade e perturbações de componentes da rede, verificando como o nocaute ou ativação fixa de determinado miRNA influencia nos processos apoptótico e autofágico. Analisamos que, em determinados casos, a combinação da atividade ectópica 1 do miR-100 com os nocautes do miR-144 e miR-200c parece ser a perturbação mais eficiente para induzir autofagia, enquanto que a superexpressão do miR-144 continua sendo o estímulo mais importante para induzir apoptose. Com esses resultados, foi possível analisar quais miRNAs com expressão alterada em TNBC são mais prováveis de serem alvos em potencial para abordagens terapêuticas em câncer de mama triplo negativo.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo negativo. Autofagia. Apoptose. miRNAs. Modelagem.

ABSTRACT

Breast cancer is the cancer most frequently diagnosed and with the highest mortality rate in women. Triple negative breast cancer (TNBC) is a highly aggressive type of breast cancer that is associated with worse prognosis. The onset of this kind of disease occurs at the cellular level, when tumor cells proliferate uncontrollably, possibly spreading to other regions. During the cell cycle, the cells are constantly attacked by genotoxic agents, which can cause injuries that lead to modifications in DNA structure. Impairments in the cell repair system might induce the development of cancer cells. If the DNA damages are very extensive and the cell cycle cannot flow, the defense mechanisms restrict the malignant cells of spreading. Such mechanisms include the processes focused in this work: apoptosis and autophagy. Apoptosis is a programmed cell death process that usually occurs during development, aging and especially as a defense mechanism. On the other hand, autophagy is a process of self-digestion in which cellular components are degraded to provide energy for the cell. One of the many regulators of apoptosis and autophagy are MicroRNAs (miRNAs), which regulate both processes by changing the level of expression of proteins involved in the respective signaling pathways. The cross-talk of autophagy and apoptosis is the interaction between regulators of both processes. In this work, we seek to understand how apoptosis and autophagy pathways interact in TNBC cells and what influence different types of miRNAs play in such processes. For this purpose, we propose using logical and ordinary differential equation (ODE) based formalisms to study the dynamical behavior of this kind of system. Therefore, we developed a model of the miRNA influence on autophagy and apoptosis processes in TNBC cells, using those that are downregulated/upregulated in TNBC cells as *inputs*. Through our model simulations, stability and perturbation analysis of network components were performed, verifying how the knockout or fixed activation of a given miRNA influences the apoptotic and autophagic processes. We analyzed that in certain cases the combination of miR-100 ectopic activity with miR-144 and miR-200c knockouts seems to be the most efficient perturbation to induce autophagy, while miR-144 overexpression continues to be the most important stimulus to induce apoptosis. With these results, it was possible to analyze which miRNAs with altered expression in TNBC are more likely to be potential targets for therapeutic approaches in triple negative breast cancer.

Keywords: Triple negative breast cancer. Autophagy. Apoptosis. miRNAs. Modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação da biogênese dos miRNAs.	25
Figura 2	– Representações da função booleana $\mathbf{B} = !\mathbf{x}_1 \& (\mathbf{x}_2 \mathbf{x}_3)$. Os operadores lógicos utilizados são AND ('&'), NOT ('!') e OR (' '). No cubo unitário, os vértices preenchidos em preto representam $B = 1$, e os vértices em branco, $B = 0$	29
Figura 3	– Exemplo de um modelo lógico. (a) Rede regulatória com três variáveis x_1 , x_2 e x_3 , em que x_1 é o <i>input</i> da rede. (b) Regras Lógicas de x_2 e x_3 . (c) Circuitos do modelo.	30
Figura 4	– Gráficos de Transição de Estados do modelo lógico da figura 3. (a) STG assíncrono. (b) STG síncrono. Estados de transição são representados por quadrados, e estados estáveis são representados por elipses.	30
Figura 5	– Funções de Hill com coeficientes $n = 1, 2, 3, 4, 5$ e $K_D = 0.5$	34
Figura 6	– Rede regulatória genérica. Os operadores lógicos utilizados são <i>AND</i> ('&'), <i>OR</i> (' ') e <i>NOT</i> ('!').	36
Figura 7	– Circuito negativo entre AMPK e ULK. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.	39
Figura 8	– Inibição de mTORC1 por AMPK e o circuito positivo entre mTORC1 e ULK; ativação da via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR por INSULINA. TSC1 E TSC2 estão representados por TSC_1_2. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.	40
Figura 9	– Circuito positivo entre ULK e AMBRA1 e a ativação da via autofágica. Estresse nutricional está representado por ESTRESSE_N, comp_PI3K representa o complexo PI3K e ATGs representa um complexo de proteínas do tipo ATG. As linhas verdes representam ativação.	41
Figura 10	– Ativação da caspase-8 e subsequente ativação da via intrínseca da apoptose. Estresse no DNA está representado por ESTRESSE_DNA. As caspases 3 e 7 estão representadas por CASP_3_7, tBid representa a forma truncada de Bid e cyt_C representa o citocromo C. As linhas verdes representam ativação.	42
Figura 11	– Regulação e funções regulatórias de Calpain e interação de Beclin-1 com as caspases. Ca2 representa Ca^{2+} intracelular. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.	43
Figura 12	– Inibição das vias de autofagia e apoptose por Bcl-2 e Bcl-X _L . As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.	44
Figura 13	– Regulações dos miR-93 e miR-106b. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.	45
Figura 14	– Regulações do miR-100. As linhas vermelhas representam inibição.	46
Figura 15	– Inibição de Calpain pelo miR-124. A linha vermelha representa inibição.	46

Figura 16 – Regulações do miR-144. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.	47
Figura 17 – Inibição de LC3 e BCL-2 pelo miR-200c. As linhas vermelhas representam inibição.	48
Figura 18 – Rede regulatória do <i>cross-talk</i> entre autofagia e apoptose em células de câncer de mama triplo negativo. A cor verde representa a via de autofagia, rosa representa a via de apoptose, azul representa os componentes do <i>cross-talk</i> , amarelo representa a via de PI3K/AKT/mTOR e laranja representa os miRNAs. As linhas verdes e vermelhas representam ativação e inibição, respectivamente.	49
Figura 19 – Circuitos funcionais do modelo. O sinal de cada circuito é definido pela multiplicação dos sinais das interações que compõem o circuito. As linhas verdes e vermelhas representam ativação e inibição, respectivamente.	52
Figura 20 – Estados estáveis para o caso do tipo selvagem. Cada linha representa um estado estável. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	54
Figura 21 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> CRESCIMENTO; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	55
Figura 22 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR93 e do miR106b, e nocaute dos miRNAs restantes. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	56
Figura 23 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR93 e do miR106b, e nocaute dos miRNAs restantes. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> CRESCIMENTO; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	57

Figura 24 – Estados estáveis para o nocaute do miR93 e do miR106b e atividade ectópica 1 dos miRNAs restantes. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	58
Figura 25 – Estados estáveis para o nocaute de todos os miRNAs. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	59
Figura 26 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para o nocaute de todos os miRNAs. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> CRESCIMENTO; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	60
Figura 27 – Estados estáveis para o nocaute do miR93 e miR106b. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	61
Figura 28 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para o nocaute do miR93 e miR106b. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> CRESCIMENTO; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	62
Figura 29 – Estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR100. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	63

- Figura 30 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR100. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*. 64
- Figura 31 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR124. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável. 65
- Figura 32 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR124. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*. 66
- Figura 33 – Estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR144. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável. 67
- Figura 34 – Estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR200c. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável. 68
- Figura 35 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR200c. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*. 69

Figura 36 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	70
Figura 37 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> APOPTOSE; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	71
Figura 38 – Estados estáveis para o nocaute dos miR93 e miR106b, e atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	72
Figura 39 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para o nocaute do miR93 e do miR106b, e atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> APOPTOSE; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	73
Figura 40 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124 e nocaute dos miRNAs restantes. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.	74
Figura 41 – Soma das probabilidades de cada estado estável para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124 e nocaute dos miRNAs restantes. AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o <i>output</i> AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam <i>outputs</i>	74
Figura 42 – Soma das probabilidades dos estados estáveis com perturbações dos miRNAs. 'Controle' refere-se à perturbação apenas com o nocaute do ESTRESSE_DNA, ESTRESSE_N, INSULINA e Ca2. Todos os outros casos possuem essa perturbação além das perturbações dos miRNAs.	76

Figura 43 – Resultado das simulações dos modelos booleano e contínuo. No estado inicial escolhido todas as variáveis têm valor zero. Cada linha horizontal representa a ativação/desativação das variáveis. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. (a) Simulação do modelo booleano. (b) Simulação do modelo contínuo.	88
Figura 44 – Resultado das simulações dos modelos booleano e contínuo. No estado inicial escolhido o miR100 e ESTRESSE_N estão ligados, e as outras variáveis estão desligadas. Cada linha horizontal representa a ativação/desativação das variáveis. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. (a) Simulação do modelo booleano. (b) Simulação do modelo contínuo.	88
Figura 45 – Resultado das simulações dos modelos booleano e contínuo. No estado inicial escolhido os <i>inputs</i> ESTRESSE_N, ESTRESSE_DNA, INSULINA e Ca2 estão ligados, e todas as outras variáveis estão desligadas. Cada linha horizontal representa a ativação/desativação das variáveis. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. (a) Simulação do modelo booleano. (b) Simulação do modelo contínuo.	89
Figura 46 – Comparação de diferentes parâmetros do em relação ao comportamento geral do sistema. Todos os outros parâmetros utilizados, exceto o k_{53} , são os seguintes: $n = 3$, $\tau = 1$ e $k = 0.5$	90
Figura 47 – Resultado da simulação com k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} iguais à 0.1. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. Na visualização do gráfico foram consideradas todas as variáveis que apresentam mudança em suas concentrações. Variáveis com concentrações fixas, como os <i>inputs</i> , não estão representadas no gráfico.	91
Figura 48 – Resultado da simulação com k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} iguais à 0.3. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. Na visualização do gráfico foram consideradas todas as variáveis que apresentam mudança em suas concentrações. Variáveis com concentrações fixas, como os <i>inputs</i> , não estão representadas no gráfico.	92
Figura 49 – Resultado da simulação com k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} iguais à 0.8. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. Na visualização do gráfico foram consideradas todas as variáveis que apresentam mudança em suas concentrações. Variáveis com concentrações fixas, como os <i>inputs</i> , não estão representadas no gráfico.	92
Figura 50 – Comparação de diferentes parâmetros do <i>cross-talk</i> em relação ao comportamento geral do sistema. Todos os outros parâmetros utilizados, exceto k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} , são os seguintes: $n = 3$, $\tau = 1$ e $k = 0.5$	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos cânceres de mama.	22
Quadro 2 – Bases de dados utilizadas para a construção da rede regulatória.	28
Quadro 3 – Parâmetros de cada interação.	37
Quadro 4 – Regulação de miRNAs em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).	44
Quadro 5 – Descrição dos componentes da rede regulatória.	50
Quadro 6 – Regras lógicas do modelo. Os operadores lógicos usados são &, e !, que significam, respectivamente, AND, OR e NOT.	53
Quadro 7 – Parâmetros de cada interação do modelo.	86
Quadro 8 – Tempos de vida das variáveis do modelo.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ago	Proteína Argonauta
CPT	Camptotecina
E1	Atividade ectópica 1
EDO	Equação diferencial ordinária
ER	Receptor de estrogênio
GoF	Ganho de função
GTP	Trifosfato de guanosina
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
KO	Nocaute
LoF	Perda de função
miRNA	microRNA
miRNA*	Fita passageira do miRNA
PR	Receptor de progesterona
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
STG	Gráfico de transição de estados
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	PROCESSOS BIOLÓGICOS	21
2.1	CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO	21
2.2	AUTOFAGIA	21
2.3	APOPTOSE	23
2.4	A VIA DE PI3K/AKT/mTOR	23
2.5	MICRORNAS (miRNAs)	24
3	MODELAGEM MATEMÁTICA DE SISTEMAS BIOLÓGICOS	27
3.1	FERRAMENTAS DE PESQUISA BIBLIOGRÁFICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO	27
3.2	FORMALISMO LÓGICO	28
3.3	MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UM MODELO BOLEANO PARA MODELO CONTÍNUO	31
3.3.1	Funções de Hill	31
3.3.2	Transformação do modelo booleano para o modelo contínuo	34
3.3.3	Exemplo de transformação de um modelo booleano genérico	36
4	DESCRIÇÃO DA REDE REGULATÓRIA	39
4.1	A VIA DE SINALIZAÇÃO DE AUTOFAGIA E A VIA DE PI3K/AKT/mTOR	39
4.2	VIAS DE SINALIZAÇÃO DE APOPTOSE	41
4.3	COMPONENTES DO <i>CROSS-TALK</i>	43
4.4	MIRNAS	44
4.4.1	miR-93 e miR-106b	45
4.4.2	miR-100	45
4.4.3	miR-124	46
4.4.4	miR-144	47
4.4.5	miR-200c	47
5	MODELO BOLEANO	49
5.1	REDE REGULATÓRIA DO <i>CROSS-TALK</i> ENTRE AUTOFAGIA E APOPTOSE EM CÉLULAS DE TNBC	49
5.2	REGRAS LÓGICAS	52
5.3	CIRCUITOS FUNCIONAIS	52
5.4	ESTADOS ESTÁVEIS	53
5.5	ANÁLISE DE PERTURBAÇÕES DOS MIRNAS	55

5.5.1	Condições normais em células de TNBC	55
5.5.2	Nocaute do miR93 e miR106b, atividade ectópica 1 dos miRNAs restantes .	58
5.5.3	Nocaute de todos os miRNAs	58
5.5.4	Nocaute do miR93 e do miR106b	60
5.5.5	Atividade ectópica 1 do miR100	62
5.5.6	Atividade ectópica 1 do miR124	64
5.5.7	Atividade ectópica 1 do miR144	66
5.5.8	Atividade ectópica 1 do miR200c	67
5.5.9	Atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124	69
5.5.10	Nocaute do miR93 e do miR106b, atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124	71
5.5.11	Atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124, nocaute dos miRNAs restantes	73
5.5.12	Nocaute dos <i>inputs</i> ESTRESSE_DNA, ESTRESSE_N, INSULINA e Ca2 .	75
6	MODELO CONTÍNUO	77
6.1	COMPARAÇÃO DE ESTADOS ESTÁVEIS COM O MODELO LÓGICO .	87
6.2	ANÁLISE DE PARÂMETROS DO <i>CROSS-TALK</i>	90
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
7.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	95
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer de mama é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres e com a maior taxa de mortalidade entre os diversos tipos de câncer. Mais de 2 milhões de novos casos de câncer de mama são diagnosticados anualmente, e mais de 600 mil mulheres morrem de câncer de mama a cada ano (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, são diagnosticados mais de 60 mil casos e mais de 18 mil mortes anualmente, sendo o câncer com a maior taxa de incidência e letalidade (INCA, 2020). O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é um tipo altamente agressivo de câncer de mama que está normalmente associado com maior proliferação e invasão celular, metástase e piores prognósticos (FOULKES *et al.*, 2010).

O começo de doenças desse tipo acontece em nível celular, quando células tumorais proliferam-se incontrolavelmente, destruindo tecidos do corpo e possivelmente espalhando-se para outras regiões. Durante o ciclo celular, as células são constantemente atacadas por agentes genotóxicos, os quais podem causar lesões que levam a modificações na estrutura do DNA. Essa grande variedade de lesões é detectada pelo sistema de reparo da célula. Erros neste sistema levam à proliferação de células com mutações, o que pode dar origem ao desenvolvimento de tumores (REINHARDT; SCHUMACHER, 2012). A resposta celular aos danos no DNA, também chamados de estresse no DNA, é mediada através dos *checkpoints* do ciclo celular, nos quais as células analisam se é possível continuar a divisão celular, são os chamados mecanismos de reparo do DNA. Caso o dano no DNA seja muito extenso, não sendo possível a progressão do ciclo celular, existem mecanismos de defesa para evitar que as células com dano proliferem-se. Esses mecanismos incluem a morte celular programada que pode ser induzida por diferentes vias de sinalização¹ como a da apoptose, autofagia, necrose, entre outras. Esses mecanismos servem como barreiras naturais que restringem as células mutadas de sobrevivência e disseminação (SU *et al.*, 2015).

A autofagia é um processo intracelular no qual macromoléculas são degradadas em partes menores de forma a fornecer energia para a célula, com o objetivo de protegê-la contra estresses relacionados à inanição. Esse processo é regulado pela via de sinalização de autofagia, composta pelas quinases ULK e VPS34 e seus reguladores, além de várias outras proteínas que interagem para regular cada estágio do processo. Já a apoptose é um processo de morte celular programada que ocorre normalmente durante a vida humana e funciona como um mecanismo de defesa quando células são danificadas, sendo um importante processo de supressão de tumores. Além disso, existe uma conexão entre as vias de sinalização de autofagia e apoptose por componentes que regulam os dois processos. Essa relação é chamada de *cross-talk* entre autofagia e apoptose. Ainda, importantes reguladores dos processos de apoptose e autofagia são os microRNAs. Frequentemente chamados de miRNAs, interagem com o mRNA específico

¹ Sinalização celular é um processo de comunicação entre as células e que controla as atividades celulares. Uma via de sinalização é definida por vários componentes que interagem através de reações químicas com a participação frequente de diferentes tipos de enzimas para controlar um determinado processo celular (eg. divisão celular).

de genes para alterar a expressão de proteínas e possuem funções regulatórias em inúmeros processos celulares.

É complexo entender as interações entre as diversas moléculas que fazem parte de um processo biológico, visto que mesmo um processo simples envolve muitos componentes que não apresentam um comportamento linear e não interagem de forma isolada. Uma possibilidade utilizada é a modelagem matemática, que consiste em modelos formados por uma rede de componentes interagentes que obedecem a fórmulas matemáticas, ajudam a entender a estrutura de um sistema: seja uma célula, um tecido ou um organismo, e prever o comportamento dinâmico do respectivo sistema. Essas redes que apresentam relações de interações entre seus componentes são definidas como redes regulatórias. Os modelos matemáticos de redes genéticas permitem simulações numéricas que mostram o comportamento dinâmico de um sistema, podendo reproduzir observações experimentais e levar a predição de resultados (LE NOVÈRE, 2015). Neste trabalho, estamos considerando dois formalismos: a modelagem lógica, que é uma abordagem qualitativa baseada no formalismo lógico aplicado em processos biológicos por R. Thomas (THOMAS, R.; D'ARI, 1990); a modelagem por equações diferenciais ordinárias (EDOs), que é uma abordagem quantitativa e considera variáveis contínuas. Entre as diversas aplicações dos dois tipos de formalismos, foram publicados trabalhos sobre a regulação do destino celular no câncer (GRIECO *et al.*, 2013), estudo de sinergias de drogas (FLOBAK *et al.*, 2015), senescência celular (MOMBACH *et al.*, 2014), apoptose celular (BAGCI *et al.*, 2006) e autofagia (LIU, B. *et al.*, 2017).

Neste trabalho, buscamos estudar como as vias de sinalização de apoptose e autofagia interagem em células de TNBC e qual a influência que diferentes tipos de miRNAs desempenham nesses processos. Com esse propósito, propomos a modelagem da influência de miRNAs nos processos de autofagia e apoptose em células de TNBC. Construímos uma rede regulatória com os principais componentes desses processos e a utilização de miRNAs que estão subexpressos/superexpressos em TNBC como *inputs* da rede. Nosso modelo é composto pela rede regulatória, que apresenta as relações de ativação e inibição entre os componentes, condições iniciais estabelecidas e expressões matemáticas que determinam como cada variável interage com todo sistema. Assim, o modelo pode ser simulado, seguindo as expressões estabelecidas, e apresentar o comportamento dinâmico do sistema através da evolução de um estado inicial até um estado fixo. Primeiramente utilizamos o formalismo lógico, em que cada variável assume valores 0 ou 1 (booleana) e cada expressão matemática utiliza os operadores lógicos, a qual neste caso é chamada de regra lógica. Após a construção do modelo lógico, a transformação do modelo para um modelo contínuo foi realizada, em que as expressões matemáticas são EDOs e as variáveis são contínuas. Em ambos os modelos, os *outputs* possíveis são o destino celular de apoptose, autofagia ou crescimento. Os formalismos que utilizamos permitem a análise de perturbações de componentes da rede, permitindo verificar como a inibição ou ativação de um componente interfere em todo o sistema. Assim, conseguimos analisar como o nocaute ou ativação fixa da expressão de um determinado miRNA influencia nos processos apoptótico e

autofágico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho é estudar como as vias de sinalização de apoptose e autofagia interagem em células de TNBC, e quais miRNAs com expressão alterada nesse tipo de linhagem celular são mais prováveis de serem alvos em potencial para abordagens terapêuticas em câncer de mama triplo negativo.

1.1.2 Objetivos Específicos

Com o objetivo geral delimitado, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Construir um modelo lógico com os principais componentes das vias de autofagia e apoptose.
- Utilizar miRNAs que estão subexpressos/superexpressos em células de TNBC como *inputs* do modelo.
- Transformar o modelo lógico em um modelo contínuo.
- Analisar o comportamento dinâmico do modelo nos formalismos lógico e contínuo.
- Analisar como o nocaute ou ativação fixa da expressão de um determinado miRNA influencia nos processos apoptótico e autofágico.
- Analisar as probabilidades de acessibilidade das perturbações dos miRNAs.

2 PROCESSOS BIOLÓGICOS

2.1 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

Clinicamente, o câncer de mama pode ser classificado em três grandes grupos baseados em marcadores celulares e implicações terapêuticas: tumores com expressão do receptor de estrogênio (ER+) ou expressão do receptor de progesterona (PR+); tumores com a amplificação da expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) com ou sem ER+ e PR+; tumores que são caracterizados pela ausência da expressão de ER e PR, e ausência da amplificação de HER2 (KUMAR; AGGARWAL, 2016). O último grupo é um tipo agressivo de câncer de mama invasivo, classificado como câncer de mama triplo negativo (TNBC), baseado na falta desses três marcadores moleculares. O câncer de mama triplo negativo representa entre 15% a 20% de todos os tipos de cânceres de mama (BROWN *et al.*, 2008).

As opções terapêuticas em estágios iniciais e finais de câncer de mama são significativamente afetadas pela expressão de PR, ER e HER2. Usualmente, cânceres do tipo HER2+ e TNBC têm prognósticos menos favoráveis quando comparados com outros tipos de câncer de mama (CHAVEZ *et al.*, 2010). Enquanto tumores que expressam ER e PR são tratados com agentes que interferem na produção de hormônios (terapia endócrina), e cânceres do tipo HER2+ são tratados com agentes que inibem HER2, os TNBCs são tratados geralmente com quimioterapia e não são responsivos à terapia endócrina e terapias anti HER2 (TOSS; CRISTOFANILLI, 2015). Assim, TNBCs apresentam um curso clínico altamente agressivo, com altas taxas de proliferação, idade precoce de início, maior potencial metastático, piores prognósticos e menor taxa de sobrevivência nos 5 primeiros anos após o diagnóstico do que os outros tipos de câncer de mama (DENT *et al.*, 2007; GARRIDO-CASTRO *et al.*, 2019).

O quadro 1 apresenta a classificação mais detalhada dos subtipos de cânceres de mama e alguns exemplos de linhagens celulares. Os tumores do tipo *basal-like* e *claudin-low* formam a maioria dos cânceres do tipo TNBC (POMMIER *et al.*, 2020).

2.2 AUTOFAGIA

A autofagia é um processo de autodigestão intracelular no qual componentes celulares, como os substratos e organelas, são envoltas por autofagossomas e entregues aos lisossomos para degradação (CICCHINI *et al.*, 2015), de forma a prover energia para a célula. As principais funções da autofagia são de proteger as células contra a inanição e estresses relacionados. Ao regular a autofagia sob tais condições, as células degradam macromoléculas em partes menores, conseguindo energia para manter a homeostase celular (BENTO *et al.*, 2016). Esse processo é regulado pela via de sinalização de autofagia, composta pelas quinases ULK e VPS34, seus reguladores, como Beclin-1 e Fip200, além de várias outras proteínas que interagem para regular cada estágio desse processo. Os mecanismos de funcionamento da via de sinalização de autofagia estão descritos detalhadamente no capítulo 4.

Quadro 1 – Classificação dos cânceres de mama.

Subtipo	Expressão de ER, PR e HER2	Característica	Exemplos de linhagem celular	É TNBC?
Luminal A	ER+ ou PR+ ou ambos, HER2-	· Responsivo à terapia endócrina e à quimioterapia (em alguns casos)	MCF7	Não
		· Melhor prognóstico, taxa mais alta de sobrevivência	HCC1428	Não
Luminal B	ER+ ou PR+ ou ambos, HER2+	· Usualmente responsivo à terapia endócrina, variável à quimioterapia. Casos HER2+ são responsivos ao Trastuzumabe	BT474	Não
		· Prognóstico ruim	MDA-MB-361	Não
<i>Basal-like</i>	ER-, PR-, HER2±	· Usualmente responsivo à quimioterapia	BT20	Sim
		· Prognóstico ruim	HCC70	Sim
HER2 positivo	ER-, PR-, HER2+	· Responsivo ao Trastuzumabe e à quimioterapia	SKBR3	Não
		· Prognóstico ruim e relapso frequente	SUM190PT	Não
<i>Claudin-low</i>	ER-, PR-, HER2-	· Resposta intermediária à quimioterapia	MDA-MB-231	Sim
		· Tumor agressivo	BT-549	Sim
		· 70% são TNBC		
<i>Normal-like</i>	Tumores que não se encaixam nas categorias acima	· Tumores pequenos	HCC38	Sim

Fonte – A autora baseado em Chavez *et al.* (2010), Krishnamurthy *et al.* (2012), Riaz *et al.* (2013), Sabatier *et al.* (2014), Toss e Cristofanilli (2015), Xiaofeng Dai *et al.* (2017) e Dias *et al.* (2017).

Na carcinogênese, a autofagia apresenta um papel complexo. Em estágios iniciais, o processo geralmente suprime a iniciação de tumores. Entretanto, parece promover a progressão de tumores quando as células estão privadas de nutrientes (CICCHINI *et al.*, 2015; GALLUZZI *et al.*, 2015), assim dependendo do estágio e contexto em que acontece. Ainda, sob algumas condições, a autofagia descontrolada leva à morte celular necrótica independente de caspases, o que é denominado de “morte celular autofágica” (GOZUACIK *et al.*, 2017). Células deficientes de processos autofágicos normalmente apresentam um aumento na instabilidade do genoma (CICCHINI *et al.*, 2015).

Em células de TNBC, o processo autofágico também depende do contexto em que acontece. Sun e colaboradores verificaram que a irradiação por raios-X em células do tipo MDA-MB-231 aumenta a expressão da proteína LC3B e ativa a via de autofagia, indicando que o processo autofágico é iniciado como uma resposta adaptativa para promover a sobrevivência das células de câncer de mama triplo negativo depois de receberem radiação (SUN, Q. *et al.*, 2015).

Assim, nesse caso, a autofagia induzida por irradiação protege as células de TNBC.

Além disso, Abedin e colaboradores trataram diferentes linhagens de câncer de mama invasivo e não invasivo com o fármaco Camptotecina (CPT), que tipicamente ativa a via intrínseca de apoptose. Foi observado que em linhagens de células de câncer de mama não invasivo, como a MCF-7, CPT ativou a via intrínseca e simultaneamente ativou uma resposta autofágica nas células, o que prolongou a sobrevivência celular pelo retardamento da taxa de apoptose. Já nas linhagens de câncer de mama invasivo BT-549, MDA-MB-231 e MDA-MB-435, em que as duas primeiras são linhagens de TNBC, houve resistência das células à mesma quantidade de CPT que matou as células de câncer de mama não invasivo, mesmo na presença ou ausência de inibidores de autofagia (ABEDIN *et al.*, 2007).

2.3 APOPTOSE

A apoptose é um processo que envolve a eliminação geneticamente determinada das células. Ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento humano como um mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos e, principalmente, como um mecanismo de defesa quando as células são danificadas (ELMORE, 2007). Assim, dependendo do contexto, a apoptose torna-se um importante processo supressor de tumores.

As caspases são importantes proteases envolvidas na regulação da apoptose. Existem duas vias de sinalização básicas de apoptose: a via extrínseca a via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca apoptótica é ativada pela ligação de um ligante a um receptor de morte (e.g., Fas), que leva à ativação da caspase-8. Esta caspase pode iniciar a apoptose diretamente por clivagem e, assim, ativar as caspases executoras (-3, -6, -7), ou ativar a via intrínseca apoptótica. A via intrínseca também pode ser ativada por diversos sinais de estresse, incluindo dano no DNA, estresse oxidativo, tratamento com fármacos citotóxicos e privação de fatores de crescimento, resultando no início do processo apoptótico (MCILWAIN *et al.*, 2013). A descrição das vias de sinalização de apoptose está presente no capítulo 4.

Ainda, estudos mostram que existe uma relação entre as vias de apoptose e autofagia. Beclin-1 e a proteína antiapoptótica Bcl-2 parecem interagir: a dissociação entre Beclin-1 e Bcl-2 é essencial para a atividade autofágica (PATTINGRE *et al.*, 2005). Além disso, a clivagem por caspase de Beclin-1 parece inibir a autofagia e promover a apoptose (WIRAWAN *et al.*, 2010). A conexão entre as vias de apoptose e autofagia é chamada de *cross-talk*. Assim, o *cross-talk* entre autofagia e apoptose refere-se aos componentes que regulam ambas as vias de sinalização. No modelo, vamos considerar como componentes do *cross-talk* as proteínas Bcl-2 e Bcl-X_L.

2.4 A VIA DE PI3K/AKT/mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR está frequentemente ativada em diversos tipos de câncer e regula vários mecanismos celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação, metabolismo, sobrevivência e crescimento celular (MORGENSZTERN; MCLEOD, 2005; LO-

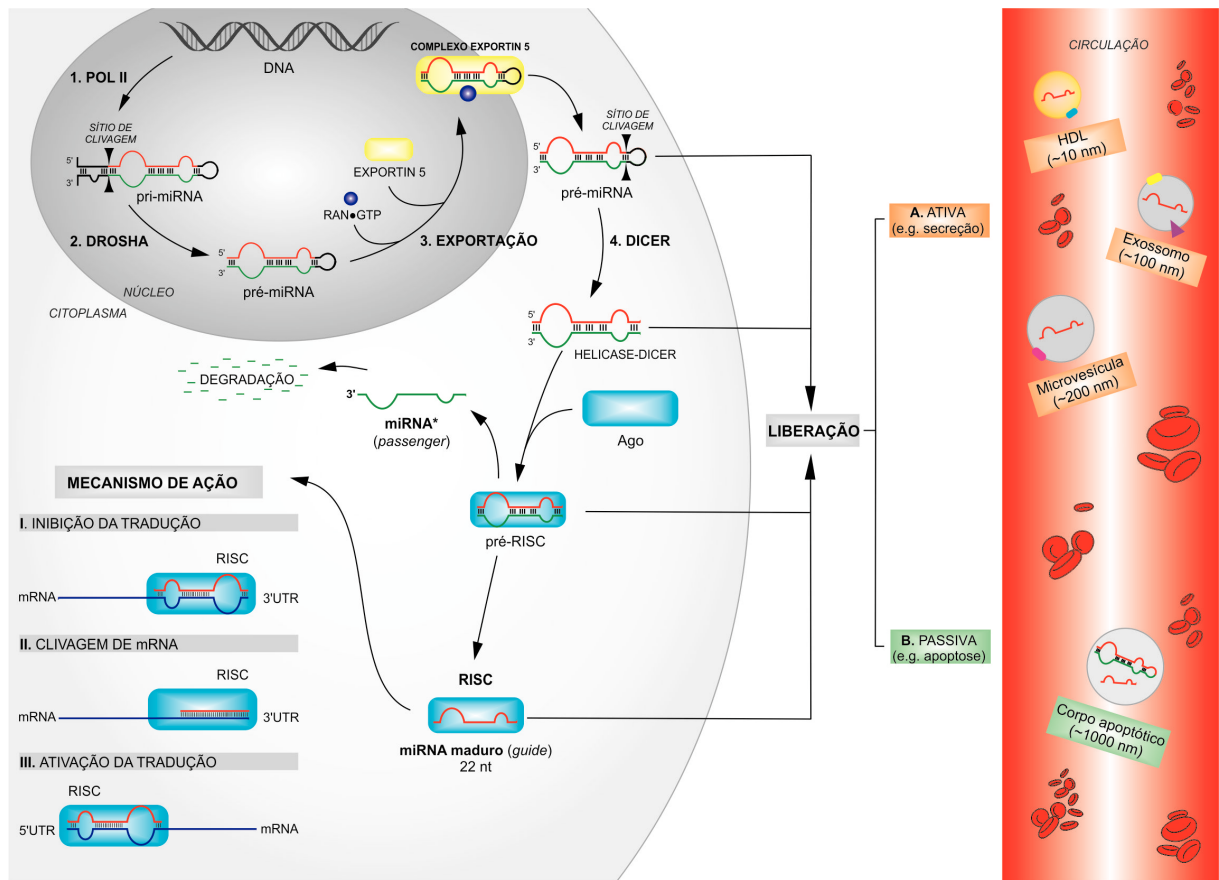
PICCOLO *et al.*, 2008). PI3K é estimulada através da ativação de receptores de tirosina quinase por hormônios ou fatores de crescimento, como por exemplo a ativação do receptor de insulina pelo hormônio insulina ou pelo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 ou 2 (IGF-I e IGF-II), além de outros estímulos. PI3K, agora funcional, é translocada para a membrana plasmática, onde leva à fosforilação e ativação de AKT (POLIVKA JR; JANKU, 2014). Depois de ativada, AKT medeia o crescimento e sobrevivência celular fosforilando várias proteínas citoplasmáticas, assim possibilitando a ativação de mTOR. Logo, mTOR ativado consegue mediar diversos processos catabólicos e anabólicos para manter o metabolismo e crescimento celular (ERSAHIN *et al.*, 2015). Os mecanismos de regulação dessa via de sinalização podem ser vistos mais detalhadamente no capítulo 4.

2.5 MICRORNAS (miRNAs)

Os miRNAs consistem em uma classe de RNA reguladores não codificantes, cuja principal função é ligar-se a mRNAs específicos de genes para degradação ou inibição da tradução, diminuindo ou aumentando a expressão da proteína resultante. miRNAs não codificam proteínas, porém controlam a estabilidade e tradução de mRNAs de genes codificantes de proteínas (GOZUACIK *et al.*, 2017). A figura 1 ilustra a biogênese dos miRNAs. Inicialmente, **(1)** o DNA é transcrito pela RNA polimerase II (Pol II) formando o miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, **(2)** a enzima RNase III Drosha cliva o *hairpin* formando o pré-miRNA, que **(3)** é então transportado para o citoplasma pelo complexo de exportina-5 e Ran-guanosina-5'-trifosfato (Ran • GTP), onde **(4)** é clivado pela enzima RNase III Dicer liberando um RNA *duplex*. O RNA *duplex* é carregado em uma proteína Argonauta (Ago), formando um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O *duplex* é então desenrolado, geralmente causando a degradação da fita passageira (miRNA*) e a formação do miRNA maduro. Uma vez integrado ao RISC, o miRNA maduro pode causar **(I)** a inibição da tradução através do pareamento imperfeito de bases entre o miRNA e a região 3'-não traduzida (UTR) do mRNA, **(II)** clivagem do mRNA através do pareamento perfeito de bases entre o miRNA e a 3'-UTR do mRNA ou **(III)** ativação da tradução por meio da interação do miRNA com a 5'-UTR do mRNA. O miRNA maduro pode atingir a corrente sanguínea por **(A)** liberação ativa (por incorporação em complexos de lipoproteínas e microvesículas ou exossomos) ou **(B)** liberação passiva em corpos apoptóticos (causada pela morte celular). Na forma associada, os miRNAs circulantes são resistentes à atividade de nucleases presente no sangue (AMARAL *et al.*, 2018).

As funções regulatórias dos miRNAs envolvem uma variedade de processos biológicos, incluindo desenvolvimento, diferenciação, apoptose, senescência, regulação do metabolismo e autofagia (SU *et al.*, 2015; STIUSO *et al.*, 2015; KITADATE *et al.*, 2016; GOZUACIK *et al.*, 2017), sendo que mais de 60% de todos os genes humanos possuem possíveis sítios de ligação para miRNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2009). A desregulação da expressão de miRNAs está frequentemente relacionada à diversas doenças que acometem humanos. Vários estudos têm mostrado que os miRNAs realizam um papel promotor no desenvolvimento primário de tumores; miRNAs

Figura 1 – Representação da biogênese dos miRNAs.



Fonte – Amaral *et al.* (2018).

que estão muito expressos em câncer podem agir como oncogenes, enquanto que outros agem como supressores de tumores, baseados nas respectivas deleções físicas ou expressões reduzidas no câncer em humanos. Mudanças nos níveis de expressão de miRNAs foram observadas em quase todos os tipos de cânceres, incluindo o gástrico, de pulmão, pancreático e de mama (CHEN, Sheng *et al.*, 2018; CHATTERJEE *et al.*, 2015; YANG, Y. *et al.*, 2018; GONG *et al.*, 2015).

A aplicação terapêutica dos miRNAs no câncer envolve a utilização de mímicos e anti-miRs. Os anti-miRs são oligonucleotídeos que hibridizam com as sequências complementares do miRNA e interrompem a atividade e/ou processamento do respectivo miRNA, resultando no aumento da expressão do gene supressor de tumor que é alvo desse miRNA. Eles são usados para silenciar os miRNAs oncogênicos. Em contraste, os mímicos dos miRNAs são utilizados para superexpressar um miRNA que é supressor de tumores, levando à diminuição da expressão dos oncogenes que são alvos desse miRNA (KASINSKI; SLACK, Frank J, 2011; SEGAL; SLACK, Frank J., 2020).

Neste trabalho, estamos considerando miRNAs que têm a expressão alterada em células de TNBC quando comparada com células de outros tipos de câncer de mama ou células de

mama saudáveis e aqueles que interagem com as vias de autofagia e apoptose. A descrição completa desses miRNAs e as respectivas interações com os processos autofágicos e apoptóticos está presente no capítulo 4.

3 MODELAGEM MATEMÁTICA DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

A modelagem matemática de redes regulatórias tem por objetivo estudar como componentes moleculares interagem para dar origem a determinados comportamentos. Como cada processo biológico normalmente envolve um grande número de componentes, o tamanho e complexidade de um sistema que regula um processo específico dificultam a compreensão do respectivo comportamento dinâmico. Assim, uma descrição matemática de uma rede regulatória, incluindo as interações inerentes, podem ser usadas para tentar testar e prever o comportamento de um determinado sistema através de simulações computacionais. Nesse trabalho, abordaremos dois tipos de modelagem: a modelagem lógica (ou booleana) e a modelagem contínua por equações diferenciais ordinárias.

A modelagem lógica utiliza variáveis discretas e fornece uma estrutura adequada para integrar dados de processos biológicos em modelos dinâmicos rigorosos através de uma rede regulatória. As redes regulatórias simplificam as relações entre os elementos de uma via, servindo como um modelo genérico para a análise da dinâmica e das principais propriedades que caracterizam a rede regulatória (THOMAS, R.; D'ARI, 1990; NALDI *et al.*, 2009). Nesta abordagem as variáveis são discretas -booleanas ou multivaloradas- e as atualizações são definidas a partir das características de ativação ou inibição de cada elemento da rede. Um estado do sistema é determinado pelas condições iniciais juntamente com as operações lógicas de regulação que determinam o valor de uma variável a partir dos estados de seus reguladores.

Por considerar variáveis discretas, os modelos lógicos não conseguem descrever concentrações contínuas. Assim, a transformação de um modelo booleano em um modelo contínuo permite o uso do modelo para explicar resultados experimentais de uma forma mais abrangente, visto que a análise permite considerar a concentração das variáveis, como também projetar e otimizar outros experimentos (WITTMANN *et al.*, 2009).

Para modelar um processo biológico, primeiro precisamos estudar os componentes que fazem parte desse processo, sejam eles genes, proteínas ou miRNAs. Por isso, começamos esse capítulo descrevendo algumas bases de dados que utilizamos para a construção da rede de interações do modelo.

3.1 FERRAMENTAS DE PESQUISA BIBLIOGRÁFICA DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO

Realizamos pesquisas bibliográficas para a construção da rede de interações utilizando as ferramentas presentes no quadro 2. Primeiramente, buscamos os principais componentes das vias de sinalização de apoptose e autofagia. Em seguida, buscamos miRNAs que interagem com essas vias de sinalização. Com essas informações, procuramos a expressão desses miRNAs em células de câncer de mama triplo negativo, comparando com a expressão em células de mama saudáveis. Essa pesquisa resultou na descrição das vias de sinalização presente no próximo capítulo e no grupo de miRNAs apresentados no quadro 4, que estão subexpressos ou superexpressos em células MDA-MB-231, que é uma linhagem de câncer de mama triplo negativo. O quadro 2

apresenta as bases de dados que utilizamos para construção da rede de interações do modelo.

Quadro 2 – Bases de dados utilizadas para a construção da rede regulatória.

Base de dado	Referência	Disponível em
KEGG PATHWAY	(KANEHISA; GOTO, 2000)	KEGG PATHWAY
STRING	(SZKLARCZYK <i>et al.</i> , 2019)	STRING
SIGNOR 2.0	(LICATA <i>et al.</i> , 2020)	SIGNOR
GeneCards	(STELZER <i>et al.</i> , 2016)	GeneCards
PANTHER	(MI <i>et al.</i> , 2020)	PANTHER
TargetScan	(AGARWAL <i>et al.</i> , 2015)	TargetScan
mirPath v.3	(VLACHOS <i>et al.</i> , 2015)	mirPath
TarBase v.8	(KARAGKOUNI <i>et al.</i> , 2018)	TarBase
Ingenuity Target Explorer	(QIAGEN, s.d.)	Target Explorer

Fonte – A autora.

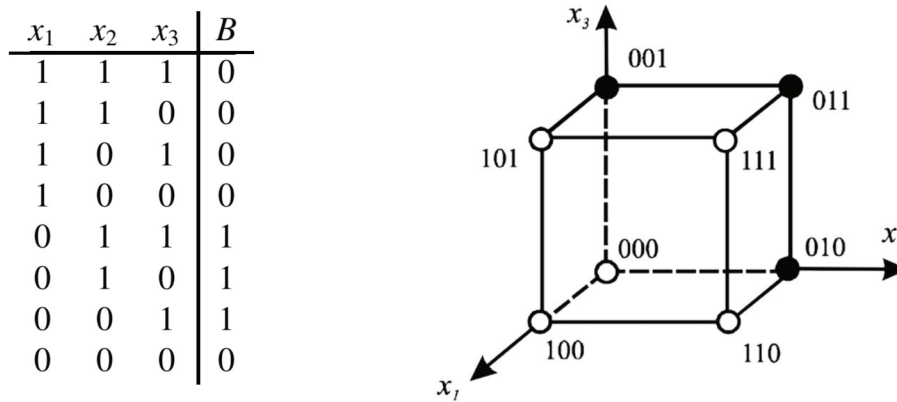
A descrição completa da rede regulatória está presente no capítulo 4.

3.2 FORMALISMO LÓGICO

Nesta seção estão descritos os principais conceitos do formalismo lógico como foi definido por Abou-Jaoudé e colaboradores em Abou-Jaoudé *et al.* (2016).

Assim, um modelo lógico de uma rede regulatória (G, B) é definido por um conjunto de N componentes, representados por variáveis discretas, $G = (x_1, x_2, \dots, x_N)$, em que cada variável x_i toma seu valor em $(0, \dots, M_i)$, que representa o intervalo de níveis funcionais de cada componente. Para o caso booleano, $x_i \in \{0, 1\}$. Os componentes podem representar concentrações de moléculas ou estados biológicos, processos biológicos, ou fenótipos. Os componentes de entrada, chamados de *inputs*, não são regulados e representam condições externas constantes do ambiente. O espaço de estados S de um modelo lógico é finito e tem tamanho 2^N , em que um estado é definido como um vetor $x = [x_1, x_2, \dots, x_N]$. Uma função lógica B_i define os valores de cada x_i em termos de arestas ativadoras ou inibidoras que conectam um x_i às outras variáveis da rede, o que caracteriza um grafo direcionado. A função de atualização B é definida como $B(x) = (B_1(x), \dots, B_N(x))$. Uma representação simples de uma função booleana B é uma tabela verdade que define o valor da função para cada uma das variáveis. Ainda, outra representação é a visualização da função booleana como um cubo unitário de dimensão N (STEINBACH; KOHUT, 2002). Um exemplo das duas representações pode ser visto na figura 2, em cuja função estamos considerando uma rede com três variáveis x_1, x_2 e x_3 e B é uma função booleana definida como $B = !x_1 \& (x_2 \mid x_3)$.

Figura 2 – Representações da função booleana $B = !x_1 \& (x_2 | x_3)$. Os operadores lógicos utilizados são AND ('&'), NOT ('!') e OR ('|'). No cubo unitário, os vértices preenchidos em preto representam $B = 1$, e os vértices em branco, $B = 0$.



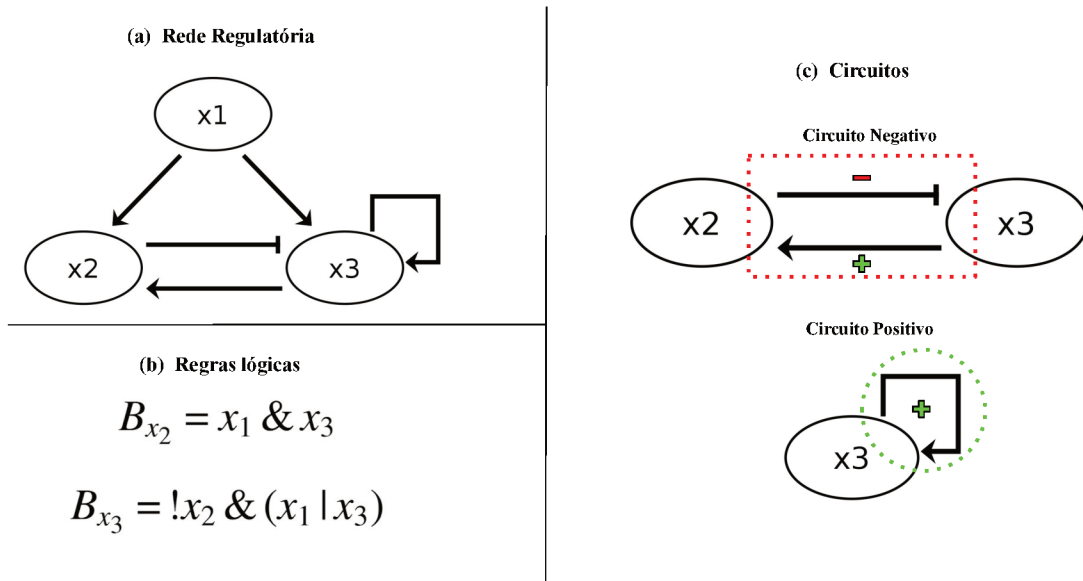
Fonte – Adaptado de Steinbach e Kohut (2002).

O gráfico regulatório (ou de interações), (G,R) , engloba os vértices que denotam os componentes do modelo (componentes reguladores, elementos de G), juntamente com bordas sinalizadas e direcionadas, denotando ativações ou inibições regulatórias (elementos de R) (ABOU-JAOUDE *et al.*, 2016). Um circuito C em um grafo de interação (G,R) é uma sequência e_1, \dots, e_k de arestas tal que o ponto final de $e_i, i = 1, \dots, k-1$ é a origem de e_{i+1} , cada vértice de (G,R) ocorrendo no máximo uma vez em C (SOULÉ, 2006). Em outras palavras, um circuito é um caminho fechado e orientado de interações. Assim, um circuito pode ser positivo ou negativo, em que o sinal é dado pela multiplicação dos sinais de cada interação que o compõem. Um exemplo de circuitos de uma rede regulatória pode ser visto na figura 3. Ainda, a análise de funcionalidade de circuitos regulatórios permite identificar os circuitos que desempenham um papel no surgimento de propriedades dinâmicas; circuitos negativos abrangem um número ímpar de inibições e são requeridos para oscilações (determinadas por um atrator cíclico na dinâmica), enquanto que circuitos positivos abrangem um número par de inibições e são requeridos para multiestacionaridade (ABOU-JAOUDE *et al.*, 2016). Assim, um circuito é considerado funcional se gerar a propriedade dinâmica esperada.

Os gráficos de transição de estados, chamados de STG (*State Transition Graph*), são usados para descrever os comportamentos assintóticos na dinâmica de modelos lógicos. Esses comportamentos são chamados de atratores. Portanto, podemos dizer que o STG representa o comportamento dinâmico da rede, no qual os vértices representam estados do sistema e os arcos representam as transições entre os estados (NALDI *et al.*, 2009). Os nós terminais que não têm um estado sucessor no STG correspondem a um estado estável, ou em contraste, a trajetória no STG pode ter um atrator cíclico. Um estado é chamado de ‘estado estável’ quando o sistema tende a mover na direção desse estado, ou seja, se $B(x) = x$, então x é um estado estável e cada valor das componentes desse estado são mantidas constantes. Assim, não acontecem mais atualizações no vetor de estado do gráfico. Além disso, o sistema também pode oscilar

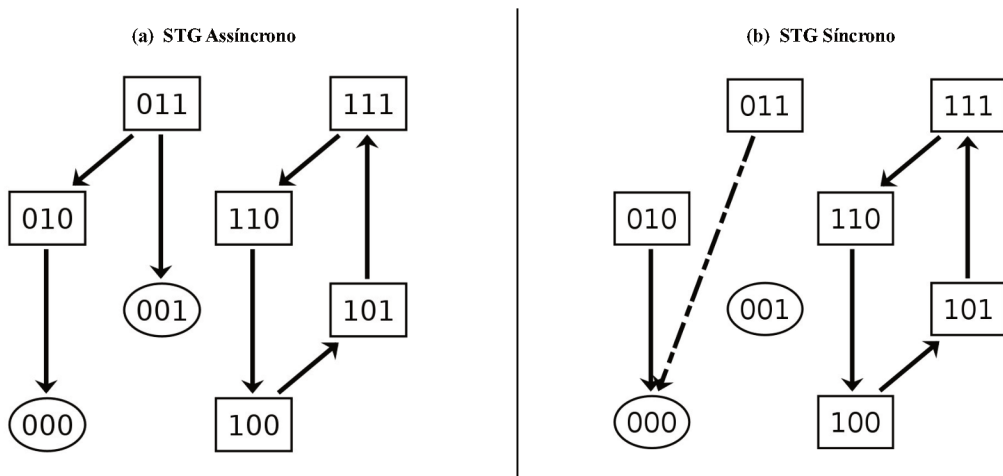
permanentemente ao redor de um estado, o que é definido como um ciclo estável. Em ambos os casos, o estado final ou o caminho é chamado de atrator (THOMAS, R.; D'ARI, 1990). Estados estáveis geralmente representam estados de diferenciação celular ou processos e situações perdurantes, enquanto que atratores cíclicos podem denotar comportamentos biológicos periódicos, como o ciclo celular (ABOU-JAOUDE *et al.*, 2016).

Figura 3 – Exemplo de um modelo lógico. (a) Rede regulatória com três variáveis x_1 , x_2 e x_3 , em que x_1 é o *input* da rede. (b) Regras Lógicas de x_2 e x_3 . (c) Circuitos do modelo.



Fonte – A autora.

Figura 4 – Gráficos de Transição de Estados do modelo lógico da figura 3. (a) STG assíncrono. (b) STG síncrono. Estados de transição são representados por quadrados, e estados estáveis são representados por elipses.



Fonte – A autora.

Os tipos de atualização mais comuns de um modelo lógico são os métodos síncronos e assíncronos. Partindo de um estado inicial, o método síncrono atualiza todos os valores das variáveis em cada transição de estados, enquanto que no assíncrono, cada variável é atualizada independentemente - a diferença entre estados será apenas a atualização de uma variável. As atualizações de cada variável são sempre unitárias - mesmo em um modelo com variáveis multivaloradas - e cada transição entre um estado inicial e um estado sucessor é determinada pelos valores das variáveis nesse estado inicial e as regras lógicas (funções booleanas) de cada variável, o que pode ser visto na figura 4. Como exemplo, a atualização assíncrona mais geral pode ser definida da seguinte forma para todo $i \neq j$:

$$x_i(t+1) = x_i(t) + \text{sign}(B_i(x(t)) - x_i(t)), x_j(t+1) = x_j(t). \quad (1)$$

Além disso, o método lógico permite a simulação de perturbações, conhecidas experimentalmente como perda de função (LoF) ou nocaute e ganho de função (GoF) ou atividade ectópica. Essas perturbações consistem em fixar uma variável no valor mais baixo ou mais alto, respectivamente. Assim, o sistema pode ser simulado levando em conta várias perturbações e apresentar diferentes *outputs* quando comparado com o caso sem perturbações. Quando o modelo é simulado sem perturbações, o resultado é chamado de ‘caso do tipo selvagem’.

3.3 MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UM MODELO BOLEANO PARA MODELO CONTÍNUO

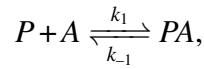
O método de transformação de um modelo booleano para um modelo contínuo, o qual está descrito brevemente nesta seção, foi apresentado por Wittmann e colaboradores (2009) e pode ser visto com mais detalhe em (WITTMANN *et al.*, 2009). O método consiste na utilização de interpolação polinomial multivariada para a transformação de operadores lógicos em um sistema de equação diferenciais ordinárias (EDO). Nesse processo, as variáveis discretas de um modelo booleano são substituídas por variáveis contínuas, as funções booleanas são substituídas por funções homólogas contínuas, e são utilizadas funções de Hill para descrever as interações moleculares entre os componentes de uma rede. Portanto, na próxima subseção apresentamos um resumo das funções de Hill, e as subseções seguintes apresentam o método de transformação.

3.3.1 Funções de Hill

As funções de Hill foram propostas por A. V. Hill em 1910 para descrever o ligamento do oxigênio à hemoglobina (HILL, 1910). Posteriormente, foram amplamente utilizadas nas áreas de farmacologia e bioquímica, além de modelos de expressão gênica para descrever o comportamento de interações moleculares (SANTILLÁN, 2008).

Para derivar as funções de Hill, vamos seguir a descrição que foi apresentada no capítulo 3.3 de *Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction* (INGALLS, 2013). Assim,

consideramos a ligação de uma molécula A à uma proteína P . Nesse caso, o nome dado à molécula que se liga é **ligante**. Assim, a reação química que descreve esse processo é a seguinte:



em que a taxa da reação $P + A \rightarrow PA$ é $k_1[P][A]$, e a taxa da reação $PA \rightarrow P + A$ é $k_{-1}[PA]$. Aqui, $[\cdot]$ representa as concentrações dos reagentes e k_1 e k_{-1} são constantes de proporcionalidade. No estado de equilíbrio das reações, temos que a taxa de variação das concentrações dos reagentes deve ser zero. Assim,

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}[P] &= -k_1[P][A] + k_{-1}[PA] = 0 \\ \frac{d}{dt}[A] &= -k_1[P][A] + k_{-1}[PA] = 0 \\ \frac{d}{dt}[PA] &= k_1[P][A] - k_{-1}[PA] = 0.\end{aligned}$$

Das equações acima, temos que, no estado estacionário,

$$\begin{aligned}k_{-1}[PA] &= k_1[P][A] \\ [PA] &= \frac{k_1}{k_{-1}}[P][A].\end{aligned}$$

Fazendo $K_D = k_{-1}/k_1$, em que K_D é a constante de dissociação do evento de ligação, temos

$$[PA] = \frac{[P][A]}{K_D}. \quad (2)$$

Agora, definimos que a saturação fracional do conjunto de proteínas, representada por Y , é a fração do número de sítios de ligação ocupados pelo número total de sítios de ligação:

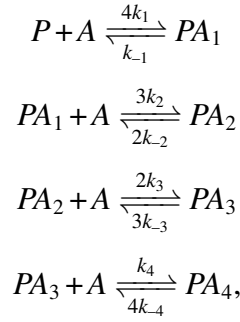
$$Y = \frac{[PA]}{[P] + [PA]}.$$

Substituindo $[PA]$ da equação 2, temos

$$Y = \frac{[P][A]/K_D}{[P] + [P][A]/K_D} = \frac{[A]}{K_D + [A]} \quad (3)$$

A curva de ligação da equação 3 é hiperbólica e representa o comportamento da ligação do oxigênio com a proteína mioglobina, que possui apenas um sítio de ligação.

A seguir, vamos considerar a ligação do oxigênio com a hemoglobina, que possui 4 sítios de ligação. Nesse caso, os sítios de ligação são idênticos, porém, ocorrem efeitos de cooperatividade entre eles. A cooperatividade está relacionada a eventos de ligação que influenciam uns aos outros. Assim, uma ligação é considerada cooperativa se a primeira ligação de um ligante A à P muda a afinidade de ligação de um segundo ligante A ao receptor, fazendo com que este seja menos ou mais provável de ligar-se (INGALLS, 2013). Para o caso da ligação do oxigênio com a hemoglobina, as reações são as seguintes:



em que cada complexo PA_i possui i ligantes ligados. Para a primeira reação de associação, há 4 sítios de ligação disponíveis em P para o primeiro ligante, então a taxa da reação é $4k_1$. Para a segunda reação, há 3 sítios de ligação disponíveis para o segundo ligante, então a taxa da reação de associação é $3k_2$, e assim sucessivamente. No equilíbrio, as concentrações dos complexos serão:

$$\begin{aligned}
[PA_1] &= \frac{4[P][A]}{K_{D1}} \\
[PA_2] &= \frac{6[P][A]^2}{K_{D1}K_{D2}} \\
[PA_3] &= \frac{4[P][A]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}} \\
[PA_4] &= \frac{[P][A]^4}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}K_{D4}},
\end{aligned}$$

em que os parâmetros $K_{Di} = k_{-i}/k_i$ são as constantes de dissociação. Usando essas concentrações, podemos escrever a saturação fracional:

$$Y = \frac{[PA_1] + 2[PA_2] + 3[PA_3] + 4[PA_4]}{4([P] + [PA_1] + [PA_2] + [PA_3] + [PA_4])} \quad (4)$$

Substituindo $[PA_i]$ na equação 4, temos

$$Y = \frac{[A]/K_{D1} + 3[A]^2/(K_{D1}K_{D2}) + 3[A]^3/(K_{D1}K_{D2}K_{D3}) + [A]^4/(K_{D1}K_{D2}K_{D3}K_{D4})}{1 + 4[A]/K_{D1} + 6[A]^2/(K_{D1}K_{D2}) + 4[A]^3/(K_{D1}K_{D2}K_{D3}) + [A]^4/(K_{D1}K_{D2}K_{D3}K_{D4})} \quad (5)$$

Se a ligação final tem uma afinidade muito maior que as primeiras ligações, $K_{D4} \ll K_{D1}, K_{D2}, K_{D3}$, então podemos aproximar a saturação fracional:

$$Y \approx \frac{[A]^4/(K_{D1}K_{D2}K_{D3}K_{D4})}{1 + [A]^4/(K_{D1}K_{D2}K_{D3}K_{D4})} \quad (6)$$

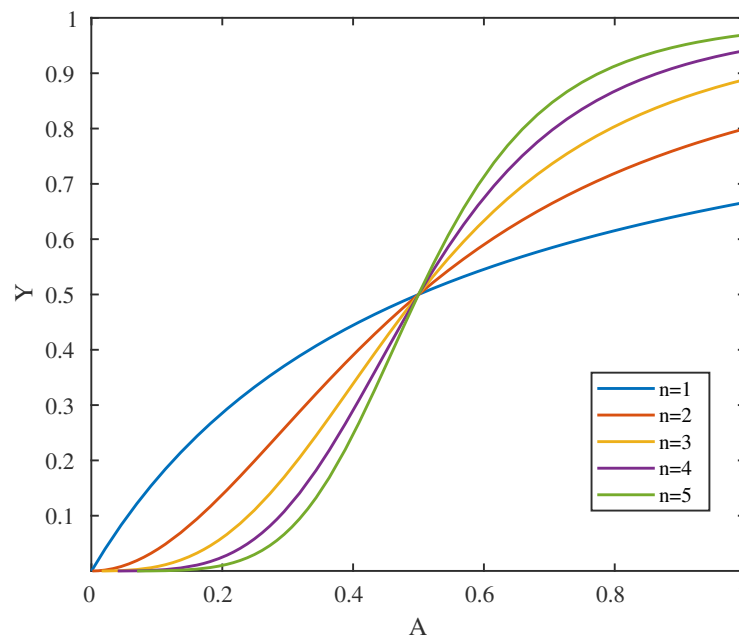
A formalização da aproximação 6 é a chamada função de Hill:

$$Y = \frac{([A]/K_D)^n}{1 + ([A]/K_D)^n} = \frac{[A]^n}{K_D^n + [A]^n}, \quad (7)$$

em que K_D é interpretada como a constante de dissociação média. O coeficiente n , chamado de coeficiente de Hill, originalmente representa o número de sítios de ligação. No entanto, as condições para que n forneça uma estimativa precisa do número de sítios de ligação é bem

específica e acontecem somente quando um efeito extremo de cooperatividade positiva está presente entre as ligações da primeira e subseqüentes moléculas ligantes (SANTILLÁN, 2008). Assim, uma descrição mais apropriada de n é que, além de representar a inclinação da função sigmóide, ele é usado como uma medida do caráter do comportamento *switch* de um processo. O comportamento das funções de Hill para diferentes valores de n pode ser visto na figura 5. Para o caso em que $n = 1$, a função de Hill reduz-se a uma função hiperbólica, o que é o caso da equação 3.

Figura 5 – Funções de Hill com coeficientes $n = 1, 2, 3, 4, 5$ e $K_D = 0.5$.



Fonte – A autora.

3.3.2 Transformação do modelo booleano para o modelo contínuo

Para fazer a transformação de um modelo booleano para um modelo contínuo, primeiramente devemos substituir as variáveis discretas x_i do modelo booleano por variáveis contínuas \bar{x}_i tomando valores no intervalo $[0, 1]$ - normalização das concentrações para o intervalo unitário. Assim, teremos estendido as funções booleanas B_i para funções $\bar{B}_i : [0, 1]^N \rightarrow [0, 1]$. As funções \bar{B}_i são chamadas de **homólogas contínuas** das funções booleanas B_i . A seguir, para construir a estrutura do modelo contínuo e imitar mais precisamente a realidade biológica, vamos considerar também a taxa de produção e degradação de uma dada espécie (miRNAs, proteínas, etc.). Assim, assumimos que a produção de uma espécie X_i é dada pela função \bar{B}_i , e sua degradação é proporcional à \bar{x}_i . Logo, a evolução de \bar{x}_i sobre o tempo é governada pela equação diferencial

ordinária (EDO):

$$\dot{\bar{x}}_i = \frac{1}{\tau_i} (\bar{B}_i(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) - \bar{x}_i), \quad (8)$$

em que τ_i é o tempo de vida da espécie X_i . Há apenas um parâmetro para produção e degradação por causa da normalização das concentrações para o intervalo unitário. Agora, o principal fator é como que as funções \bar{B}_i são obtidas de uma função booleana B_i de uma maneira eficiente. Wittmann e colaboradores (2009) propuseram três transformações baseadas em interpolação polinomial multivariada para a obtenção de \bar{B}_i , em que \bar{B}_i é definido como polinomial nas variáveis $\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}$ e concorda com B_i . As três transformações são chamadas de *BooleCube*, *HillCube* e *HillCube* normalizada.

As funções do tipo *BooleCube* são definidas como

$$\bar{B}_i^l(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) \quad (9)$$

através da interpolação linear das funções B_i pelo uso da técnica de interpolação polinomial multivariada (WITTMANN *et al.*, 2009). Assim, podemos substituir B_i por \bar{B}_i^l na equação 8 e obter a evolução temporal de \bar{x}_i . Além disso, as funções \bar{B}_i^l são multilineares, ou seja, apresentam a forma $\bar{B}_i^l(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) = a + b\bar{x}_{ij}$, em que a e b são constantes reais. Entretanto, as interações moleculares, que ocorrem entre as macromoléculas, apresentam um comportamento do tipo *switch*, por isso os autores implementaram o uso das funções de Hill para modelar esse tipo de interação que não apresenta comportamento linear. Portanto, as funções do tipo *HillCube* são definidas como

$$\bar{B}_i^H(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) := \bar{B}_i^l(f_{i1}(\bar{x}_{i1}), f_{i2}(\bar{x}_{i2}), \dots, f_{iN_i}(\bar{x}_{iN_i})), \quad (10)$$

em que f_{ij} é uma função de Hill com parâmetros n_{ij} e k_{ij} para cada interação. As funções \bar{B}_i^H podem substituir \bar{B}_i na equação 8 para formar um novo sistema de EDOs.

Uma característica das funções de Hill é que elas nunca assumem o valor 1. Assim, as funções do tipo *HillCube* não são homólogas perfeitas das funções booleanas B_i . Para tal, podemos normalizar as funções de Hill para o intervalo unitário. Assim, conseguimos o homólogo contínuo perfeito das funções booleanas B_i :

$$\bar{B}_i^{Hn}(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) := \bar{B}_i^l \left(\frac{f_{i1}(\bar{x}_{i1})}{f_{i1}(1)}, \frac{f_{i2}(\bar{x}_{i2})}{f_{i2}(1)}, \dots, \frac{f_{iN_i}(\bar{x}_{iN_i})}{f_{iN_i}(1)} \right) \quad (11)$$

As funções do tipo \bar{B}_i^{Hn} são chamadas de *HillCubes* normalizadas. Assim, podemos substituir a equação 11 em 8 para formar um novo sistema de EDOs.

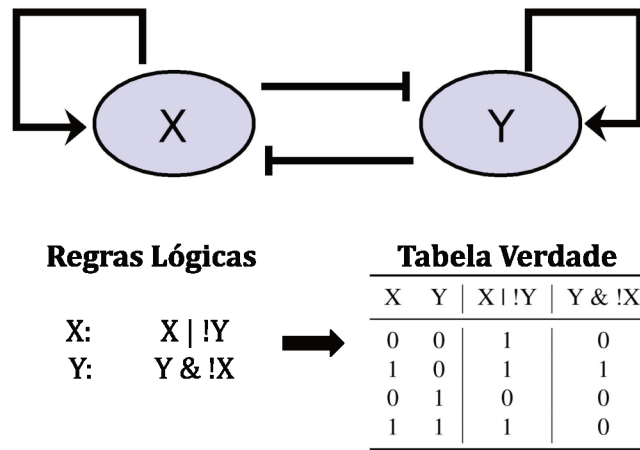
Sobre a similaridade do comportamento dos modelos booleano e contínuo, os autores mostraram que sempre que as funções \bar{B}_i na equação 8 forem homólogas perfeitas das funções booleanas B_i , um estado estável do modelo booleano também será um estado estável do modelo contínuo. Esse resultado vale para um modelo com funções do tipo *BooleCube* e *HillCube* normalizada, mas não para funções do tipo *HillCube* não normalizada - visto que as

funções de Hill nunca atingem o valor 1. Sendo assim, escolhemos fazer a transformação do modelo utilizando funções do tipo *HillCube* normalizada. A seguir, apresentamos um exemplo da transformação de um modelo booleano genérico de forma a ilustrar e esclarecer o processo e a obtenção das funções contínuas.

3.3.3 Exemplo de transformação de um modelo booleano genérico

Consideramos a rede regulatória da figura 6. Nesse caso, a variável *X* ativa-se e inibe a variável *Y*. Similarmente, *Y* ativa-se e inibe *X*.

Figura 6 – Rede regulatória genérica. Os operadores lógicos utilizados são *AND*('&'), *OR*('|') e *NOT*('!').



Fonte – A autora.

A transformação desse modelo booleano para um modelo contínuo resulta num sistema de EDOs. Usando a transformação do tipo *BooleCube*, temos o seguinte sistema para as variáveis *X* e *Y*:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{\tau_1} \left\{ \left((1-[X])(1-[Y]) \right) + \left([X](1-[Y]) \right) + \left([X][Y] \right) - [X] \right\} \quad (12)$$

$$\frac{dY}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \left\{ \left([Y](1-[X]) \right) - [Y] \right\} \quad (13)$$

Podemos observar na tabela verdade da figura 6 que a utilização do operador lógico *OR* na regra lógica da variável *X* resulta em três condições para que *X* tenha o valor 1 (ativado). Já a regra lógica da variável *Y*, que utiliza o operador *AND*, permite apenas uma condição para que *Y* seja ativado. Assim, a equação 12 possui três termos que representam as três condições para que *X* seja ativado: o termo $(1-[X])(1-[Y])$ representa o caso da tabela verdade em que $X = 0$ e

$Y = 0$; $[X](1 - [Y])$ representa a condição $X = 1$ e $Y = 0$; $[X][Y]$ representa $X = 1$ e $Y = 1$. Note que os termos da forma $1 - [\text{concentração}]$ e $[\text{concentração}]$ representam as interações de inibição e ativação, respectivamente. Ainda, comparando as eqs. 12 e 13 com a equação 8, temos que as funções \bar{B}_i^I nesse caso são:

$$\bar{B}_X^I = \left((1 - [X])(1 - [Y]) \right) + \left([X](1 - [Y]) \right) + \left([X][Y] \right)$$

$$\bar{B}_Y^I = \left([Y](1 - [X]) \right)$$

Se usarmos a transformação do tipo **HillCube**, teremos uma estrutura similar ao caso anterior, porém em vez de \bar{B}_i ser em função de X e Y , temos \bar{B}_i em função de $f_{X_i}(X_i)$ e $f_{Y_i}(Y_i)$, em que $f_{iN_i}(x_{iN_i})$ são as funções de Hill. Assim, o sistema de EDOs nesse caso será:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{\tau_1} \left\{ \left[\left(1 - \frac{[X]^{n_2}}{([X]^{n_2} + k_3^{n_2})} \right) \cdot \left(1 - \frac{[Y]^{n_4}}{([Y]^{n_4} + k_5^{n_4})} \right) \right] + \left[\left(\frac{[X]^{n_2}}{([X]^{n_2} + k_3^{n_2})} \right) \cdot \left(1 - \frac{[Y]^{n_4}}{([Y]^{n_4} + k_5^{n_4})} \right) \right] + \left[\left(\frac{[X]^{n_2}}{([X]^{n_2} + k_3^{n_2})} \right) \cdot \left(\frac{[Y]^{n_4}}{([Y]^{n_4} + k_5^{n_4})} \right) \right] - [X] \right\} \quad (14)$$

$$\frac{dY}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \left\{ \left(\frac{[Y]^{n_7}}{([Y]^{n_7} + k_8^{n_7})} \right) \cdot \left(1 - \frac{[X]^{n_9}}{([X]^{n_9} + k_{10}^{n_9})} \right) - [Y] \right\}, \quad (15)$$

em que τ_1 e τ_2 são os tempos de vida de X e Y , respectivamente. O quadro 3 apresenta os coeficientes de Hill e parâmetros k de cada uma das quatro interações.

Quadro 3 – Parâmetros de cada interação.

Parâmetros	Interação
n_2 e k_3	X em X
n_4 e k_5	Y em X
n_7 e k_8	Y em Y
n_9 e k_{10}	X em Y

Fonte – A autora.

Usando a transformação do tipo **HillCube Normalizada**, temos as funções na mesma estrutura do caso **HillCube** mais um termo de normalização. Logo, nosso sistema de EDOs é dado por:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{\tau_1} \left\{ \left[\left(1 - \frac{[X]^{n_2}}{([X]^{n_2} + k_3^{n_2})} \cdot (1 + k_3^{n_2}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[Y]^{n_4}}{([Y]^{n_4} + k_5^{n_4})} \cdot (1 + k_5^{n_4}) \right) \right] \right. \\ + \left[\left(\frac{[X]^{n_2}}{([X]^{n_2} + k_3^{n_2})} \cdot (1 + k_3^{n_2}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[Y]^{n_4}}{([Y]^{n_4} + k_5^{n_4})} \cdot (1 + k_5^{n_4}) \right) \right] \\ \left. + \left[\left(\frac{[X]^{n_2}}{([X]^{n_2} + k_3^{n_2})} \cdot (1 + k_3^{n_2}) \right) \cdot \left(\frac{[Y]^{n_4}}{([Y]^{n_4} + k_5^{n_4})} \cdot (1 + k_5^{n_4}) \right) \right] - [X] \right\} \quad (16) \end{aligned}$$

$$\frac{dY}{dt} = \frac{1}{\tau_2} \left\{ \left(\frac{[Y]^{n_7}}{([Y]^{n_7} + k_8^{n_7})} \cdot (1 + k_8^{n_7}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[X]^{n_9}}{([X]^{n_9} + k_{10}^{n_9})} \cdot (1 + k_{10}^{n_9}) \right) - [Y] \right\}, \quad (17)$$

no qual os parâmetros são os mesmos do caso anterior.

Com o sistema de EDOs pronto após a transformação, é possível simular o modelo e obter seu comportamento dinâmico. Por questões de compatibilidade, escolhemos a transformação do tipo *HillCube Normalizada* para o modelo deste trabalho. A transformação pode ser vista no capítulo 6.

4 DESCRIÇÃO DA REDE REGULATÓRIA

Neste capítulo estão descritos os componentes e interações que consideramos para a construção da rede regulatória do modelo. Como o câncer de mama triplo negativo é marcado pela ausência da expressão dos receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), além da ausência da superexpressão de HER2, não colocamos esses receptores na rede e também não consideramos a ativação da via de PI3K/AKT/mTOR por HER2.

Nas próximas seções, organizamos a descrição da rede na seguinte ordem: a via de sinalização de autofagia; a via de sinalização de apoptose; elementos do *cross-talk* e os miRNAs. Ainda, há a descrição de alguns elementos da via de PI3K/AKT/mTOR que interagem com a via de autofagia.

4.1 A VIA DE SINALIZAÇÃO DE AUTOFAGIA E A VIA DE PI3K/AKT/mTOR

Com a privação de nutrientes ou fatores de crescimento, a ativação da proteína AMPK e/ou inibição do complexo mTORC1 levam à ativação e formação do complexo ULK (CICCHINI *et al.*, 2015). ULK é um complexo de proteínas formado por ULK1, ULK2, ATG101 e FIP200 (KANEHISA; GOTO, 2000), e sua formação induz o processamento de material para a formação dos autofagossomas (AMELIO *et al.*, 2011). Já mTORC1, que também é um complexo de proteínas, tem atividades antiautofágicas e é formado por mTOR, mLST8, Raptor, PRAS40 e Deptor.

A proteína AMPK ativa ULK1 diretamente através de fosforilação. Entretanto, ULK1 também fosforila AMPK, regulando-a negativamente (LÖFFLER *et al.*, 2011). Assim, essa interação entre AMPK e o complexo ULK forma um circuito negativo, como mostra a figura 7.

Figura 7 – Circuito negativo entre AMPK e ULK. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.

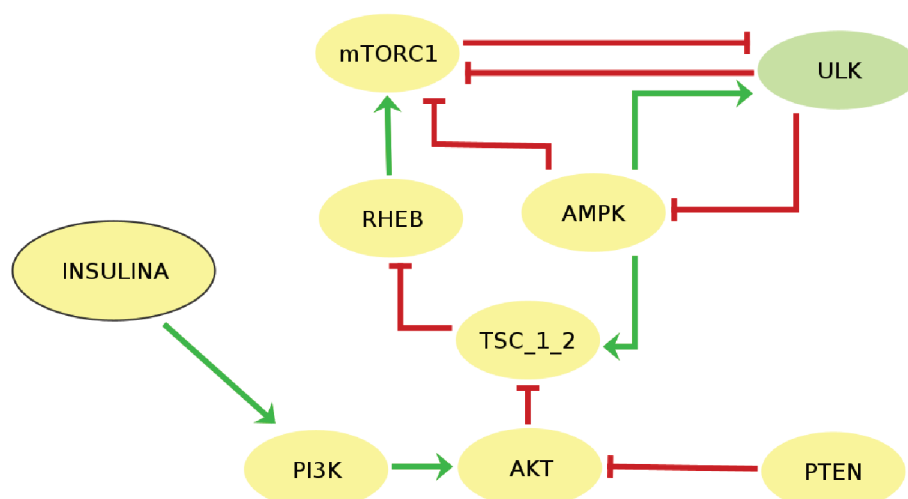


Fonte – A autora.

A alta atividade de mTOR impede a ativação de ULK1, fosforilando-a e interrompendo sua interação com AMPK (KIM *et al.*, 2011). Porém, ULK1 regula negativamente a atividade de mTORC1, formando um circuito positivo entre os dois (DUNLOP *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2011). Além disso, AMPK inibe mTORC1 de duas maneiras: através da ativação por fosforilação das proteínas TSC1 e TSC2, que formam um complexo para inibir a atividade da proteína Rheb (JUNG *et al.*, 2010), a qual liga-se a mTOR e a ativa (LONG *et al.*, 2005); através

da fosforilação direta de Raptor e, conseqüentemente, a inibição de mTORC1 (GWINN *et al.*, 2008). mTORC1 faz parte da via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR, na qual a estimulação dos receptores tirosina quinase - e.g. Insulina - levam à ativação de PI3K. Quando ativado, PI3K é responsável pela fosforilação e ativação de AKT através da proteína PDK1 (KANEHISA; GOTO, 2000). Assim, AKT fosforila TSC2 diretamente e inibe as funções do complexo TSC1/TSC2 (PRESNEAU *et al.*, 2009), o que possibilita a ativação de mTORC1 por Rheb. Entretanto, a atividade de AKT pode ser inibida por PTEN (PAEZ; SELLERS, 2004), impedindo Rheb de ativar mTORC1. Na figura 8 é mostrada a regulação de mTORC1 pela via de PI3K/AKT, AMPK e ULK.

Figura 8 – Inibição de mTORC1 por AMPK e o circuito positivo entre mTORC1 e ULK; ativação da via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR por INSULINA. TSC1 E TSC2 estão representados por TSC_1_2. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.



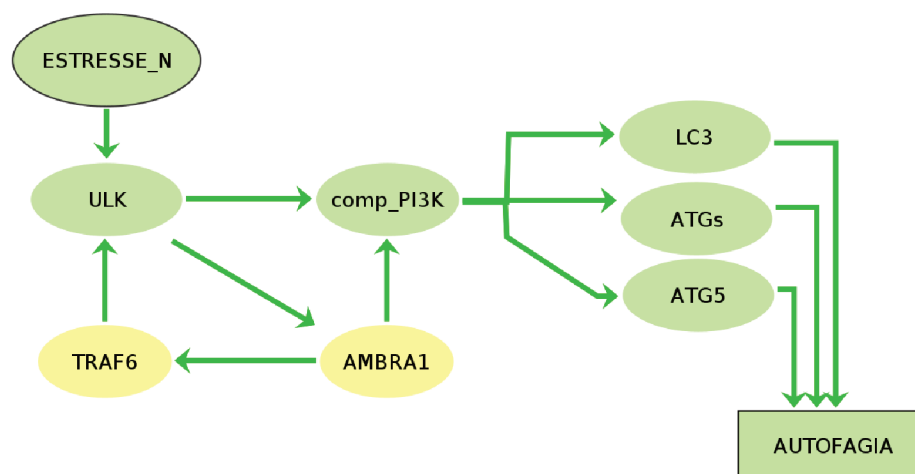
Fonte – A autora.

Seguindo com as funções de ULK1, outro Circuito positivo é formado pela interação entre ULK1 e AMBRA1. ULK1 ativa AMBRA1 através de fosforilação, enquanto que AMBRA1 promove a ativação de ULK1 por ubiquitinação através da proteína TRAF6 (RUSSELL *et al.*, 2014). A seguir, ULK1 fosforila Beclin-1, levando à ativação da proteína VPS34 e a formação do fagóforo. Além de Beclin-1, a funcionalidade de VPS34 depende das proteínas VPS15, Barkor e NRBF2, formando assim o complexo PI3K (KANEHISA; GOTO, 2000; CICCHINI *et al.*, 2015). Ainda, AMBRA1 regula positivamente a atividade de Beclin-1 através de uma ligação entre as proteínas (KANEHISA; GOTO, 2000; MARIA FIMIA *et al.*, 2007), conforme apresentado na figura 9.

O alongamento da membrana do fagóforo e a conclusão do autofagossoma requerem duas vias de conjugação do tipo ubiquitina que são constituídas por várias proteínas ATGs

(KAUR; DEBNATH, 2015). Esses complexos de ATGs catalisam a formação de LC3 conjugado com fosfatidiletanolamina e direcionam sua incorporação na membrana do fagóforo, onde é necessária para a expansão de membranas autofágicas. Logo, o fechamento de um fagóforo alongado marca a formação de um autofagossoma maduro, que funde-se com um lisossoma, levando à degradação de cargas, reciclagem de nutrientes (CICCHINI *et al.*, 2015) e à conclusão do processo autofágico.

Figura 9 – Circuito positivo entre ULK e AMBRA1 e a ativação da via autofágica. Estresse nutricional está representado por ESTRESSE_N, comp_PI3K representa o complexo PI3K e ATGs representa um complexo de proteínas do tipo ATG. As linhas verdes representam ativação.



Fonte – A autora.

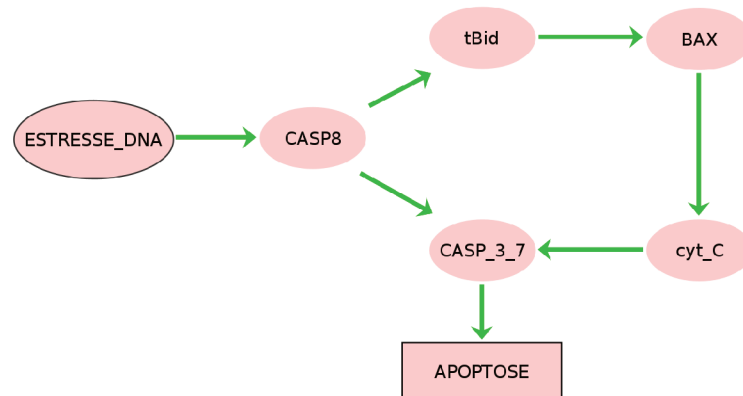
4.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO DE APOPTOSE

Existem diferentes vias de sinalização que regulam o processo apoptótico. Neste trabalho, estamos considerando as duas vias básicas de apoptose: a via intrínseca e extrínseca. Reguladas pelas caspases, essas vias são conectadas através de relações regulatórias que uma exerce na outra.

A via extrínseca de apoptose é ativada através da ligação de um ligante a um receptor de morte e, posteriormente, a uma proteína adaptadora. Essas ligações são responsáveis por transmitir sinais da superfície celular para a via de sinalização intracelular (ELMORE, 2007), levando à ativação da caspase-8. Assim, a caspase-8 pode iniciar o processo apoptótico de duas maneiras: através da clivagem e ativação direta das caspases 3 e 7, ou da ativação da via intrínseca através da clivagem da proteína Bid (MCILWAIN *et al.*, 2013). Assim, a caspase-8 cliva a proteína Bid, resultando na forma truncada de Bid (tBid) (LI, Honglin *et al.*, 1998). tBid, agora na mitocôndria, induz a ativação da proteína pró-apoptótica BAX, a qual integra-se à membrana externa da mitocôndria, induzindo diretamente a liberação do citocromo c (ESKES

et al., 2000; WEI, M. C. *et al.*, 2001). A ativação da caspase-8 e subsequente ativação da via intrínseca podem ser vistas na figura 10.

Figura 10 – Ativação da caspase-8 e subsequente ativação da via intrínseca da apoptose. Estresse no DNA está representado por ESTRESSE_DNA. As caspases 3 e 7 estão representadas por CASP_3_7, tBid representa a forma truncada de Bid e cyt_C representa o citocromo C. As linhas verdes representam ativação.



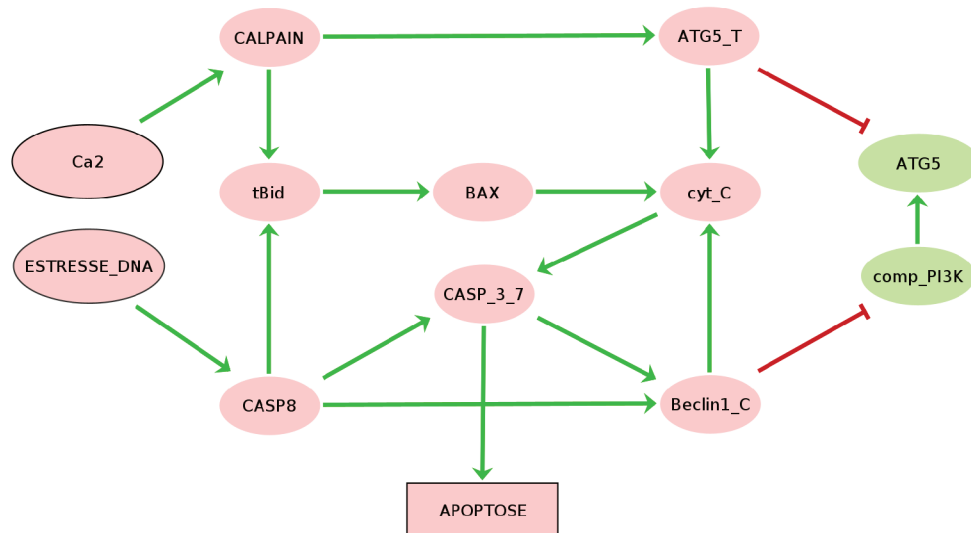
Fonte – A autora.

As proteínas da família Calpain precisam de quantidades de Cálcio para serem ativas. Um aumento na quantidade de Ca^{2+} intracelular desencadeia uma cascata de reações químicas que levam à ativação de Calpain (GIL-PARRADO *et al.*, 2002; MOMENI, 2011). Ainda, Ca^{2+} também leva à ativação de $CaMKK\beta$, que fosforila e ativa AMPK (GREEN *et al.*, 2011). Além disso, a proteína autofágica ATG5 passa por clivagem mediada por Calpain, resultando na forma truncada de ATG5: ATG5T. Esse produto clivado não possui mais as funções de ATG5 na formação dos autofagossomas. Pelo contrário, ATG5T desloca-se do citosol para a mitocôndria, desencadeando a liberação do citocromo c e a ativação da caspase-3, consequentemente levando à apoptose (YOUSEFI *et al.*, 2006). A regulação e as funções regulatórias de Calpain estão ilustradas na figura 11.

A proteína Beclin-1, que faz parte do complexo PI3K na via de autofagia, é clivada diretamente pelas caspases 3, 7 e 8. Esse processo resulta no produto Beclin-1-C, que também perde suas atividades autofágicas e transloca-se para a mitocôndria. Assim, Beclin-1-C induz a liberação do citocromo c, sensibilizando as células à apoptose (WIRAWAN *et al.*, 2010). Esta interação também está ilustrada na figura 11.

Portanto, as caspases 3 e 7, que fazem parte das vias intrínseca e extrínseca, são clivadas e ativadas pela caspase 8 e/ou pela liberação do citocromo c (MCILWAIN *et al.*, 2013), levando à execução do processo apoptótico pelo encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e, finalmente, a fagocitose desses corpos apoptóticos (ELMORE, 2007).

Figura 11 – Regulação e funções regulatórias de Calpain e interação de Beclin-1 com as caspases. Ca2 representa Ca^{2+} intracelular. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.



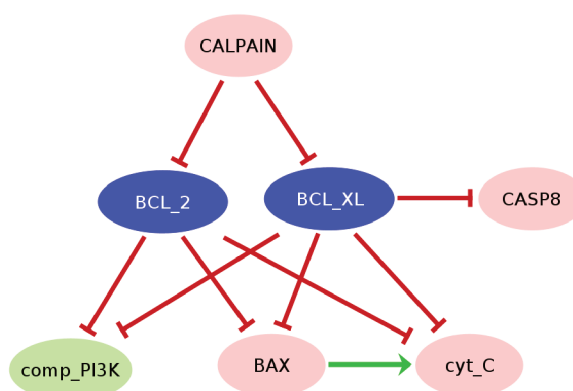
Fonte – A autora.

4.3 COMPONENTES DO *CROSS-TALK*

A conexão entre as vias de sinalização de apoptose e autofagia é chamada de *cross-talk*. Assim, o *cross-talk* entre apoptose e autofagia considera componentes que regulam ambas as vias de sinalização. Neste trabalho, estamos considerando as proteínas Bcl-2 e Bcl- X_L .

Bcl-2 e Bcl- X_L são proteínas antiapoptóticas que bloqueiam a liberação do citocromo c da mitocôndria, impedindo a ativação das caspases e o processo apoptótico (YANG, J. *et al.*, 1997). Ainda, Bcl-2 e Bcl- X_L parecem também inibir a atividade de BAX na mitocôndria (OLTVAL *et al.*, 1993; GROSS *et al.*, 1998), e Bcl- X_L inibe a resposta à estímulos da caspase-8 (SRINIVASAN *et al.*, 1998). Além disso, Bcl-2 e Bcl- X_L regulam a via de sinalização de autofagia através da inibição de Beclin-1 por uma ligação entre as proteínas. Como Beclin-1 participa na via de autofagia como parte do complexo PI3K, que contribui na formação dos autofagossomas, ao inibir Beclin-1, Bcl-2 e Bcl- X_L também inibem a formação desse complexo (PATTINGRE *et al.*, 2005; MAIURI *et al.*, 2007). Logo, além de ter funções antiapoptóticas, essas proteínas também têm funções antiautofágicas, regulando as duas vias de sinalização, conforme mostra a figura 12. Uma maneira de inibir Bcl-2 e Bcl- X_L é a clivagem feita por Calpain nos seus terminais N, o que reduz suas atividades de inibição (GIL-PARRADO *et al.*, 2002).

Figura 12 – Inibição das vias de autofagia e apoptose por Bcl-2 e Bcl-X_L. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.



Fonte – A autora.

4.4 MIRNAS

O quadro 4 apresenta resumidamente os miRNAs que consideramos como *inputs* da rede. Levamos em conta dois critérios para realizar a pesquisa bibliográfica: miRNAs que estão subexpressos/superexpressos em linhagens de câncer de mama triplo negativo - especialmente a linhagem MDA-MB-231 -, e que regulam componentes das vias de sinalização de apoptose/autofagia ou do *cross-talk*.

Quadro 4 – Regulação de miRNAs em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

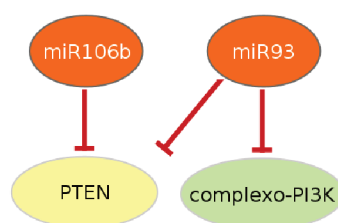
miRNAs	Regulação	Referência
miR-93-5p	superexpresso	Nana Li <i>et al.</i> (2017)
miR-100-5p	subexpresso	Gebeshuber e J. Martinez (2013) e Qian Jiang <i>et al.</i> (2016)
miR-106b-5p	superexpresso	Nana Li <i>et al.</i> (2016, 2017)
miR-124-3p	subexpresso	Yong-Jun Liang <i>et al.</i> (2013), Feng <i>et al.</i> (2016), Yanbo Wang <i>et al.</i> (2016) e Yan <i>et al.</i> (2019)
miR-144-3p	subexpresso	Pan <i>et al.</i> (2016)
miR-200c-3p	subexpresso	Jing Lin <i>et al.</i> (2013), Humphries <i>et al.</i> (2014), Song <i>et al.</i> (2015), Quanquan Sun <i>et al.</i> (2015) e Baiyao Wang <i>et al.</i> (2019)

Fonte – A autora.

4.4.1 miR-93 e miR-106b

Os níveis de expressão do miR-93 e do miR-106b são consideravelmente maiores em células de câncer de mama triplo negativo do que em células de outros tipos de câncer de mama (HU, J. *et al.*, 2015; LI, N. *et al.*, 2017). Ainda, a expressão de PTEN, um gene supressor de tumores, é inversamente proporcional à expressão desses miRNAs: miR-93 e miR-106b medeiam a proliferação de células de câncer de mama triplo negativo através da inibição de PTEN (LI, N. *et al.*, 2017). Em linhagens celulares de leucemia, o miR-93 liga-se ao mRNA de Beclin-1 para inibir sua tradução, consequentemente inibindo o complexo PI3K e podendo levar à inibição de autofagia (WU, X. *et al.*, 2016). Além disso, miR-93 e miR-106b inibiram a atividade autofágica nas linhagens celulares de câncer de cólon HCT116 e SW480 (LU *et al.*, 2014). A figura 13 mostra a interação do miR-106b e miR-93 com o complexo PI3K e PTEN.

Figura 13 – Regulações dos miR-93 e miR-106b. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.



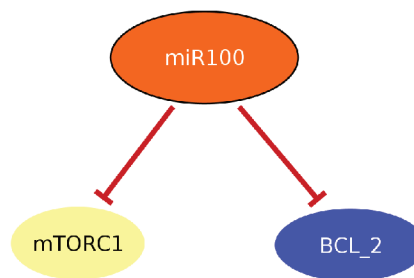
Fonte – A autora.

As interações do miR-93-5p e do miR-106b-5p com PTEN e a interação do miR-93-5p com Beclin-1 também foram encontradas no TargetScan, onde é possível ver a região de pareamento prevista entre os genes e os miRNAs.

4.4.2 miR-100

O miR-100 está subexpresso nas células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 e SUM149 (GONG *et al.*, 2015; GEBESHUBER; MARTINEZ, J., 2013). Ainda, a superexpressão de miR-100 leva à inibição da proliferação em células SUM149 (GONG *et al.*, 2015). Em relação aos processos de autofagia e apoptose, a superexpressão de miR-100 suprime diretamente a expressão de mTOR, promovendo a apoptose de células de carcinoma de esôfago (SUN, J. *et al.*, 2013), a autofagia de células de carcinoma hepatocelular (GE *et al.*, 2014) e a autofagia e apoptose de células de osteosarcoma (YU, Z. *et al.*, 2018). Ainda, o miR-100 reduziu a expressão de mTOR e Bcl-2 na linhagem celular de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço 1386Ln (CHEN, Dan *et al.*, 2013). Portanto, as interações definidas na rede regulatória para o miR-100 podem ser vistas na figura 14.

Figura 14 – Regulações do miR-100. As linhas vermelhas representam inibição.



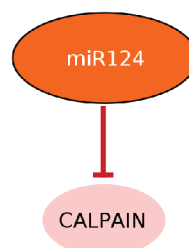
Fonte – A autora.

A interação do miR-100-5p com Bcl-2 também foi encontrada na Tarbase, onde é possível verificar em quais linhagens essa interação já foi testada. Já a interação do miR-100-5p com mTOR está apresentada no TargetScan, onde é possível ver a região de pareamento prevista entre o gene e o miRNA.

4.4.3 miR-124

O miR-124 está subexpresso em 7 células de câncer de mama, incluindo as seguintes linhagens de TNBC: MDA-MB-435S, MDA-MB-231, HSS578T e HCC1937 (FENG *et al.*, 2016). Além disso, a superexpressão do miR-124 inibe a proliferação das células de câncer de mama e induz a parada do ciclo celular (FENG *et al.*, 2016, 2015). Ainda, o miR-124 diminui os níveis da proteína Calpain na linhagem celular embrionária de rim HEK293 (JEGGA *et al.*, 2011), conforme ilustra a figura 15.

Figura 15 – Inibição de Calpain pelo miR-124. A linha vermelha representa inibição.



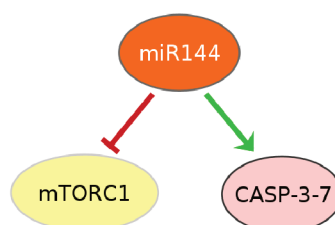
Fonte – A autora.

A interação entre o miR-124-3p e Calpain 1 também foi encontrada no TargetScan, onde é possível ver a região de pareamento prevista entre o gene e o miRNA.

4.4.4 miR-144

O miR-144 está subexpresso na linhagem de células MDA-MB-231, em que a superexpressão de miR-144 inibe a proliferação das células e aumenta a taxa de apoptose (PAN *et al.*, 2016). O miR-144 também desempenha funções parecidas em células de câncer de pulmão, em que inibe a proliferação e induz apoptose através do aumento de atividade das caspases 3 e 7 (CHEN, Shanshan *et al.*, 2015). Além disso, a proteína mTOR é um alvo direto do miR-144 em células de câncer renal e células de câncer colorretal, em que os níveis das respectivas expressões estão inversamente relacionadas (XIANG *et al.*, 2016; IWAYA *et al.*, 2012). Logo, as regulações do miR-144 estão representadas na figura 16.

Figura 16 – Regulações do miR-144. As linhas verde e vermelha representam ativação e inibição, respectivamente.



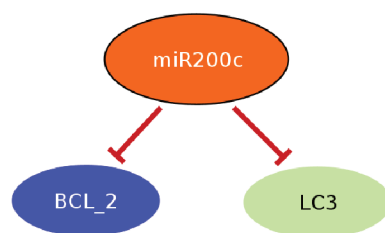
Fonte – A autora.

4.4.5 miR-200c

A expressão do miR-200c é menor em células de câncer de mama triplo negativo do que em outras linhagens de câncer de mama (SUN, Q. *et al.*, 2015). Na linhagem MDA-MB-231, em que a expressão do miR-200c também é menor, a superexpressão do miR-200c inibe a proliferação das células (SONG *et al.*, 2015), e a expressão ectópica do miR-200c inibe a autofagia induzida por radiação, havendo uma relação inversa entre as expressões do miR-200c e a proteína LC3 (SUN, Q. *et al.*, 2015). Além disso, a superexpressão do miR-200c está associada ao aumento da taxa de sobrevivência de pacientes com câncer de mama (KAWAGUCHI *et al.*, 2017). Em linhagens celulares de câncer gástrico e câncer de pulmão, nas quais o miR-200c também está subexpresso, o miR-200c reduz o nível da proteína BCL-2 e sensibiliza as células à apoptose (ZHU, W. *et al.*, 2012), conforme mostra a figura 17.

A interação entre o miR-200c-3p e BCL-2 também foi encontrada no TargetScan e na Tarbase.

Figura 17 – Inibição de LC3 e BCL-2 pelo miR-200c. As linhas vermelhas representam inibição.



Fonte – A autora.

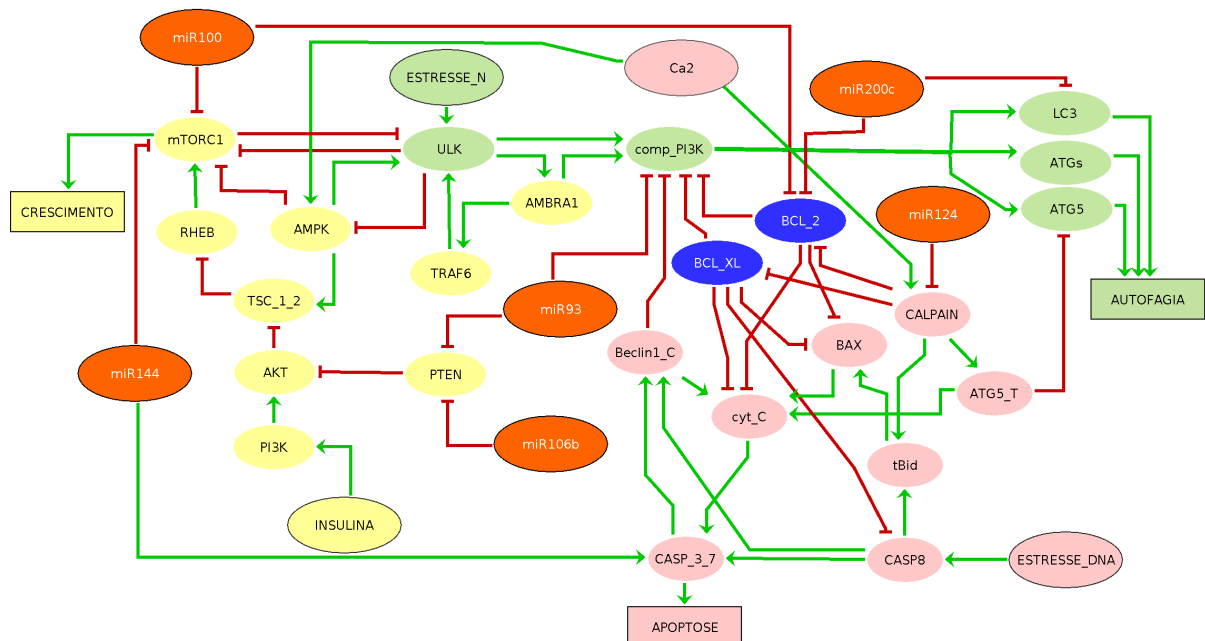
5 MODELO BOOLEANO

Neste capítulo estão apresentadas a descrição completa do modelo booleano e as análises de simulações do modelo. O modelo é composto pela rede regulatória e regras lógicas apresentadas nas próximas seções. A construção e simulação do modelo foram feitos no GINSim, que é um *software* baseado no formalismo lógico de Thomas para a modelagem de redes regulatórias, e suporta a definição, simulação e análise de gráficos regulatórios (NALDI *et al.*, 2009). A versão utilizada foi a 3.0.17, disponível em ginsim.org.

5.1 REDE REGULATÓRIA DO *CROSS-TALK* ENTRE AUTOFAGIA E APOPTOSE EM CÉLULAS DE TNBC

A rede regulatória completa do modelo está apresentada na figura 18. Os componentes das vias de sinalização estão organizados da seguinte maneira: a via de sinalização de autofagia é representada pelos nós da rede em verde claro; as vias de sinalização de apoptose - intrínseca e extrínseca - estão representadas pelas elipses rosas; os elementos do *cross-talk* estão em azul; a via de PI3K/AKT/mTOR está representada pelos componentes em amarelo claro; os miRNAs estão representados pelas elipses laranjas.

Figura 18 – Rede regulatória do *cross-talk* entre autofagia e apoptose em células de câncer de mama triplo negativo. A cor verde representa a via de autofagia, rosa representa a via de apoptose, azul representa os componentes do *cross-talk*, amarelo representa a via de PI3K/AKT/mTOR e laranja representa os miRNAs. As linhas verdes e vermelhas representam ativação e inibição, respectivamente.



Fonte – A autora.

A via de sinalização de autofagia é ativada pela privação de nutrientes ou fatores de crescimento, o que representamos como um *input* de estresse nutricional. No modelo, a conclusão do processo autofágico acontece com a ativação do *output* AUTOFAGIA. Já a via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR é ativada pelos receptores tirosina quinase, o que no modelo representamos pelo *input* INSULINA. Assim, o estágio em que mTORC1 está ativado e leva ao crescimento celular acontece com a ativação do *output* CRESCIMENTO. Além disso, a via extrínseca de apoptose é ativada pelo *input* que representa estresse no DNA, ESTRESSE_DNA, o que leva à ativação da caspase-8. Calpain é ativada pela via de cálcio, que representamos pelo *input* Ca²⁺. Logo, a execução do processo apoptótico é dado pelo ativamento do *output* APOPTOSE. A descrição completa de todos os componentes da rede regulatória está apresentada no quadro 5.

Quadro 5 – Descrição dos componentes da rede regulatória.

Componente	Descrição	Função
ESTRESSE_N	Estresse Nutricional	Ativa a via de autofagia
ESTRESSE_DNA	Estresse no DNA	Ativa a via de apoptose
INSULINA	Insulina (produto do gene INS)	Ativa a via de PI3K/AKT/mTOR
Ca ²⁺	Molécula de cálcio citoplasmático (Ca ²⁺)	Ativa AMPK e a CALPAIN
miR93	microRNA-93-5p	Inibe a via de autofagia e PTEN
miR100	microRNA-100-5p	Inibe a via de PI3K/AKT/mTOR e BCL_2
miR106b	microRNA-106b-5p	Inibe PTEN
miR124	microRNA-124-3p	Inibe a via de apoptose
miR144	microRNA-144-3p	Inibe a via de PI3K/AKT/mTOR e ativa a via de apoptose
miR200c	microRNA-200c-3p	Inibe BCL_2 e a via de autofagia
PI3K	Família de proteínas PI3K	Ativa AKT
AKT	Família de proteínas AKT	Inibe TSC_1_2
PTEN	proteína PTEN	Inibe AKT
TSC_1_2	proteínas TSC1 e TSC2	Inibe RHEB
RHEB	proteína RHEB	Ativa mTORC1
AMPK	complexo de proteínas AMPK	Inibe mTORC1 e ativa a via de autofagia

Continuação na próxima página

Continuação da página anterior

Componente	Descrição	Função
mTORC1	proteínas mTOR, mLST8, Raptor, PRAS40 e Deptor	Ativa o <i>output</i> CRESCIMENTO e inibe a via de autofagia
TRAF6	proteína TRAF6	Ativa ULK
AMBRA1	proteína AMBRA1	Ativa TRAF6
ULK	proteínas ULK1, ULK2, ATG101 e FIP200	Ativa o comp_PI3K
comp_PI3K	proteínas Beclin-1, VPS34, VPS15, Barkor e NRBF2	Ativa as ATGs e LC3
LC3	proteínas LC3A, LC3B e LC3C	Ativa o <i>Output</i> AUTOFAGIA
ATGs	proteínas ATG3, ATG4, ATG7, ATG12 e ATG16	Ativa o <i>Output</i> AUTOFAGIA
BCL_2	proteína Bcl-2	Inibe a via de autofagia e a via de apoptose
BCL_XL	proteína Bcl-X _L	Inibe a via de autofagia e a via de apoptose
Beclin1_C	proteína Beclin-1 clivada	Inibe a via de autofagia
ATG5_T	proteína ATG5 truncada	Inibe a via de autofagia
CALPAIN	família de proteínas Calpain	Ativa ATG5_T e BAX e inibe BCL-X _L
tBid	proteína Bid truncada	Ativa BAX
BAX	proteína BAX	Ativa o cyt_C
cyt_C	proteína citocromo C	Ativa CASP_3_7
CASP8	proteína Caspase-8	Ativa CASP_3_7, tBid e Beclin1_C
CASP_3_7	proteínas Caspase-3 e Caspase-7	Ativa Beclin1_C e o <i>output</i> APOPTOSE
CRESCIMENTO	<i>Output</i> que representa o crescimento celular	Regulado pela via de PI3K/AKT/mTORC1
AUTOFAGIA	<i>Output</i> que representa autofagia	Regulado pela via de autofagia
APOPTOSE	<i>Output</i> que representa apoptose	Regulado pela via de apoptose

Fonte – A autora.

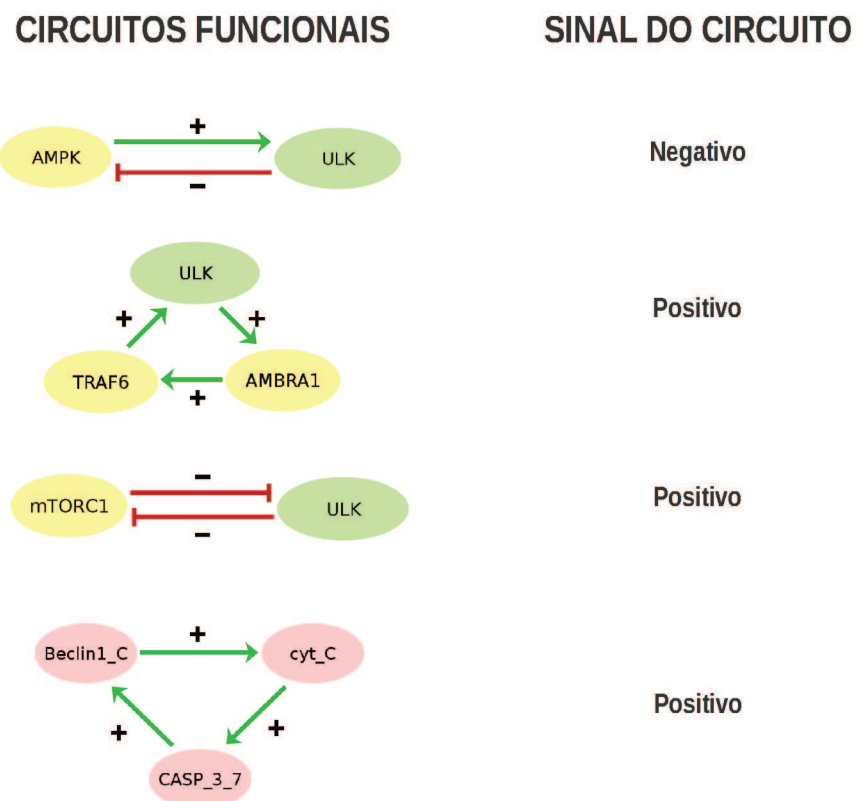
5.2 REGRAS LÓGICAS

As regras lógicas controlando cada componente do modelo estão apresentadas no quadro 6 e são baseadas nos mecanismos de regulação descritos anteriormente. Não são definidas regras lógicas para os *inputs*, visto que eles não são regulados por nenhuma variável. Para a determinação de cada estado estável, a simulação obedecerá às regras de cada variável. Os operadores lógicos utilizados são *AND* ('&'), *NOT* ('!') e *OR* (|).

5.3 CIRCUITOS FUNCIONAIS

A seguir, a figura 19 apresenta todos os circuitos funcionais do modelo. A análise de funcionalidade dos circuitos é feita pela GINsim. Como podemos observar, há quatro circuitos funcionais, sendo um negativo e três positivos.

Figura 19 – Circuitos funcionais do modelo. O sinal de cada circuito é definido pela multiplicação dos sinais das interações que compõem o circuito. As linhas verdes e vermelhas representam ativação e inibição, respectivamente.



Fonte – A autora

Quadro 6 – Regras lógicas do modelo. Os operadores lógicos usados são &, | e !, que significam, respectivamente, AND, OR e NOT.

Componente	Regra Lógica
PI3K	INSULINA
AKT	PI3K & !PTEN
PTEN	!miR106b & !miR93
TSC_1_2	AMPK & !AKT
RHEB	!TSC_1_2
AMPK	Ca2 & !ULK
mTORC1	RHEB & !miR144 & !miR100 & !AMPK & !ULK
TRAF6	AMBRA1
AMBRA1	ULK
ULK	(ESTRESSE_N & !mTORC1) (AMPK & !mTORC1) (TRAF6 & !mTORC1)
comp_PI3K	(ULK AMBRA1) & !miR93 & Beclin1_C & (!BCL_2 !BCL_XL)
LC3	comp_PI3K & !miR200c
ATGs	comp_PI3K
ATG5	comp_PI3K & !ATG5_T
BCL_2	!miR200c & !miR100 & !CALPAIN
BCL_XL	!CALPAIN
Beclin1_C	CASP_3_7 CASP8
ATG5_T	CALPAIN
CALPAIN	Ca2 & !miR124
tBid	CASP8 CALPAIN
BAX	tBid & !BCL_2 & !BCL_XL
cyt_C	(BAX Beclin1_C ATG5_T) & !BCL_2 & !BCL_XL
CASP8	ESTRESSE_DNA & !BCL_XL
CASP_3_7	CASP8 cyt_C miR144
CRESCIMENTO	mTORC1
AUTOFAGIA	LC3 & ATG5 & ATGs
APOPTOSE	CASP_3_7

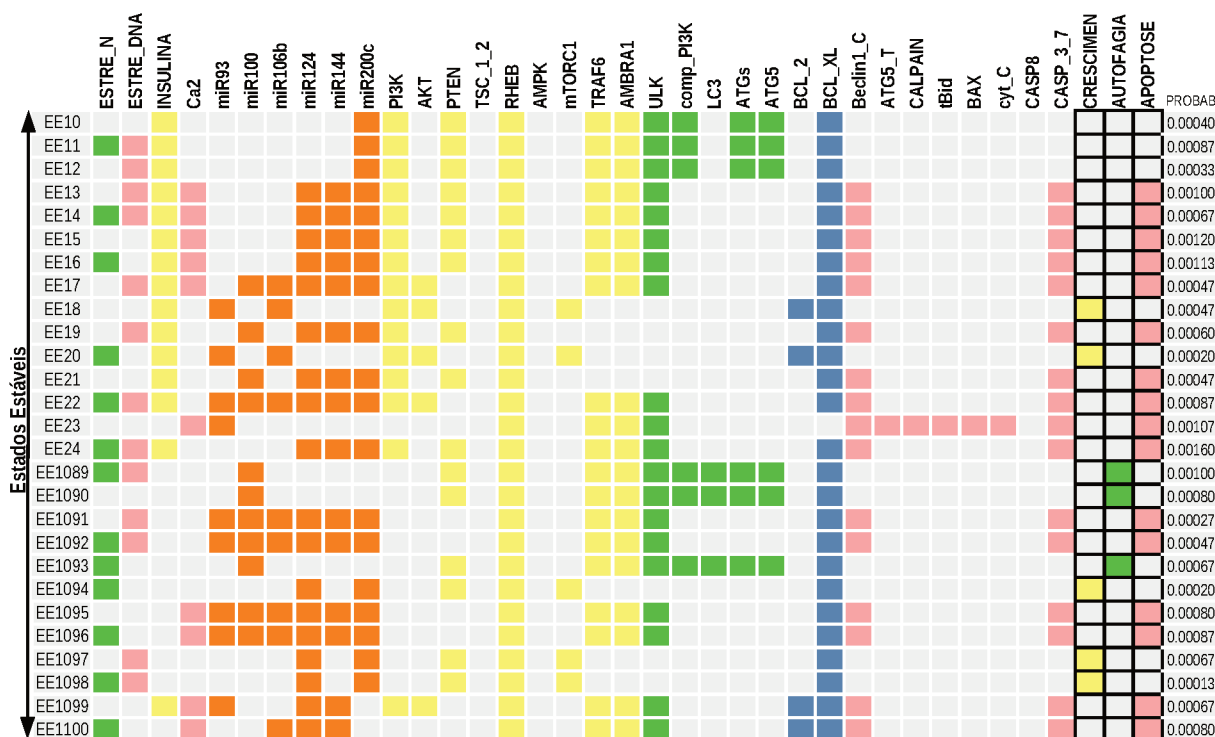
Fonte – A autora.

5.4 ESTADOS ESTÁVEIS

Um estado é chamado de ‘estado fixo estável’ quando o sistema tende a mover na direção do estado. Em uma simulação, partindo de um estado inicial, o sistema irá estabilizar em um estado estável após evoluir cada valor (0 ou 1) das variáveis do sistema de acordo

com as regras lógicas estabelecidas e os valores dos *inputs*. Os estados estáveis e atratores que um sistema apresenta são chamados de comportamento dinâmico do sistema. Assim, a figura 20 apresenta alguns dos estados estáveis do modelo para o caso do tipo selvagem, isto é, o caso sem perturbações. No total, o modelo apresenta 1344 estados estáveis, sendo 768 estados estáveis que levam à ativação do *output* APOPTOSE, 128 estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO, 48 estados estáveis que levam à ativação do *output* AUTOFAGIA, e 400 estados estáveis que não ativam *outputs*.

Figura 20 – Estados estáveis para o caso do tipo selvagem. Cada linha representa um estado estável. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.

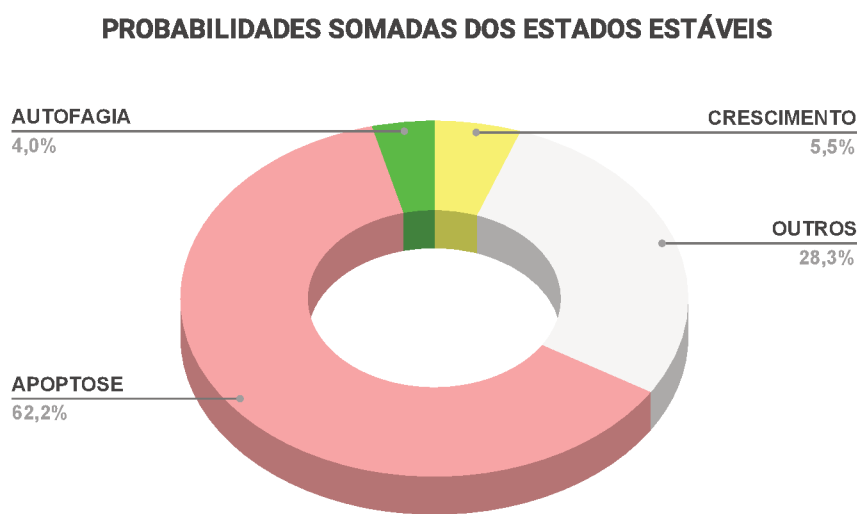


Fonte – A autora.

A figura 21 apresenta as probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis. As probabilidades são calculadas no GINsim pela simulação adaptada do método Monte Carlo para a identificação de atratores e o cálculo aproximado da probabilidade de acessibilidade de cada atrator. Assim, na figura 21, somamos as probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis que partilham o mesmo *output*. Cada um dos 1344 estados estáveis apresenta uma probabilidade de acessibilidade. Como podemos observar, as probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE são bem maiores do que os outros estados. Esse comportamento é esperado, visto que dos 10 *inputs* da rede, 3 ativam diretamente a via de

apoptose - ESTRESSE_DNA, Ca2 e miR144 -, enquanto que 2 *inputs* inibem diretamente a via de PI3K/AKT - miR100 e miR144 - e outros 2 *inputs* inibem diretamente a via de autofagia - miR93 e miR200c.

Figura 21 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



Fonte – A autora.

5.5 ANÁLISE DE PERTURBAÇÕES DOS MIRNAS

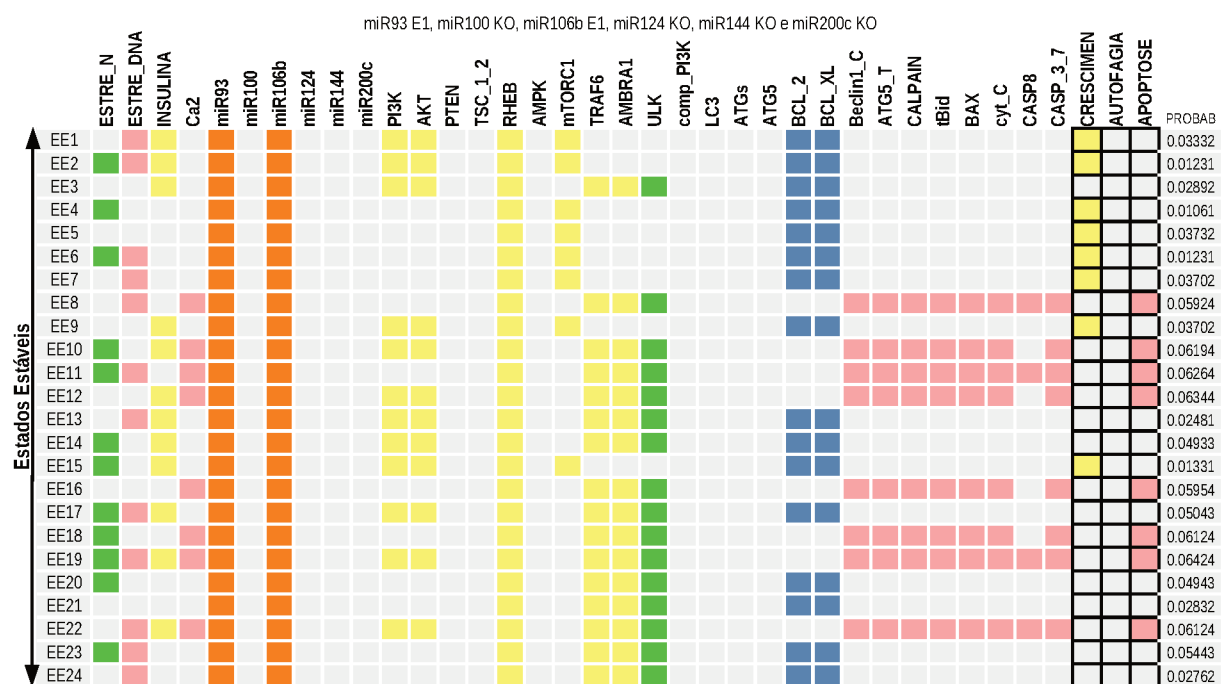
A seguir, analisamos o comportamento do modelo para diferentes tipos de perturbações dos miRNAs. As perturbações consistem em fixar o nível de uma variável. Assim, o sistema pode ser simulado levando em conta uma perturbação, ou várias perturbações combinadas, e apresentar diferentes *outputs* do caso sem perturbações. Nessa seção, nos referimos à perda de função como 'nocaute' (KO: *knockout*), e ao ganho de função como 'atividade ectópica 1' (E1: *ectopic activation*).

5.5.1 Condições normais em células de TNBC

Para a primeira análise decidimos fazer a perturbação que espelha a expressão dos miRNAs em células de TNBC em condições normais. Assim, como apenas o miR93 e o miR106b

estão superexpressos em células de TNBC, enquanto que os miRNAs restantes estão subexpressos, fixamos o valor do miR93 e do miR106b em 1 e fizemos nocaute dos miRNAs restantes. A figura 22 apresenta todos os 24 estados estáveis para esta perturbação. O modelo apresenta 8 estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO, 8 estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE, e 8 estados estáveis que não ativam *outputs*.

Figura 22 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR93 e do miR106b, e nocaute dos miRNAs restantes. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

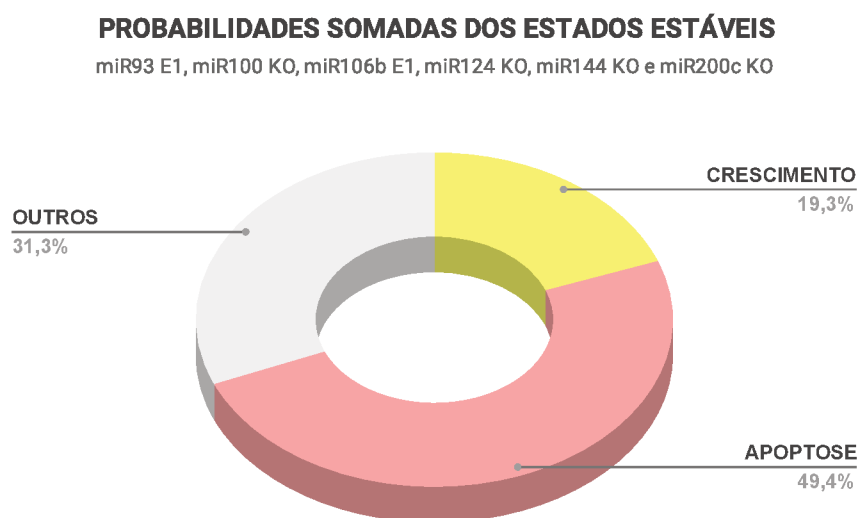
Como o miR93 e o miR106b estão sempre ativados, é esperado não termos a ativação da via de autofagia, visto que o miR93 inibe o complexo PI3K. Além disso, já foi verificado experimentalmente que ambos os miRNAs inibem a atividade autofágica em linhagens celulares de câncer de cólon (LU *et al.*, 2014). Ainda, o miR93 e o miR106b levam à ativação do *output* CRESCIMENTO através da inibição de PTEN e consequente ativação de mTORC1, o que parece estar em acordo com os seguintes resultados já observados experimentalmente, em que o miR-93 promoveu a proliferação celular através da interação com PTEN em linhagens celulares de câncer ósseo e câncer de esôfago, nas quais também apresenta expressão relativamente alta (KAWANO *et al.*, 2015; LIU, M. X. *et al.*, 2018). Além disso, em linhagens celulares de câncer de cerebelo, nas quais o miR-106b está superexpresso, este interage diretamente com PTEN, e a diminuição da expressão do miR-106b por *LoF* reduziu a proliferação das células (LI, K. K.-W.

et al., 2015). Em linhagens celulares de carcinoma de laringe e carcinoma hepatocelular, nas quais a expressão do miR-106b é relativamente alta, a atividade ectópica do miR-106b também promoveu a proliferação celular (CAI, K. *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2013).

No modelo, a ativação da via de apoptose não parece ser influenciada pela expressão do miR93 e miR106b, apesar de o miR-106b promover a proliferação celular e inibir apoptose em células de câncer de pulmão (WEI, K. *et al.*, 2017). Nesse caso, os 8 estados estáveis que apresentam a ativação do *output* APOPTOSE são influenciados pela atividade dos *inputs* ESTRESSE_DNA e Ca2. Ca2 ativa a via intrínseca de apoptose nos estados estáveis 10, 12, 16 e 18, e ambos os inputs ativam a via extrínseca e intrínseca nos estados estáveis 8, 11, 19 e 22. Como veremos nas próximas seções, a taxa de incidência de apoptose parece ser maior com o nocaute do miR93 e miR106b do que com suas ativações.

A figura 23 apresenta as probabilidades somadas dos estados estáveis. Somamos as probabilidades de acessibilidade, presentes na figura 22, dos estados estáveis que partilham o mesmo *output*. Assim, apesar de o sistema apresentar 8 estados estáveis para apoptose, 8 para crescimento e 8 estados estáveis sem a ativação de *outputs*, as probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE são bem maiores do que as dos outros estados.

Figura 23 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR93 e do miR106b, e nocaute dos miRNAs restantes. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.

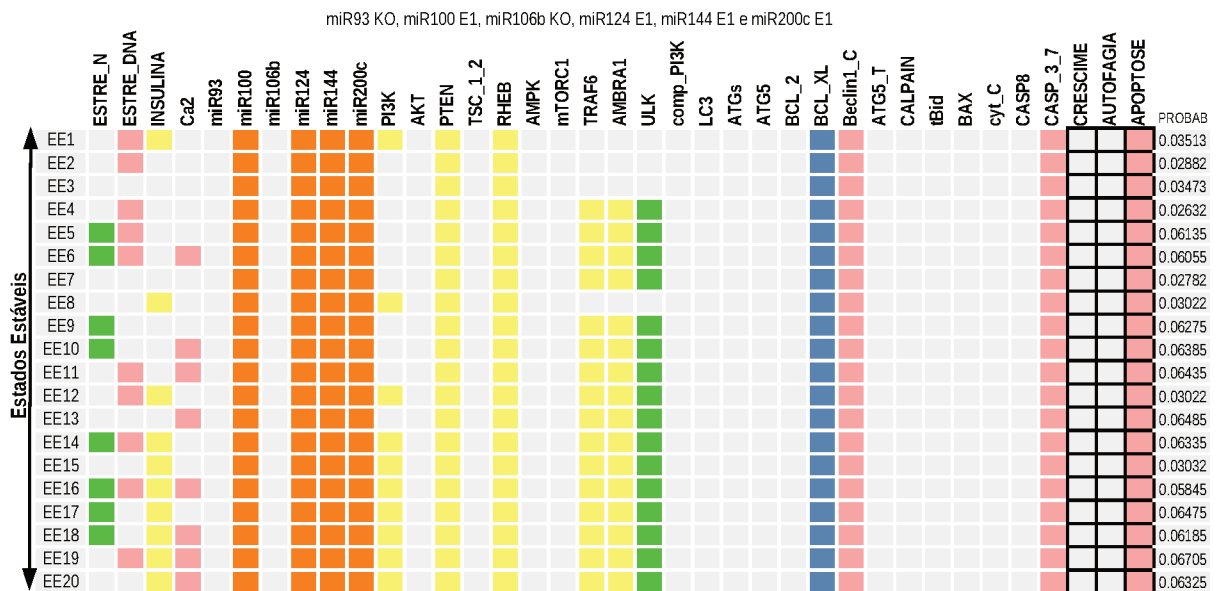


Fonte – A autora.

5.5.2 Nocaute do miR93 e miR106b, atividade ectópica 1 dos miRNAs restantes

Para essa perturbação, fizemos o contrário da análise anterior: nocaute do miR93 e miR106b, que em condições normais estão superexpressos em células de TNBC, e a atividade ectópica 1 dos miRNAs restantes, que em condições normais estão subexpressos em células de TNBC. A figura 24 apresenta todos os 20 estados estáveis para essa perturbação. Nesse caso, todos estados estáveis levam à ativação do *output* APOPTOSE.

Figura 24 – Estados estáveis para o nocaute do miR93 e do miR106b e atividade ectópica 1 dos miRNAs restantes. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

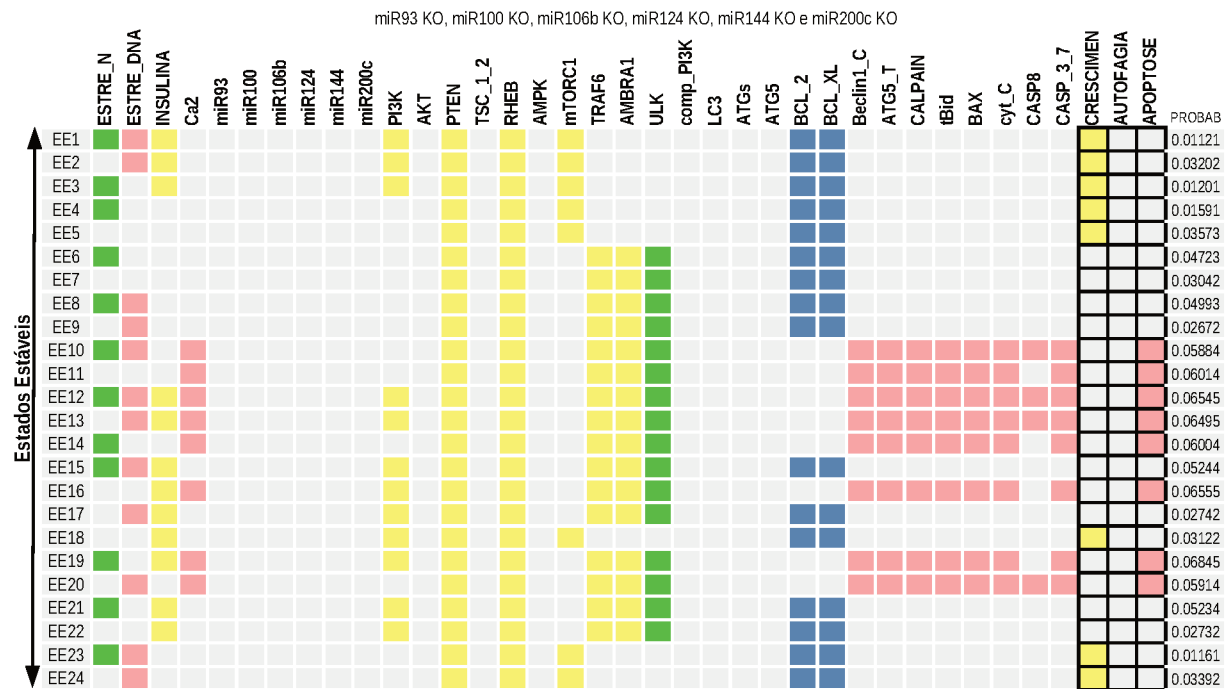
É esperado apenas a ativação da via de apoptose pois o miR144, que nesta perturbação sempre está ativado, ativa diretamente a CASP_3_7, que por sua vez ativa Beclin1_C e impede a ativação do complexo PI3K. Além disso, o miR100 e o miR144 inibem mTORC1, impedindo a ativação do *output* CRESCIMENTO. Ainda, o miR200c inibe LC3, também impedindo a ativação do *output* AUTOFAGIA.

5.5.3 Nocaute de todos os miRNAs

Nesse caso, o nocaute de todos os miRNAs foi realizado, com o objetivo de ver como o modelo se comporta. A figura 25 apresenta todos os 24 estados estáveis para esta perturbação.

O modelo apresenta 8 estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO, 8 estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE, e 8 estados estáveis que não ativam *outputs*.

Figura 25 – Estados estáveis para o nocaute de todos os miRNAs. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.

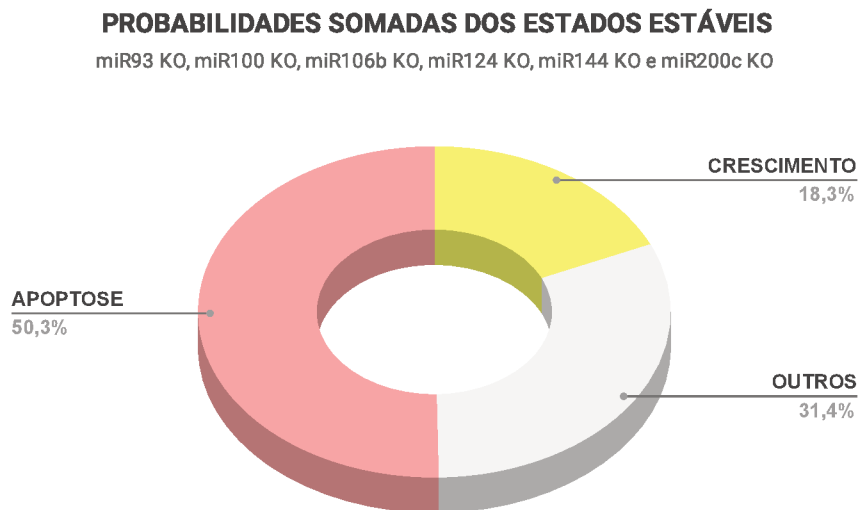


Fonte – A autora.

Como podemos observar, a ativação de BCL_2, BCL_XL ou Beclin1_C nos estados estáveis inibe o comp_PI3K, impedindo a ativação do *output* AUTOFAGIA. Ainda, o nocaute de miR100 e miR144 contribui para a ativação de mTORC1, levando à ativação do *output* CRESCIMENTO em 8 estados estáveis.

A figura 26 apresenta as probabilidades somadas dos estados estáveis. Somamos as probabilidades de acessibilidade, presentes na figura 25, dos estados estáveis que partilham o mesmo *output*. Assim, as probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE são relativamente maiores que as dos outros estados apesar de o modelo apresentar a mesma quantidade de estados estáveis para cada *output*.

Figura 26 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para o nocaute de todos os miRNAs. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



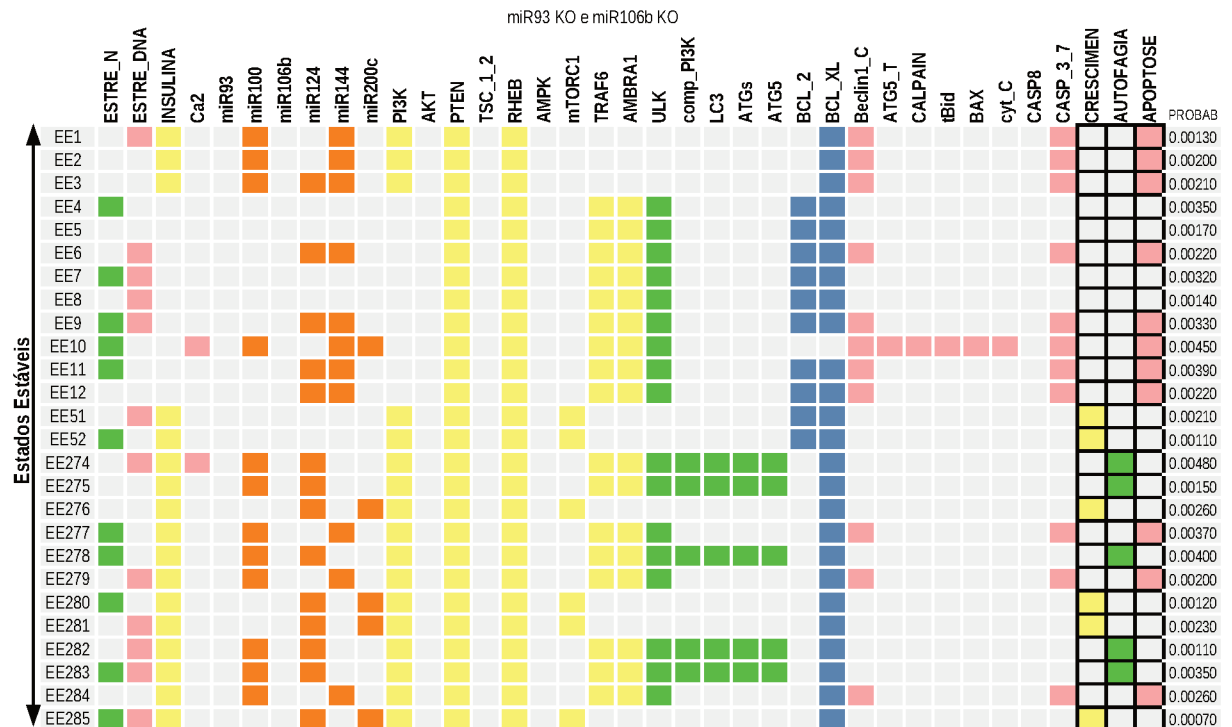
Fonte – A autora.

5.5.4 Nocaute do miR93 e do miR106b

Para esta perturbação, decidimos analisar o nocaute apenas do miR93 e do miR106b. A figura 27 apresenta alguns dos 336 estados estáveis que o modelo apresenta. Para esse caso, há 192 estados estáveis que levam à ativação do *output* APOPTOSE, 32 estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO, 24 estados estáveis que levam à ativação do *output* AUTOFAGIA, e 88 estados estáveis que não ativam *outputs*.

Podemos observar que esta é a primeira análise de perturbação que ativa o *output* AUTOFAGIA. O que difere das análises anteriores é que o nocaute do miR93 ajuda na possibilidade de ativação do comp_PI3K e subsequente ativação da via de autofagia. Combinado à isso, o nível do miR200c não está fixo em 1, o que possibilita a ativação de LC3.

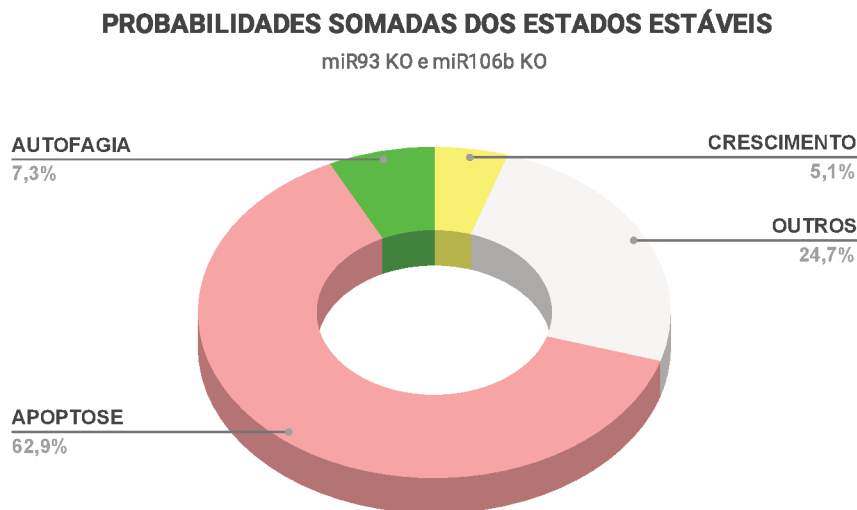
Figura 27 – Estados estáveis para o nocaute do miR93 e miR106b. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

A figura 28 apresenta as probabilidades somadas dos estados estáveis. Como podemos observar, as probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE mantêm-se relativamente altas com o nocaute do miR93 e do miR106b. Além disso, quando comparamos esta análise com o primeiro caso, no qual tínhamos a atividade ectópica 1 do miR93 e do miR106b, podemos observar que a soma das probabilidades de acessibilidade que levam à ativação do *output* CRESCIMENTO diminuiu para 5,1%, em comparação com os 19,3% do primeiro caso. Esse resultado é similar ao que foi discutido na subseção 5.5.1, na qual o miR-93 e o miR-106b promovem a proliferação celular.

Figura 28 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para o nocaute do miR93 e miR106b. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



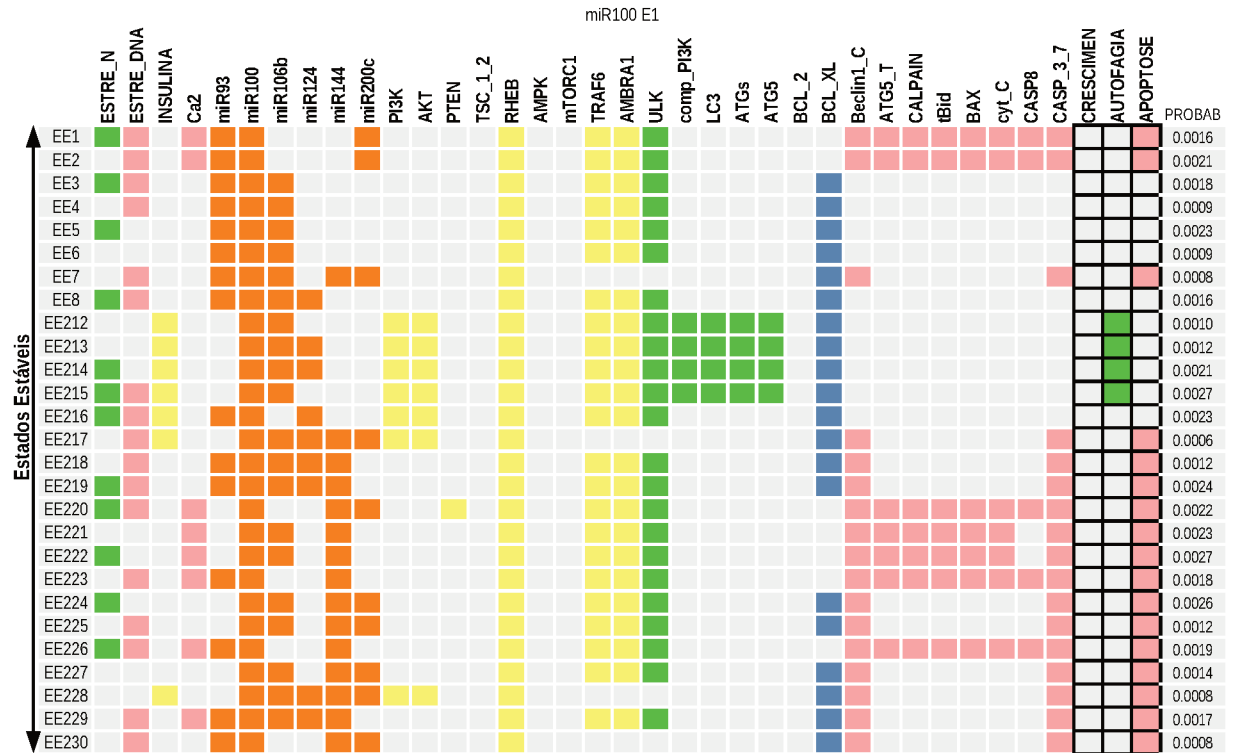
Fonte – A autora.

5.5.5 Atividade ectópica 1 do miR100

Começamos essa análise com uma perturbação individual do miR100. A figura 29 apresenta alguns dos 640 estados estáveis para a atividade ectópica 1 deste miRNA. Nesse caso, o modelo apresenta 384 estados estáveis que levam à ativação do *output* APOPTOSE, 48 estados estáveis que levam à ativação do *output* AUTOFAGIA, e 208 estados estáveis que não ativam *outputs*. Podemos notar que essa é a primeira análise que não ativa o *output* CRESCIMENTO, já que o miR100 inibe mTORC1. Já foi verificado experimentalmente que a superexpressão de miR100 leva à inibição da proliferação na linhagem celular de câncer de mama SUM149 (GONG *et al.*, 2015) e que a superexpressão de miR100 suprime diretamente a expressão de mTOR.

A figura 30 apresenta as probabilidades somadas de todos os estados estáveis. Em relação à ativação dos *outputs* AUTOFAGIA e APOPTOSE, as probabilidades de acessibilidade de apoptose continuam altas com a atividade ectópica 1 do miR100. Ainda, essa perturbação apresenta um maior número de estados estáveis e maiores probabilidades de acessibilidade que ativam o *output* AUTOFAGIA do que as perturbações anteriores. Esse comportamento do modelo para tal perturbação parece também concordar com os resultados de que a superexpressão

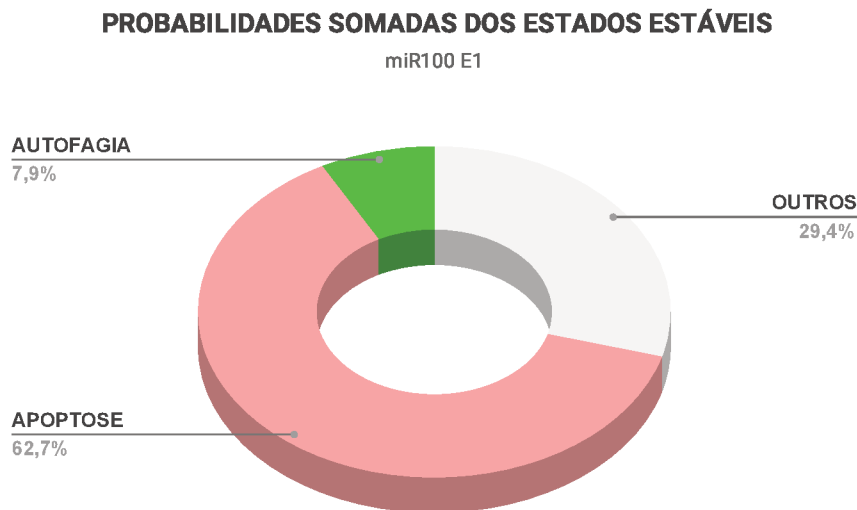
Figura 29 – Estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR100. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

do miR-100 reduziu a proliferação de células de câncer de próstata (YE *et al.*, 2020) e induziu a morte autofágica de células de câncer de endométrio (CAI, J. *et al.*, 2017) através da interação com mTOR.

Figura 30 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR100. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



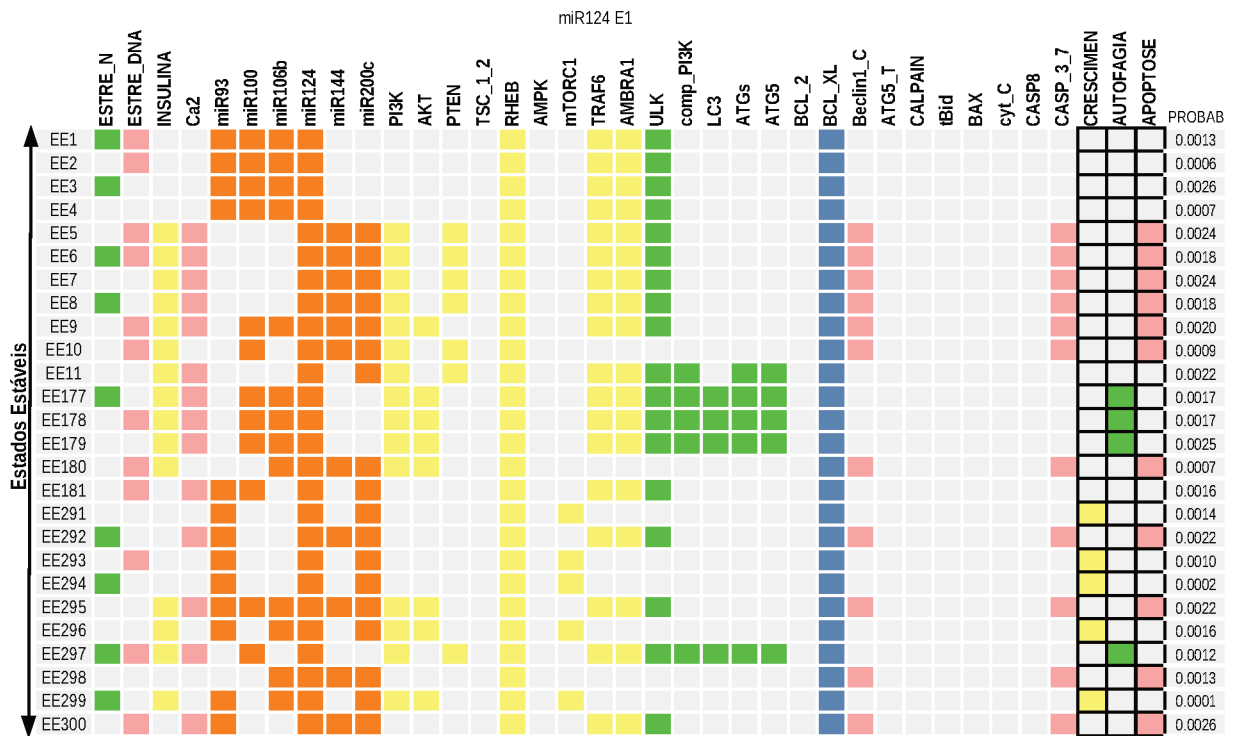
Fonte – A autora.

5.5.6 Atividade ectópica 1 do miR124

Seguindo com a análise de perturbações individuais, fixamos o nível de ativação do miR124 em 1. A figura 31 apresenta alguns dos 672 estados estáveis para essa perturbação. O modelo apresenta 320 estados estáveis que levam à ativação do *output* APOPTOSE, 64 estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO, 32 estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA e 256 estados estáveis que não ativam *outputs*.

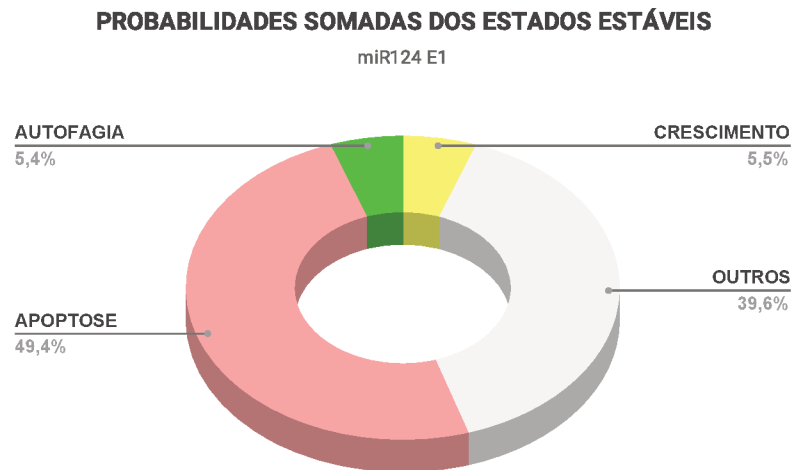
Podemos observar na figura 32 que, em relação ao caso do tipo selvagem, a ativação do miR124 diminui as probabilidades de acessibilidade dos estados que ativam apoptose. Como o miR124 inibe CALPAIN, esta não consegue impedir a ativação de BCL_XL e BCL_2, que consequentemente inibem cyt_C e CASP8. Assim, CASP_3_7 só é ativada pelo miR144. Ainda, com a inibição de CALPAIN, ATG5_T não é ativada, o que possibilita a ativação da via de autofagia.

Figura 31 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR124. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

Figura 32 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR124. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.

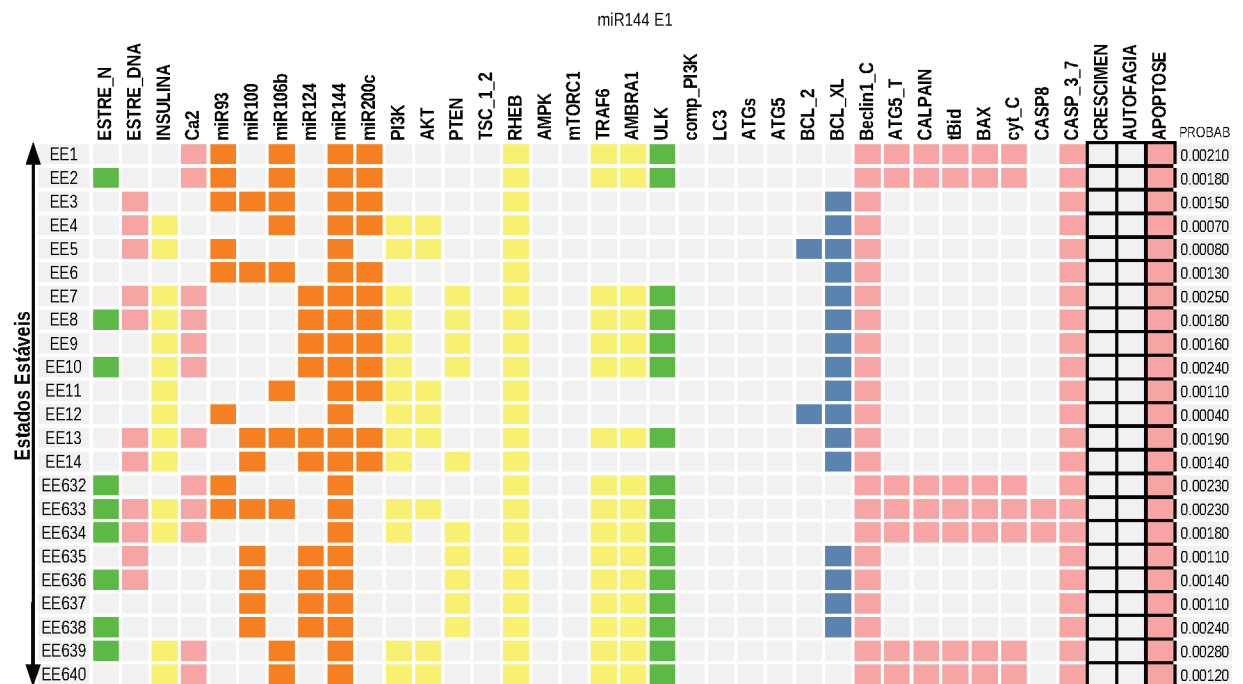


Fonte – A autora.

5.5.7 Atividade ectópica 1 do miR144

A figura 33 apresenta alguns estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR144. Nesse caso, o modelo apresenta 640 estados estáveis, em que todos levam à ativação do *output* APOPTOSE. Como o miR144 está sempre ativo, ele impede a ativação do *output* CRESCIMENTO através da inibição de mTORC1. Ainda, o miR144 ativa CASP_3_7, que cliva Beclin-1 e impede a ativação da via de autofagia. A inibição da via de PI3K/AKT/mTOR pelo miR144 no modelo está em acordo com os dados de que a superexpressão do miR144 em células do tipo MDA-MB-231 inibe a proliferação e aumenta a taxa de apoptose das células (PAN *et al.*, 2016).

Figura 33 – Estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR144. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



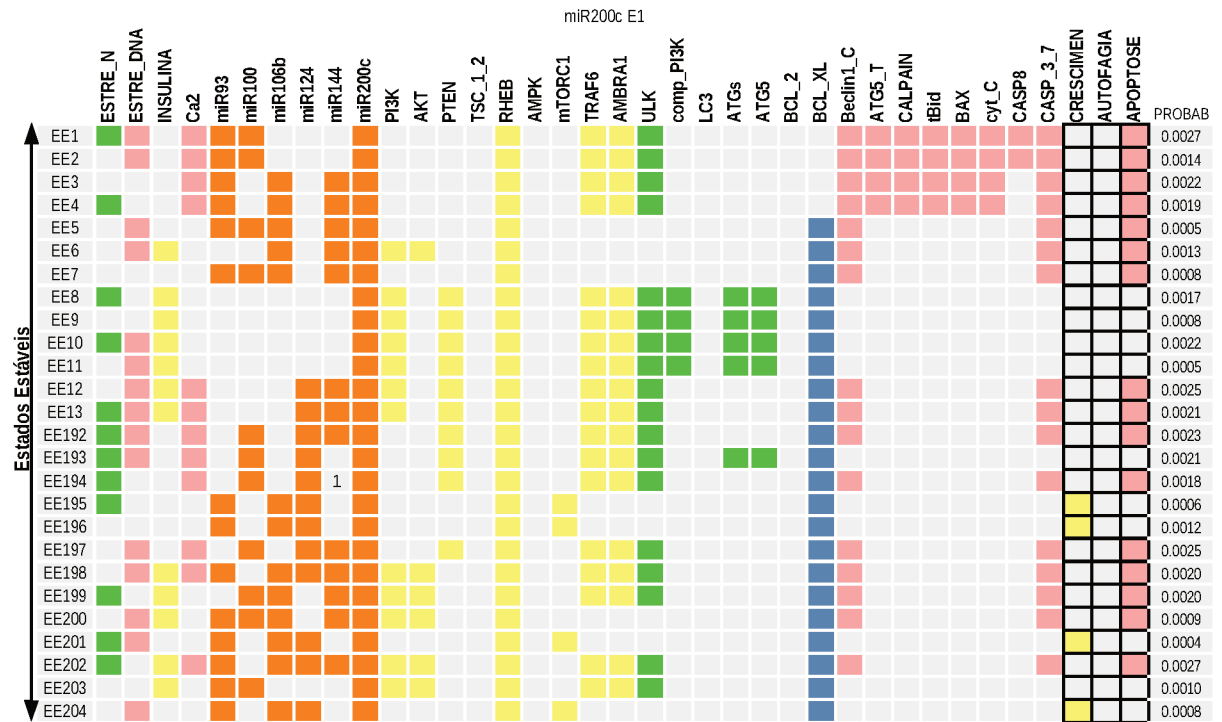
Fonte – A autora.

5.5.8 Atividade ectópica 1 do miR200c

Nesse caso, fizemos a atividade ectópica 1 do miR200c. A figura 34 apresenta alguns dos 672 estados estáveis para essa perturbação. Com isso, o modelo apresenta 384 estados estáveis que levam à ativação do *output* APOPTOSE, 64 estados estáveis que levam à ativação do *output* CRESCIMENTO e 224 estados estáveis que não ativam *outputs*. As probabilidades de acessibilidade somadas podem ser vistas na figura 35.

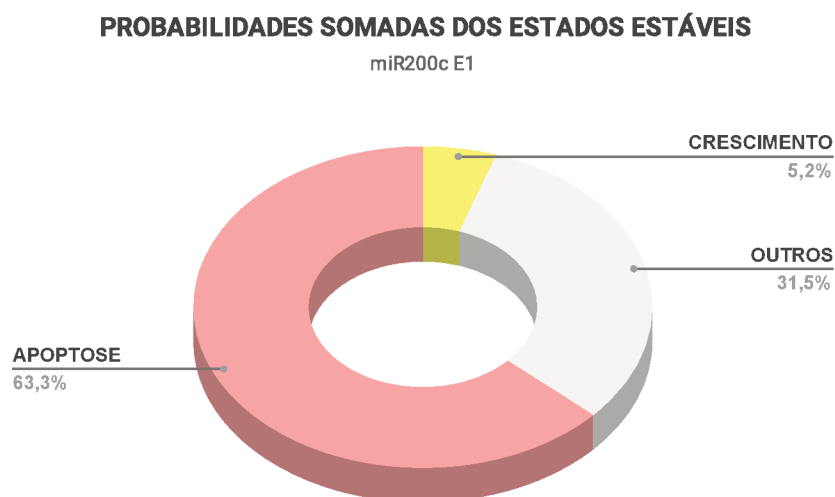
Como o miR200c inibe LC3, nenhum estado estável apresenta a ativação do *output* AUTOFAGIA. Além disso, miR200c inibe BCL_2, o que contribui na ativação da via de apoptose. Esse resultado também parece estar em acordo com os dados experimentais de que o miR200c reduziu o nível da proteína Bcl-2 e aumentou o nível de Bax e da Caspase-3, sensibilizando as células de câncer de pulmão à apoptose (ZHOU, G. *et al.*, 2017). Ainda, em linhagens celulares de câncer gástrico, a superexpressão do miR-200c aumentou a apoptose induzida por cisplatina das células (GHASABI *et al.*, 2019).

Figura 34 – Estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR200c. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

Figura 35 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para atividade ectópica 1 do miR200c. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; CRESCIMENTO representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



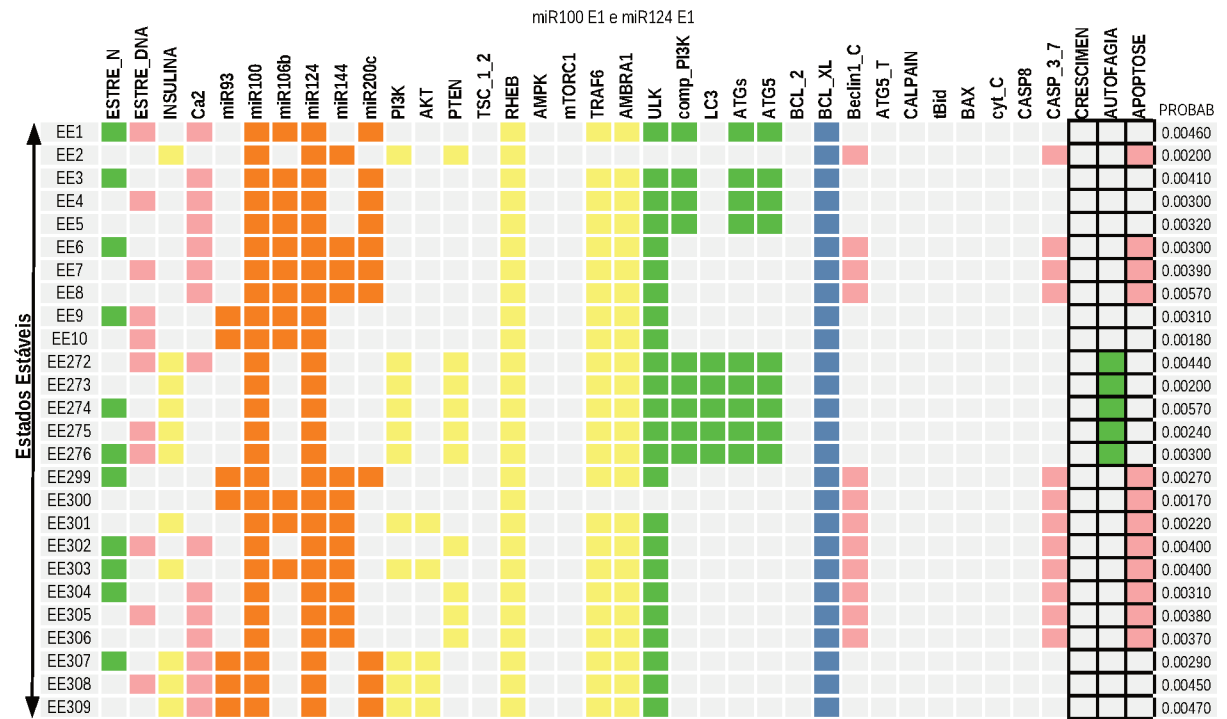
Fonte – A autora.

5.5.9 Atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124

Analisando as perturbações anteriores, os únicos casos que apresentaram a ativação da via de autofagia, exceto o caso do tipo selvagem, foram: o nocaute do miR93 e do miR106b, a atividade ectópica 1 do miR100 e a atividade ectópica 1 do miR124. Assim, decidimos fazer perturbações compostas desses casos, começando com a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. A figura 36 apresenta alguns dos 320 estados estáveis para essa perturbação. O modelo apresenta 160 estados estáveis que possuem a ativação do *output* APOPTOSE, 32 estados estáveis que levam à ativação do *output* AUTOFAGIA e 128 estados estáveis que não ativam *outputs*.

Como o miR100 inibe mTORC1, esta perturbação não apresenta a ativação do *output* CRESCIMENTO, já que experimentalmente, a superexpressão de miR100 leva à inibição da proliferação (GONG *et al.*, 2015) e suprime diretamente a expressão de mTOR.

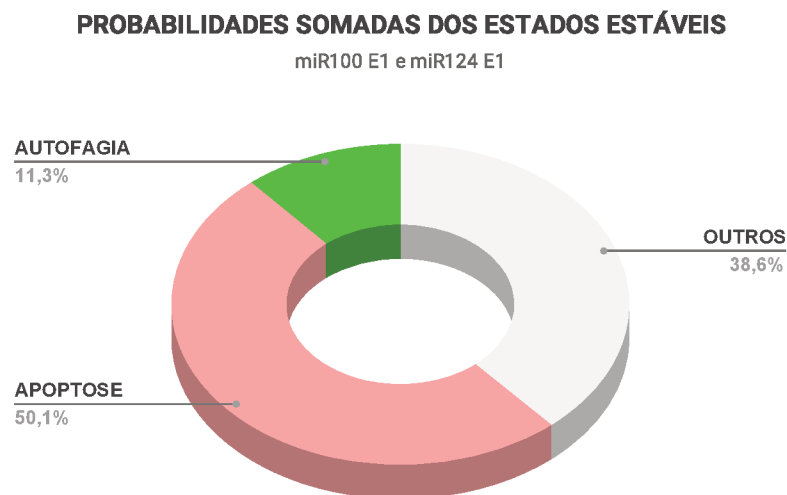
Figura 36 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

Apesar do miR100 e do miR124 não regularem diretamente a via de autofagia, podemos ver na figura 36 que a soma das probabilidades de acessibilidade que ativam o *output* AUTO-FAGIA é maior nesse caso do que em todos casos anteriores. Ainda, a soma das probabilidades de acessibilidade que ativam o *output* APOPTOSE também mantém-se alta neste caso. Esses resultados parecem concordar em parte com os dados experimentais de que o miR-100 reduz a proliferação das células, o que foi discutido na subseção 5.5.5, e de que o miR-124 inibe a proliferação de células de glioblastoma multiforme (SILBER *et al.*, 2008) e células de câncer gástrico (XIA *et al.*, 2012).

Figura 37 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.

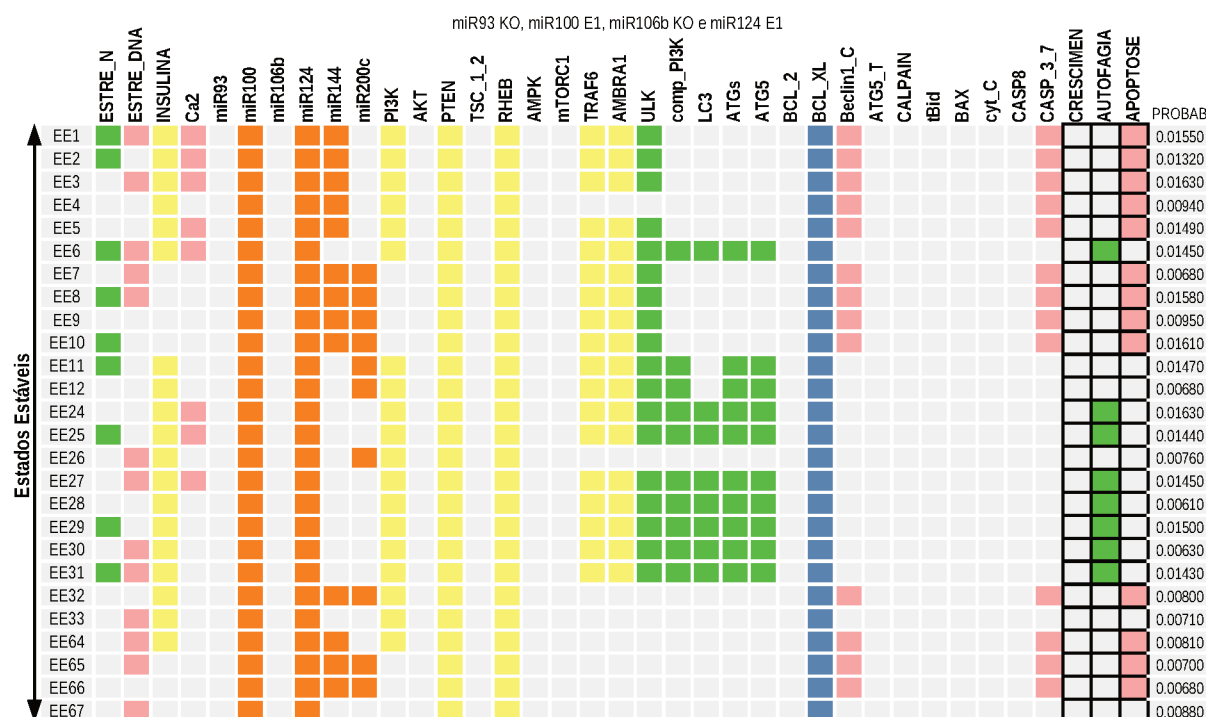


Fonte – A autora.

5.5.10 Nocaute do miR93 e do miR106b, atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124

A seguir, além da atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124, também fizemos o nocaute do miR93 e do miR106b. A figura 38 apresenta alguns dos estados estáveis para esse caso. Com essa perturbação, o modelo apresenta 80 estados estáveis, dos quais 40 levam à ativação do *output* APOPTOSE, 16 estados estáveis que levam à ativação do *output* AUTOFAGIA e 24 estados estáveis que não ativam *outputs*.

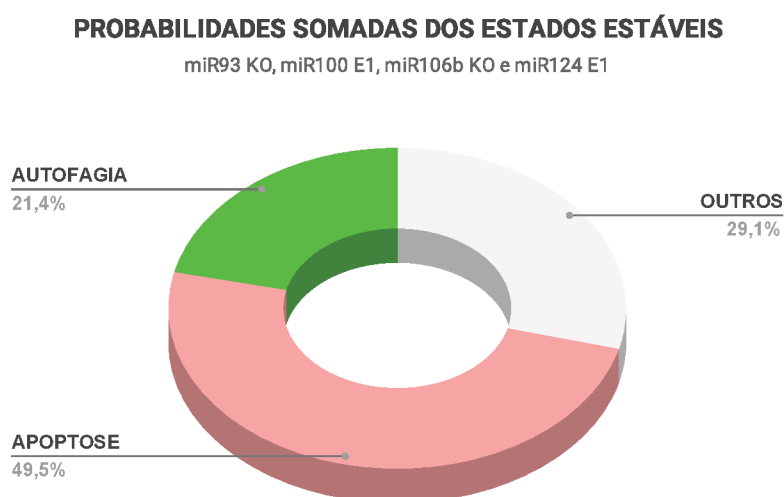
Figura 38 – Estados estáveis para o nocaute dos miR93 e miR106b, e atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

Podemos ver na figura 39 a soma das probabilidades de acessibilidade para os *outputs*. Além de termos a superexpressão do miR100 e do miR124, que aumentam as probabilidades de acessibilidade de autofagia, o nocaute do miR93 ajuda na possibilidade de ativação do comp_PI3K e subsequente ativação da via autofágica. Combinado à isso, o miR93 e o miR106b são conhecidos por inibirem a atividade autofágica em linhagens celulares de câncer de cólon (LU *et al.*, 2014). Logo, a soma das probabilidades de acessibilidade que ativam o *output* AUTOFAGIA é ainda maior para esta perturbação do que nos casos anteriores, atingindo o valor de 21,4%.

Figura 39 – Soma das probabilidades de acessibilidade dos estados estáveis para o nocaute do miR93 e do miR106b, e atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124. APOPTOSE representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* APOPTOSE; AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



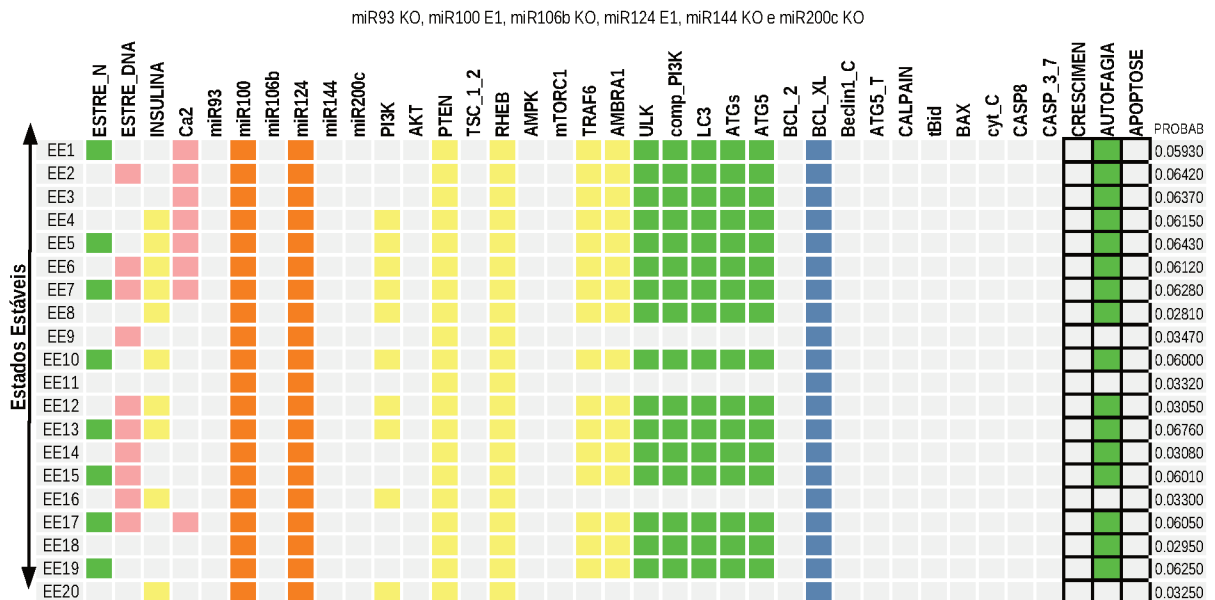
Fonte – A autora.

5.5.11 Atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124, nocaute dos miRNAs restantes

Seguindo com o mesmo padrão da perturbação anterior, além da atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124, e nocaute do miR93 e do miR106b, também fizemos o nocaute do miR144 e do miR200c. A figura 40 apresenta alguns dos estados estáveis para essa perturbação. Nesse caso, o modelo apresenta o total de 20 estados estáveis, dos quais 16 levam à ativação do *output* AUTOFAGIA, e 4 estados estáveis que não ativam *outputs*. Ou seja, dos estados estáveis que apresentam a ativação de *outputs*, todos ativam a via de autofagia. Essa é a única perturbação que leva o sistema a se comportar de tal maneira.

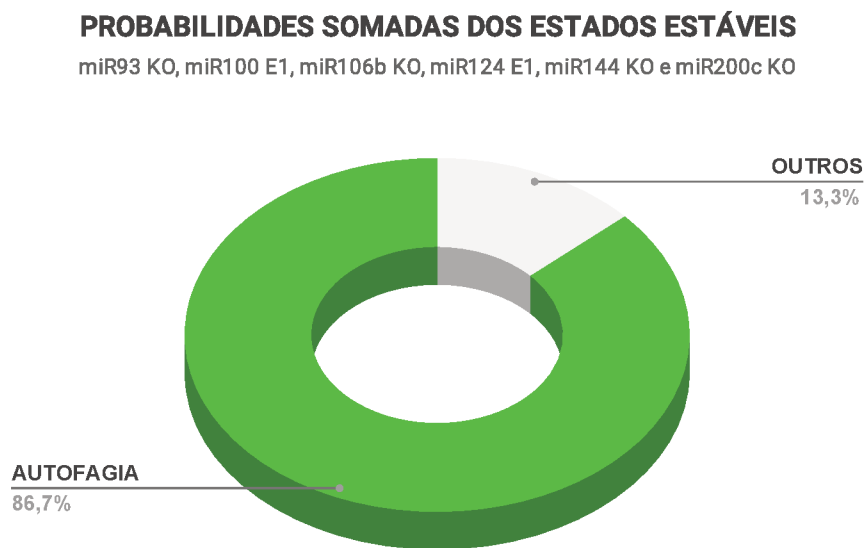
A soma das probabilidades de acessibilidade podem ser vistas na figura 41. Além da superexpressão do miR100 e do miR124, que aumentam as probabilidades de acessibilidade de autofagia e impede a ativação do *output* CRESCIMENTO, e do nocaute do miR93, que ajuda na possibilidade de ativação do comp_PI3K e subsequente ativação da via autofágica, temos o nocaute do miR144, que quando desativado não consegue regular as caspases 3 e 7. Ainda, o nocaute do miR200c impede a inibição de LC3. Combinado à isso, CALPAIN inibido pelo miR124 não consegue regular e inibir BCL_XL, que inibe as vias intrínseca e extrínseca de apoptose. Logo, essa perturbação ativa somente a via de autofagia.

Figura 40 – Estados estáveis para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124 e nocaute dos miRNAs restantes. Quadrados coloridos representam valor 1 da variável, e quadrados em cinza claro representam valor 0. Foram mantidas as cores de cada via de sinalização da rede regulatória. A última coluna à direita apresenta as probabilidades de acessibilidade de cada estado estável.



Fonte – A autora.

Figura 41 – Soma das probabilidades de cada estado estável para a atividade ectópica 1 do miR100 e do miR124 e nocaute dos miRNAs restantes. AUTOFAGIA representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que ativam o *output* AUTOFAGIA; OUTROS representa a soma das probabilidades de todos os estados estáveis que não ativam *outputs*.



Fonte – A autora.

5.5.12 Nocaute dos *inputs* ESTRESSE_DNA, ESTRESSE_N, INSULINA e Ca2

A seguir, decidimos realizar perturbações sem nenhum estímulo de ativação das vias de sinalização exceto o estímulo dos miRNAs, de tal modo a verificar se apenas o nocaute ou atividade ectópica dos miRNA é suficiente para ativar os *outputs* da rede. Assim, a tabela da figura 42 apresenta combinações de perturbações dos miRNAs com os nocautes do ESTRESSE_N, ESTRESSE_DNA, INSULINA e Ca2. Das somas das probabilidades dos estados estáveis que ativam o *output* CRESCIMENTO, as maiores taxas de ativação deste *output* acontecem com o nocaute do miR100, nocaute do miR144 e nocaute do miR200 e miR144. Dos resultados que ativam o *output* APOPTOSE, apenas o nocaute ou atividade ectópica 1 do miR144 parecem apresentar uma mudança significativa na soma de probabilidades em relação às outras perturbações. Em relação à ativação da via de sinalização de autofagia, a combinação da atividade ectópica 1 do miR100 com o nocaute do miR144 e do miR200c parece ser a perturbação mais eficiente em termos de quantidade de miRNA/soma de probabilidade de autofagia, visto que todas as outras perturbações que atingem uma soma de probabilidades maior que 27% apresentam mais de quatro combinações de miRNAs.

Deve-se observar que, apesar de o miR-124 inibir a via de apoptose, as duas perturbações 'miR124 E1' e 'miR124 KO' não apresentam diferença significativa na soma de probabilidades de apoptose. Isso acontece pois Calpain nunca é ativada, visto que Ca2 está sempre desligada. Assim, o miR-124 não chega a inibir Calpain, que já está desligada, e então o nocaute ou atividade ectópica do miR-124 não interfere na inibição da via de apoptose. Algo similar acontece na perturbação 'miR100 E1, miR93 KO, miR106b KO e miR144 KO'. Neste caso, o miR100 está sempre ligado e inibe BCL_2, o que deveria influenciar a soma de probabilidades de apoptose. Porém, como não há inibição de BCL-X_L, este sempre inibe a via de apoptose. Portanto, casos como esses podem ser considerados como limites que o modelo apresenta.

Logo, os resultados da tabela da figura 42, assim como os resultados das perturbações das seções anteriores, servem para nos mostrar quais combinações de miRNAs são mais prováveis de levarem à ativação dos *outputs* do sistema.

Figura 42 – Soma das probabilidades dos estados estáveis com perturbações dos miRNAs. 'Controle' refere-se à perturbação apenas com o nocaute do ESTRESSE_DNA, ESTRESSE_N, INSULINA e Ca2. Todos os outros casos possuem essa perturbação além das perturbações dos miRNAs.

Perturbação	Soma das probabilidades de Autofagia	Soma das probabilidades de Apoptose	Soma das probabilidades de Crescimento	Soma de outras probabilidades
Controle	3,2%	50,1%	12,7%	34,0%
miR93 KO e miR106b KO	7,2%	49,0%	13,2%	30,6%
miR100 E1	7,2%	49,2%	0	43,6%
miR100 KO	0	49,0%	25,8%	25,2%
miR124 E1	3,4%	50,3%	12,9%	33,4%
miR124 KO	3,3%	49,2%	12,8%	34,7%
miR144 E1	0	100%	0	0
miR144 KO	7,4%	0	24,8%	67,8%
miR200c E1	0	50,0%	12,6%	37,4%
miR200c KO	6,9%	49,9%	12,9%	30,3%
miR100 E1 e miR124 E1	7,0%	49,1%	0	43,9%
miR100 E1, miR124E1 e miR144 KO	13,9%	0	0	86,1%
miR100 E1 e miR144 KO	13,7%	0	0	86,3%
miR200c KO e miR144 KO	14,2%	0	25,7%	60,1%
miR100 E1 e miR200c KO	13,9%	49,8%	0	36,3%
miR100 E1, miR144 KO e miR200c KO	27,8%	0	0	72,2%
miR93 KO, miR106b KO e miR144 KO	14,2%	0	0	85,8%
miR100 E1, miR124E1, miR93 KO e miR106b KO	14,1%	50,3%	0	35,6%
miR100 E1, miR93 KO e miR106b KO	13,6%	50,0%	0	36,4%
miR100 E1, miR124E1, miR93 KO, miR106b KO e miR144 KO	27,1%	0	0	72,9%
miR100 E1, miR93 KO, miR106b KO e miR144 KO	28,0%	0	0	72,0%
miR100 E1, miR124E1, miR93 KO, miR106b KO e miR144 KO, miR200c KO	55,3%	0	0	44,7%
miR100 E1, miR93 KO, miR106b KO, miR144 KO e miR200c KO	55,7%	0	0	44,3%

6 MODELO CONTÍNUO

A transformação do modelo lógico apresentado no capítulo anterior foi feita no CellNetAnalyzer (CNA), que é um *toolbox* do MATLAB para explorar propriedades funcionais de redes regulatórias (KLAMT; KAMP, 2011). As versões utilizadas foram CNA 2020.2 (disponível em cna.html) e MATLAB R2018b. Assim, importamos o modelo lógico do GINsim para o CNA, e dentro do CNA utilizamos o Odefy (KRUMSIEK *et al.*, 2010) para fazer a transformação e simulação do modelo contínuo. Isto resultou no modelo contínuo composto pelo sistema de EDOs apresentado abaixo. O modelo possui 37 equações, sendo uma equação para cada variável. Há 159 parâmetros, sendo 37 tempos de vida, 61 parâmetros n e 61 parâmetros k . Por causa da estrutura das equações para as variáveis do tipo *input*, os parâmetros de vida destes não aparecem nas equações, por isso visualizamos apenas 27 tempos de vida. Todos os parâmetros podem ser vistos nos quadros 7 e 8. Assim, o sistema de EDOs do modelo é o seguinte:

$$\frac{d}{dt}[ESTRESSE_N] = 0 \quad (18)$$

$$\frac{d}{dt}[ESTRESSE_DNA] = 0 \quad (19)$$

$$\frac{d}{dt}[INSULINA] = 0 \quad (20)$$

$$\frac{d}{dt}[Ca2] = 0 \quad (21)$$

$$\frac{d}{dt}[miR93] = 0 \quad (22)$$

$$\frac{d}{dt}[miR100] = 0 \quad (23)$$

$$\frac{d}{dt}[miR106b] = 0 \quad (24)$$

$$\frac{d}{dt}[miR124] = 0 \quad (25)$$

$$\frac{d}{dt}[miR144] = 0 \quad (26)$$

$$\frac{d}{dt}[miR200c] = 0 \quad (27)$$

$$\frac{d[PI3K]}{dt} = \frac{1}{\tau_{73}} \left\{ \left(\frac{[INSULINA]^{n_{74}}}{([INSULINA]^{n_{74}} + k_{75}^{n_{74}})} \cdot (1 + k_{75}^{n_{74}}) \right) - [PI3K] \right\} \quad (28)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[AKT]}{dt} = \frac{1}{\tau_{68}} \left\{ \left(\frac{[PI3K]^{n_{69}}}{([PI3K]^{n_{69}} + k_{70}^{n_{69}})} \cdot (1 + k_{70}^{n_{69}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[PTEN]^{n_{71}}}{([PTEN]^{n_{71}} + k_{72}^{n_{71}})} \cdot (1 + k_{72}^{n_{71}}) \right) \right. \\ \left. - [AKT] \right\} \quad (29) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[PTEN]}{dt} = \frac{1}{\tau_{117}} \left\{ \left(1 - \frac{[miR93]^{n_{118}}}{([miR93]^{n_{118}} + k_{119}^{n_{118}})} \cdot (1 + k_{119}^{n_{118}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[miR106b]^{n_{120}}}{([miR106b]^{n_{120}} + k_{121}^{n_{120}})} \right. \right. \\ \left. \left. \cdot (1 + k_{121}^{n_{120}}) \right) - [PTEN] \right\} \quad (30) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[TSC_1_2]}{dt} = \frac{1}{\tau_{57}} \left\{ \left(\frac{[AMPK]^{n_{58}}}{([AMPK]^{n_{58}} + k_{59}^{n_{58}})} \cdot (1 + k_{59}^{n_{58}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[AKT]^{n_{60}}}{([AKT]^{n_{60}} + k_{61}^{n_{60}})} \cdot (1 + k_{61}^{n_{60}}) \right) \right. \\ \left. - [TSC_1_2] \right\} \quad (31) \end{aligned}$$

$$\frac{d[RHEB]}{dt} = \frac{1}{\tau_{54}} \left\{ \left(1 - \frac{[TSC_1_2]^{n_{55}}}{([TSC_1_2]^{n_{55}} + k_{56}^{n_{55}})} \cdot (1 + k_{56}^{n_{55}}) \right) - [RHEB] \right\} \quad (32)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[AMPK]}{dt} = \frac{1}{\tau_{49}} \left\{ \left(\frac{[Ca2]^{n_{50}}}{([Ca2]^{n_{50}} + k_{51}^{n_{50}})} \cdot (1 + k_{51}^{n_{50}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[ULK]^{n_{52}}}{([ULK]^{n_{52}} + k_{53}^{n_{52}})} \cdot (1 + k_{53}^{n_{52}}) \right) \right. \\ \left. - [AMPK] \right\} \quad (33) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[mTORC1]}{dt} = \frac{1}{\tau_6} \left\{ \left(1 - \frac{[miR100]^{n_7}}{([miR100]^{n_7} + k_8^{n_7})} \cdot (1 + k_8^{n_7}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[miR144]^{n_9}}{([miR144]^{n_9} + k_{10}^{n_9})} \cdot (1 + k_{10}^{n_9}) \right) \right. \\ \cdot \left(1 - \frac{[ULK]^{n_{11}}}{([ULK]^{n_{11}} + k_{12}^{n_{11}})} \cdot (1 + k_{12}^{n_{11}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[AMPK]^{n_{13}}}{([AMPK]^{n_{13}} + k_{14}^{n_{13}})} \cdot (1 + k_{14}^{n_{13}}) \right) \\ \left. \cdot \left(\frac{[RHEB]^{n_{15}}}{([RHEB]^{n_{15}} + k_{16}^{n_{15}})} \cdot (1 + k_{16}^{n_{15}}) \right) - [mTORC1] \right\} \quad (34) \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}[\text{TRAF6}] = \frac{1}{\tau_{62}} \left\{ \left(\frac{[\text{AMBRA1}]^{n_{63}}}{([\text{AMBRA1}]^{n_{63}} + k_{64}^{n_{63}})} \cdot (1 + k_{64}^{n_{63}}) \right) - [\text{TRAF6}] \right\} \quad (35)$$

$$\frac{d}{dt}[\text{AMBRA1}] = \frac{1}{\tau_{65}} \left\{ \left(\frac{[\text{ULK}]^{n_{66}}}{([\text{ULK}]^{n_{66}} + k_{67}^{n_{66}})} \cdot (1 + k_{67}^{n_{66}}) \right) - [\text{AMBRA1}] \right\} \quad (36)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[\text{ULK}] = & \frac{1}{\tau_{17}} \left\{ \left[\left(\frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \right) \right. \right. \\ & \cdot (1 + k_{19}^{n_{20}}) \left. \right] \cdot \left(1 - \frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \right. \\ & \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \left. \right) \left. \right] + \left[\left(1 - \frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \cdot (1 + k_{21}^{n_{20}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(1 - \frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \right) \left. \right] + \left[\left(\frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \right) \right. \\ & \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \left. \right] \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \cdot (1 + k_{21}^{n_{20}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \right. \\ & \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \left. \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \right) \left. \right] \\ & + \left[\left(1 - \frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \right) \right. \\ & \cdot (1 + k_{21}^{n_{20}}) \left. \right] \cdot \left(1 - \frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \right. \\ & \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \left. \right) \left. \right] + \left[\left(\frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \cdot (1 + k_{21}^{n_{20}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(\frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \right) \left. \right] + \left[\left(1 - \frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \right) \right. \\ & \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \left. \right] \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \cdot (1 + k_{21}^{n_{20}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \right. \\ & \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \left. \right) \cdot \left(\frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \right) \left. \right] + \left[\left(\frac{[\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}}}{([\text{ESTRESSE_N}]^{n_{18}} + k_{19}^{n_{18}})} \right) \right. \\ & \cdot (1 + k_{19}^{n_{18}}) \left. \right] \cdot \left(1 - \frac{[\text{mTORC1}]^{n_{20}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{20}} + k_{21}^{n_{20}})} \cdot (1 + k_{21}^{n_{20}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{AMPK}]^{n_{22}}}{([\text{AMPK}]^{n_{22}} + k_{23}^{n_{22}})} \right. \\ & \cdot (1 + k_{23}^{n_{22}}) \left. \right) \cdot \left(\frac{[\text{TRAF6}]^{n_{24}}}{([\text{TRAF6}]^{n_{24}} + k_{25}^{n_{24}})} \cdot (1 + k_{25}^{n_{24}}) \right) \left. \right] - [\text{ULK}] \left. \right\} \quad (37) \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}[BCL_2] = \frac{1}{\tau_{39}} \left\{ \left(1 - \frac{[miR100]^{n_{40}}}{([miR100]^{n_{40}} + k_{41}^{n_{40}})} \cdot (1 + k_{41}^{n_{40}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[miR200c]^{n_{42}}}{([miR200c]^{n_{42}} + k_{43}^{n_{42}})} \cdot (1 + k_{43}^{n_{42}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[CALPAIN]^{n_{44}}}{([CALPAIN]^{n_{44}} + k_{45}^{n_{44}})} \cdot (1 + k_{45}^{n_{44}}) \right) - [BCL_2] \right\} \quad (38)$$

$$\frac{d}{dt}[BCL_XL] = \frac{1}{\tau_{46}} \left\{ \left(1 - \frac{[CALPAIN]^{n_{47}}}{([CALPAIN]^{n_{47}} + k_{48}^{n_{47}})} \cdot (1 + k_{48}^{n_{47}}) \right) - [BCL_XL] \right\} \quad (39)$$

$$\begin{aligned}
 & \cdot \left(\frac{[AMBRA1]^{n_{35}}}{([AMBRA1]^{n_{35}} + k_{36}^{n_{35}})} \cdot (1 + k_{36}^{n_{35}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[Beclin1_C]^{n_{37}}}{([Beclin1_C]^{n_{37}} + k_{38}^{n_{37}})} \cdot (1 + k_{38}^{n_{37}}) \right) \\
 & + \left[\left(1 - \frac{[miR93]^{n_{27}}}{([miR93]^{n_{27}} + k_{28}^{n_{27}})} \cdot (1 + k_{28}^{n_{27}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[ULK]^{n_{29}}}{([ULK]^{n_{29}} + k_{30}^{n_{29}})} \cdot (1 + k_{30}^{n_{29}}) \right) \right. \\
 & \cdot \left(1 - \frac{[BCL_2]^{n_{31}}}{([BCL_2]^{n_{31}} + k_{32}^{n_{31}})} \cdot (1 + k_{32}^{n_{31}}) \right) \cdot \left(\frac{[BCL_XL]^{n_{33}}}{([BCL_XL]^{n_{33}} + k_{34}^{n_{33}})} \cdot (1 + k_{34}^{n_{33}}) \right) \\
 & \cdot \left. \left(\frac{[AMBRA1]^{n_{35}}}{([AMBRA1]^{n_{35}} + k_{36}^{n_{35}})} \cdot (1 + k_{36}^{n_{35}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[Beclin1_C]^{n_{37}}}{([Beclin1_C]^{n_{37}} + k_{38}^{n_{37}})} \cdot (1 + k_{38}^{n_{37}}) \right) \right] \\
 & + \left[\left(1 - \frac{[miR93]^{n_{27}}}{([miR93]^{n_{27}} + k_{28}^{n_{27}})} \cdot (1 + k_{28}^{n_{27}}) \right) \cdot \left(\frac{[ULK]^{n_{29}}}{([ULK]^{n_{29}} + k_{30}^{n_{29}})} \cdot (1 + k_{30}^{n_{29}}) \right) \right. \\
 & \cdot \left(1 - \frac{[BCL_2]^{n_{31}}}{([BCL_2]^{n_{31}} + k_{32}^{n_{31}})} \cdot (1 + k_{32}^{n_{31}}) \right) \cdot \left(\frac{[BCL_XL]^{n_{33}}}{([BCL_XL]^{n_{33}} + k_{34}^{n_{33}})} \cdot (1 + k_{34}^{n_{33}}) \right) \\
 & \cdot \left. \left(\frac{[AMBRA1]^{n_{35}}}{([AMBRA1]^{n_{35}} + k_{36}^{n_{35}})} \cdot (1 + k_{36}^{n_{35}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[Beclin1_C]^{n_{37}}}{([Beclin1_C]^{n_{37}} + k_{38}^{n_{37}})} \cdot (1 + k_{38}^{n_{37}}) \right) \right] \\
 & - [comp_PI3K] \} \tag{40}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{dt}[LC3] = \frac{1}{\tau_{112}} \left\{ \left(1 - \frac{[miR200c]^{n_{113}}}{([miR200c]^{n_{113}} + k_{114}^{n_{113}})} \cdot (1 + k_{114}^{n_{113}}) \right) \cdot \left(\frac{[comp_PI3K]^{n_{115}}}{([comp_PI3K]^{n_{115}} + k_{116}^{n_{115}})} \right. \right. \\
 \left. \left. \cdot (1 + k_{116}^{n_{115}}) \right) - [LC3] \right\} \tag{41}
 \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}[ATGS] = \frac{1}{\tau_{109}} \left\{ \left(\frac{[comp_PI3K]^{n_{110}}}{([comp_PI3K]^{n_{110}} + k_{111}^{n_{110}})} \cdot (1 + k_{111}^{n_{110}}) \right) - [ATGS] \right\} \tag{42}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{dt}[ATG5] = \frac{1}{\tau_{104}} \left\{ \left(\frac{[comp_PI3K]^{n_{105}}}{([comp_PI3K]^{n_{105}} + k_{106}^{n_{105}})} \cdot (1 + k_{106}^{n_{105}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[ATG5_T]^{n_{107}}}{([ATG5_T]^{n_{107}} + k_{108}^{n_{107}})} \right. \right. \\
 \left. \left. \cdot (1 + k_{108}^{n_{107}}) \right) - [ATG5] \right\} \tag{43}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{dt}[Beclin1_C] = \frac{1}{\tau_{81}} \left\{ \left(\frac{[CASP8]^{n_{82}}}{([CASP8]^{n_{82}} + k_{83}^{n_{82}})} \cdot (1 + k_{83}^{n_{82}}) \right) \cdot \left(\frac{[CASP_3_7]^{n_{84}}}{([CASP_3_7]^{n_{84}} + k_{85}^{n_{84}})} \cdot (1 + k_{85}^{n_{84}}) \right) \right. \\
 + \left(1 - \frac{[CASP8]^{n_{82}}}{([CASP8]^{n_{82}} + k_{83}^{n_{82}})} \cdot (1 + k_{83}^{n_{82}}) \right) \cdot \left(\frac{[CASP_3_7]^{n_{84}}}{([CASP_3_7]^{n_{84}} + k_{85}^{n_{84}})} \cdot (1 + k_{85}^{n_{84}}) \right) \\
 + \left(\frac{[CASP8]^{n_{82}}}{([CASP8]^{n_{82}} + k_{83}^{n_{82}})} \cdot (1 + k_{83}^{n_{82}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[CASP_3_7]^{n_{84}}}{([CASP_3_7]^{n_{84}} + k_{85}^{n_{84}})} \cdot (1 + k_{85}^{n_{84}}) \right) \\
 \left. - [Beclin1_C] \right\} \tag{44}
 \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}[ATG5_T] = \frac{1}{\tau_{122}} \left\{ \left(\frac{[CALPAIN]^{n_{123}}}{([CALPAIN]^{n_{123}} + k_{124}^{n_{123}})} \cdot (1 + k_{124}^{n_{123}}) \right) - [ATG5_T] \right\} \quad (45)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[CALPAIN] = \frac{1}{\tau_1} \left\{ \left(\frac{[Ca2]^{n_2}}{([Ca2]^{n_2} + k_3^{n_2})} \cdot (1 + k_3^{n_2}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[miR124]^{n_4}}{([miR124]^{n_4} + k_5^{n_4})} \cdot (1 + k_5^{n_4}) \right) \right. \\ \left. - [CALPAIN] \right\} \end{aligned} \quad (46)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[tBid] = \frac{1}{\tau_{132}} \left\{ \left(\frac{[CALPAIN]^{n_{133}}}{([CALPAIN]^{n_{133}} + k_{134}^{n_{133}})} \cdot (1 + k_{134}^{n_{133}}) \right) \cdot \left(\frac{[CASP8]^{n_{135}}}{([CASP8]^{n_{135}} + k_{136}^{n_{135}})} \cdot (1 + k_{136}^{n_{135}}) \right) \right. \\ + \left(1 - \frac{[CALPAIN]^{n_{133}}}{([CALPAIN]^{n_{133}} + k_{134}^{n_{133}})} \cdot (1 + k_{134}^{n_{133}}) \right) \cdot \left(\frac{[CASP8]^{n_{135}}}{([CASP8]^{n_{135}} + k_{136}^{n_{135}})} \cdot (1 + k_{136}^{n_{135}}) \right) \\ + \left(\frac{[CALPAIN]^{n_{133}}}{([CALPAIN]^{n_{133}} + k_{134}^{n_{133}})} \cdot (1 + k_{134}^{n_{133}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[CASP8]^{n_{135}}}{([CASP8]^{n_{135}} + k_{136}^{n_{135}})} \cdot (1 + k_{136}^{n_{135}}) \right) \\ \left. - [tBid] \right\} \end{aligned} \quad (47)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[BAX] = \frac{1}{\tau_{125}} \left\{ \left(1 - \frac{[BCL_2]^{n_{126}}}{([BCL_2]^{n_{126}} + k_{127}^{n_{126}})} \cdot (1 + k_{127}^{n_{126}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[BCL_XL]^{n_{128}}}{([BCL_XL]^{n_{128}} + k_{129}^{n_{128}})} \right. \right. \\ \left. \cdot (1 + k_{129}^{n_{128}}) \right) \cdot \left(\frac{[tBid]^{n_{130}}}{([tBid]^{n_{130}} + k_{131}^{n_{130}})} \cdot (1 + k_{131}^{n_{130}}) \right) - [BAX] \left. \right\} \end{aligned} \quad (48)$$

$$\frac{d}{dt}[\text{CASP8}] = \frac{1}{\tau_{76}} \left\{ \left(\frac{[\text{ESTRESSE_DNA}]^{n_{77}}}{([\text{ESTRESSE_DNA}]^{n_{77}} + k_{78}^{n_{77}})} \cdot (1 + k_{78}^{n_{77}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{BCL_XL}]^{n_{79}}}{([\text{BCL_XL}]^{n_{79}} + k_{80}^{n_{79}})} \right) \cdot (1 + k_{80}^{n_{79}}) \right\} - [\text{CASP8}] \quad (50)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[\text{CASP_3_7}] = & \frac{1}{\tau_{97}} \left\{ \left[\left(\frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \right. \right. \\ & \cdot \left(1 - \frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \left. \right] + \left[\left(1 - \frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(\frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \left. \right] \\ & + \left[\left(\frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(1 - \frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \left. \right] + \left[\left(1 - \frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(1 - \frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \left. \right] \\ & + \left[\left(\frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \cdot \left(1 - \frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(\frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \left. \right] + \left[\left(1 - \frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \right. \\ & \cdot \left(\frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \left. \right] \\ & + \left[\left(\frac{[\text{miR144}]^{n_{98}}}{([\text{miR144}]^{n_{98}} + k_{99}^{n_{98}})} \cdot (1 + k_{99}^{n_{98}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{CASP8}]^{n_{100}}}{([\text{CASP8}]^{n_{100}} + k_{101}^{n_{100}})} \cdot (1 + k_{101}^{n_{100}}) \right) \right. \\ & \cdot \left. \left. \left(\frac{[\text{cyt_C}]^{n_{102}}}{([\text{cyt_C}]^{n_{102}} + k_{103}^{n_{102}})} \cdot (1 + k_{103}^{n_{102}}) \right) \right] - [\text{CASP_3_7}] \right\} \quad (51) \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}[\text{CRESCIMENTO}] = \frac{1}{\tau_{140}} \left\{ \left(\frac{[\text{mTORC1}]^{n_{141}}}{([\text{mTORC1}]^{n_{141}} + k_{142}^{n_{141}})} \cdot (1 + k_{142}^{n_{141}}) \right) - [\text{CRESCIMENTO}] \right\} \quad (52)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[\text{AUTOFAGIA}] = & \frac{1}{\tau_{143}} \left\{ \left(\frac{[\text{ATG5}]^{n_{144}}}{([\text{ATG5}]^{n_{144}} + k_{145}^{n_{144}})} \cdot (1 + k_{145}^{n_{144}}) \right) \cdot \left(\frac{[\text{ATGS}]^{n_{146}}}{([\text{ATGS}]^{n_{146}} + k_{147}^{n_{146}})} \cdot (1 + k_{147}^{n_{146}}) \right) \right. \\ & \cdot \left. \left(\frac{[\text{LC3}]^{n_{148}}}{([\text{LC3}]^{n_{148}} + k_{149}^{n_{148}})} \cdot (1 + k_{149}^{n_{148}}) \right) - [\text{AUTOFAGIA}] \right\} \quad (53) \end{aligned}$$

$$\frac{d}{dt}[\text{APOPTOSE}] = \frac{1}{\tau_{137}} \left\{ \left(\frac{[\text{CASP_3_7}]^{n_{138}}}{([\text{CASP_3_7}]^{n_{138}} + k_{139}^{n_{138}})} \cdot (1 + k_{139}^{n_{138}}) \right) - [\text{APOPTOSE}] \right\} \quad (54)$$

Quadro 7 – Parâmetros de cada interação do modelo.

Parâmetros	Interação	Parâmetros	Interação
n_2 e k_3	Ca2 em CALPAIN	n_{77} e k_{78}	ESTRESSE_DNA em CASP8
n_4 e k_5	miR124 em CALPAIN	n_{79} e k_{80}	BCL_XL em CASP8
n_7 e k_8	miR100 em mTORC1	n_{82} e k_{83}	CASP8 em Beclin1_C
n_9 e k_{10}	miR144 em mTORC1	n_{84} e k_{85}	CASP_3_7 em Beclin1_C
n_{11} e k_{12}	ULK em mTORC1	n_{87} e k_{88}	BCL_2 em cyt_C
n_{13} e k_{14}	AMPK em mTORC1	n_{89} e k_{90}	BCL_XL em cyt_C
n_{15} e k_{16}	RHEB em mTORC1	n_{91} e k_{92}	Beclin1_C em cyt_C
n_{18} e k_{19}	ESTRESSE_N em ULK	n_{93} e k_{94}	ATG5_T em cyt_C
n_{20} e k_{21}	mTORC1 em ULK	n_{95} e k_{96}	BAX em cyt_C
n_{22} e k_{23}	AMPK em ULK	n_{98} e k_{99}	miR144 em CASP_3_7
n_{24} e k_{25}	TRAF6 em ULK	n_{100} e k_{101}	CASP8 em CASP_3_7
n_{27} e k_{28}	miR93 em comp_PI3K	n_{102} e k_{103}	cyt_C em CASP_3_7
n_{29} e k_{30}	ULK em comp_PI3K	n_{105} e k_{106}	comp_PI3K em ATG5
n_{31} e k_{32}	BCL_2 em comp_PI3K	n_{107} e k_{108}	ATG5_T em ATG5
n_{33} e k_{34}	BCL_XL em comp_PI3K	n_{110} e k_{111}	comp_PI3K em ATGS
n_{35} e k_{36}	AMBRA1 em comp_PI3K	n_{113} e k_{114}	miR200c em LC3
n_{37} e k_{38}	Beclin1_C em comp_PI3K	n_{115} e k_{116}	comp_PI3K em LC3
n_{40} e k_{41}	miR100 em BCL_2	n_{118} e k_{119}	miR93 em PTEN
n_{42} e k_{43}	miR200c em BCL_2	n_{120} e k_{121}	miR106b em PTEN
n_{44} e k_{45}	CALPAIN em BCL_2	n_{123} e k_{124}	CALPAIN em ATG5_T
n_{47} e k_{48}	CALPAIN em BCL_XL	n_{126} e k_{127}	BCL_2 em BAX
n_{50} e k_{51}	Ca2 em AMPK	n_{128} e k_{129}	BCL_XL em BAX
n_{52} e k_{53}	ULK em AMPK	n_{130} e k_{131}	tBid em BAX
n_{55} e k_{56}	TSC_1_2 em RHEB	n_{133} e k_{134}	CALPAIN em tBid
n_{58} e k_{59}	AMPK em TSC_1_2	n_{135} e k_{136}	CASP8 em tBid
n_{60} e k_{61}	AKT em TSC_1_2	n_{138} e k_{139}	CASP_3_7 em APOPTOSE
n_{63} e k_{64}	AMBRA1 em TRAF6	n_{141} e k_{142}	mTORC1 em CRESCIMENTO
n_{66} e k_{67}	ULK em AMBRA1	n_{144} e k_{145}	ATG5 em AUTOFAGIA
n_{69} e k_{70}	PI3K em AKT	n_{146} e k_{147}	ATGS em AUTOFAGIA
n_{71} e k_{72}	PTEN em AKT	n_{148} e k_{149}	LC3 em AUTOFAGIA
n_{74} e k_{75}	INSULINA em PI3K		

Fonte – A autora.

Quadro 8 – Tempos de vida das variáveis do modelo.

Tempo de Vida	Variável	Tempo de Vida	Variável	Tempo de Vida	Variável
τ_1	<i>CALPAIN</i>	τ_{62}	<i>TRAF6</i>	τ_{109}	<i>ATGS</i>
τ_6	<i>mTORC1</i>	τ_{65}	<i>AMBRA1</i>	τ_{112}	<i>LC3</i>
τ_{17}	<i>ULK</i>	τ_{68}	<i>AKT</i>	τ_{117}	<i>PTEN</i>
τ_{26}	<i>comp_PI3K</i>	τ_{73}	<i>PI3K</i>	τ_{122}	<i>ATG5_T</i>
τ_{39}	<i>BCL_2</i>	τ_{76}	<i>CASP8</i>	τ_{125}	<i>BAX</i>
τ_{46}	<i>BCL_XL</i>	τ_{81}	<i>Beclin1_C</i>	τ_{132}	<i>tBid</i>
τ_{49}	<i>AMPK</i>	τ_{86}	<i>cyt_C</i>	τ_{137}	<i>APOPTOSE</i>
τ_{54}	<i>RHEB</i>	τ_{97}	<i>CASP_3_7</i>	τ_{140}	<i>CRESCIMENTO</i>
τ_{57}	<i>TSC_1_2</i>	τ_{104}	<i>ATG5</i>	τ_{143}	<i>AUTOFAGIA</i>

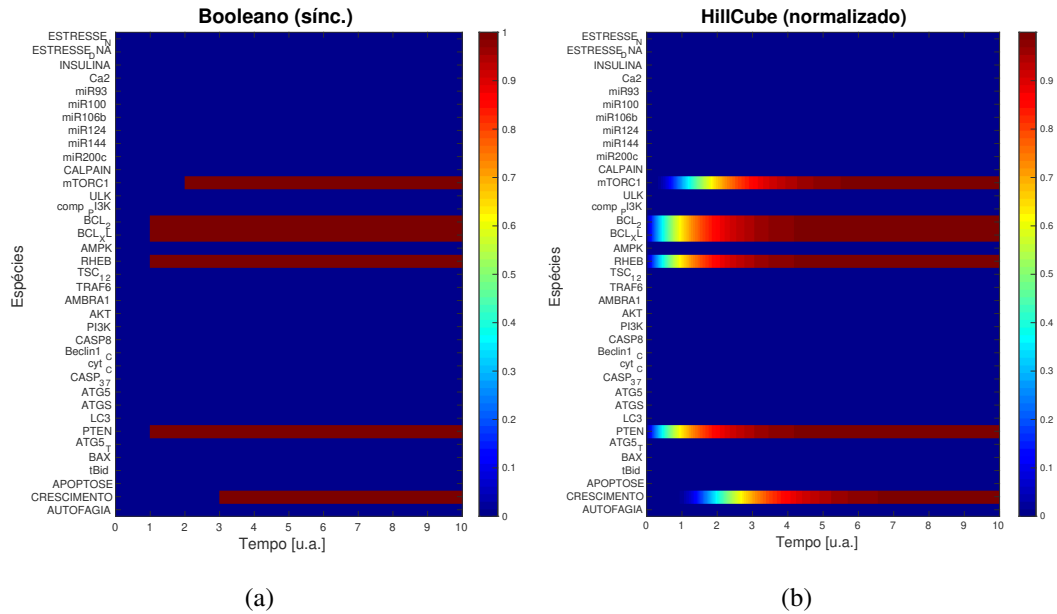
Fonte – A autora.

6.1 COMPARAÇÃO DE ESTADOS ESTÁVEIS COM O MODELO LÓGICO

Primeiramente decidimos comparar simulações entre os modelos lógico e contínuo para checar a convergência de estabilidade dos modelos. Assim, as figuras 43, 44 e 45 apresentam os resultados das simulações do modelo booleano e do modelo contínuo, cada caso com um estado inicial diferente. Nas simulações do modelo contínuo, todas as variáveis utilizaram os mesmos valores (padrão no CNA) para os parâmetros: $n = 3$, $\tau = 1$ e $k = 0.5$. A figura 43(a) apresenta o resultado da simulação do modelo booleano com estado inicial em que todas as variáveis têm valor zero. Como nenhum *input* está ativado e não há dano no DNA, essa simulação leva à ativação do *output* CRESCIMENTO. Como podemos observar na figura 43(b), o modelo contínuo também leva ao mesmo estado estável, com a ativação das variáveis acontecendo no mesmo intervalo de tempo do modelo booleano.

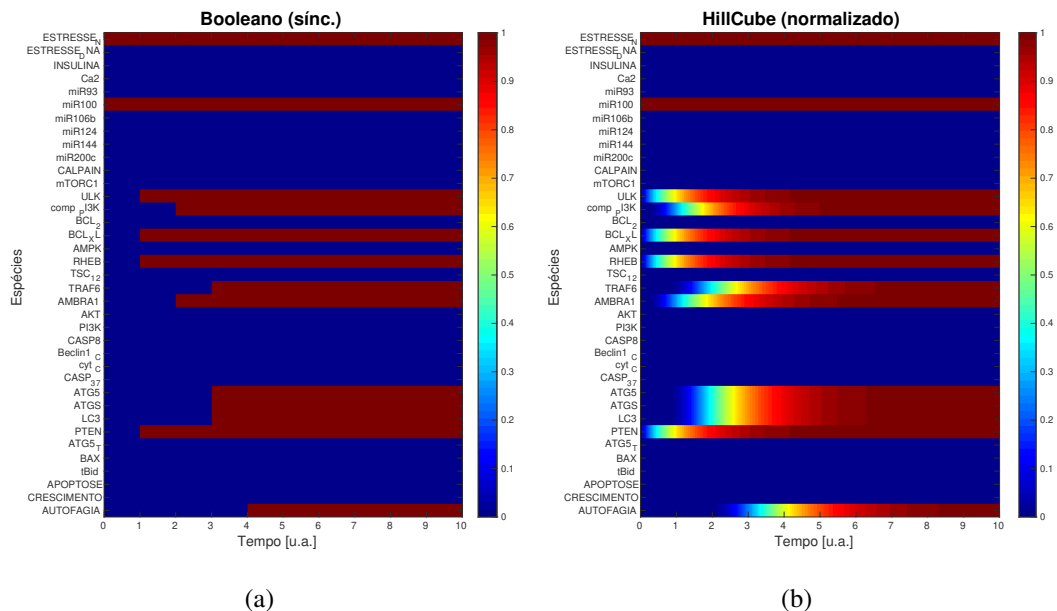
A figura 44(a) apresenta o resultado da simulação do modelo booleano com estado inicial em que o miR100 e ESTRESSE_N estão ligados, e todas as outras variáveis estão desligadas. Como o ESTRESSE_N ativa a via de autofagia e o miR100 inibe mTORC1, essa simulação leva à ativação do *output* AUTOFAGIA. Como podemos observar na figura 44(b), o modelo contínuo também leva ao mesmo estado estável, com a ativação das variáveis acontecendo no mesmo intervalo de tempo do modelo booleano.

Figura 43 – Resultado das simulações dos modelos booleano e contínuo. No estado inicial escolhido todas as variáveis têm valor zero. Cada linha horizontal representa a ativação/desativação das variáveis. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. (a) Simulação do modelo booleano. (b) Simulação do modelo contínuo.



Fonte – A autora.

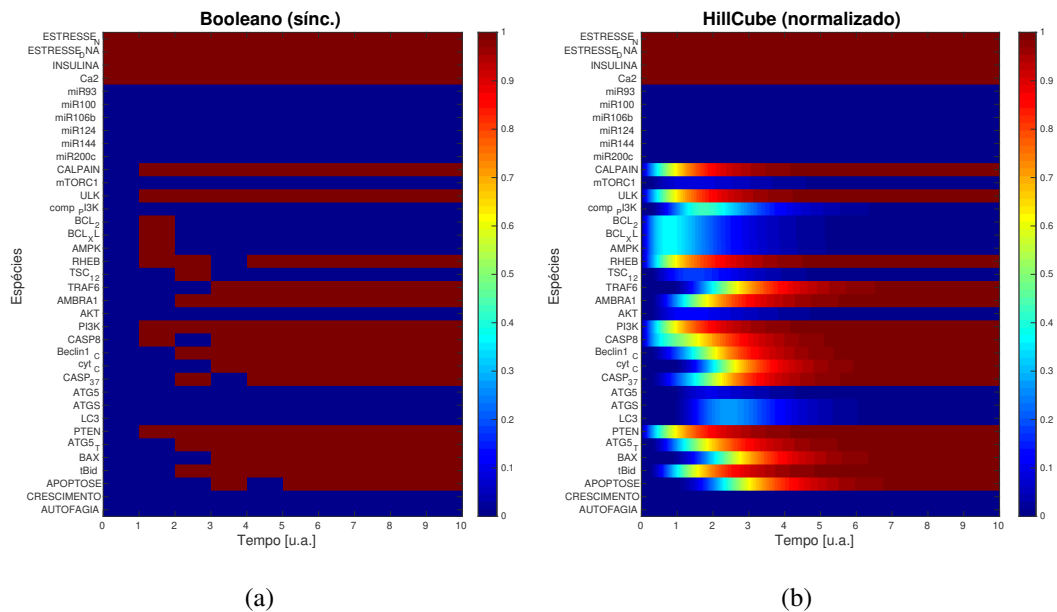
Figura 44 – Resultado das simulações dos modelos booleano e contínuo. No estado inicial escolhido o miR100 e ESTRESSE_N estão ligados, e as outras variáveis estão desligadas. Cada linha horizontal representa a ativação/desativação das variáveis. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. (a) Simulação do modelo booleano. (b) Simulação do modelo contínuo.



Fonte – A autora.

A figura 45(a) apresenta o resultado da simulação do modelo booleano com estado inicial em que os *inputs* ESTRESSE_N, ESTRESSE_DNA, INSULINA e Ca2 estão ligados, e todas as outras variáveis estão desligadas. Com a ativação da via intrínseca e extrínseca de apoptose, essa simulação leva à ativação do *output* APOPTOSE. Como podemos observar na figura 45(b), o modelo contínuo também leva ao mesmo estado estável, com a ativação das variáveis acontecendo no mesmo intervalo de tempo do modelo booleano. Podemos perceber nessa figura que o modelo contínuo permite pequenas mudanças na concentração das variáveis, o que o modelo booleano não permite. Como exemplo, podemos observar BCL_2 e BCL_XL, que apresentam valores de concentração entre 0 e 0.4, e a concentração de LC3, que muda entre 0 e 0.3.

Figura 45 – Resultado das simulações dos modelos booleano e contínuo. No estado inicial escolhido os *inputs* ESTRESSE_N, ESTRESSE_DNA, INSULINA e Ca2 estão ligados, e todas as outras variáveis estão desligadas. Cada linha horizontal representa a ativação/desativação das variáveis. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. (a) Simulação do modelo booleano. (b) Simulação do modelo contínuo.

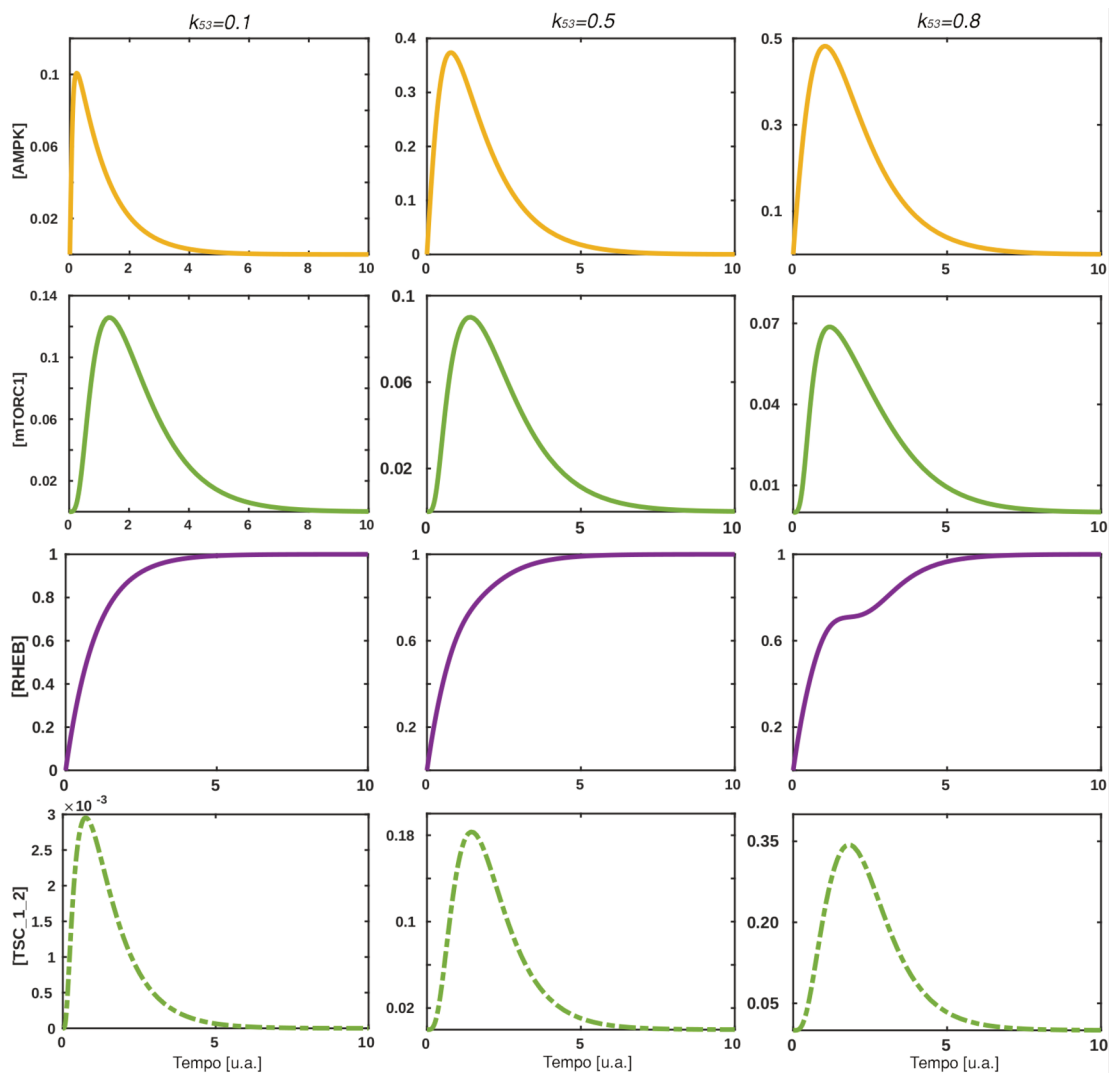


Fonte – A autora.

Ainda utilizando o estado inicial da figura 45, decidimos analisar que tipo de mudança no comportamento das concentrações das variáveis resulta da alteração do valor de apenas um parâmetro k . Assim, a figura 46 apresenta o resultado das simulações com diferentes valores de k_{53} , que é o parâmetro da interação de ULK em AMPK. Quanto menor o k_{53} , mais rápida é a inibição de AMPK por ULK. Assim, para $k_{53} = 0.1$, as concentrações de AMPK e TSC_1_2, que é ativado por AMPK, são as mais baixas, enquanto que a concentração de mTORC1 é a mais alta. Para $k_{53} = 0.8$, o oposto ocorre, e o aumento da concentração de RHEB apresenta

uma variação um pouco diferente dos casos anteriores. No geral, o comportamento dinâmico do sistema é o mesmo nos três casos.

Figura 46 – Comparação de diferentes parâmetros do em relação ao comportamento geral do sistema. Todos os outros parâmetros utilizados, exceto o k_{53} , são os seguintes: $n = 3$, $\tau = 1$ e $k = 0.5$.



Fonte – A autora.

6.2 ANÁLISE DE PARÂMETROS DO *CROSS-TALK*

A seguir, realizamos a análise do comportamento do sistema em relação a diferentes valores de parâmetros do *cross-talk*: a inibição de BAX por BCL_2 e BCL_XL, que envolve os parâmetros k_{127} e k_{129} , respectivamente; a inibição do cyt_C por BCL_2 e BCL_XL, que envolve os parâmetros k_{88} e k_{90} , respectivamente; a inibição de CASP8 por BCL_XL, que envolve o parâmetro k_{80} . Ainda estamos utilizando o mesmo estado inicial da figura 45: *inputs* ESTRESSE_N, ESTRESSE_DNA, INSULINA e Ca2 ligados, e todas as outras variáveis desligadas. Assim,

a figura 47 apresenta o resultado da simulação na qual os parâmetros k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} foram iguais a 0.1. A figura 48 apresenta o resultado em que esses mesmos parâmetros foram iguais a 0.3, e a figura 49 apresenta o caso em que esses parâmetros foram iguais a 0.8.

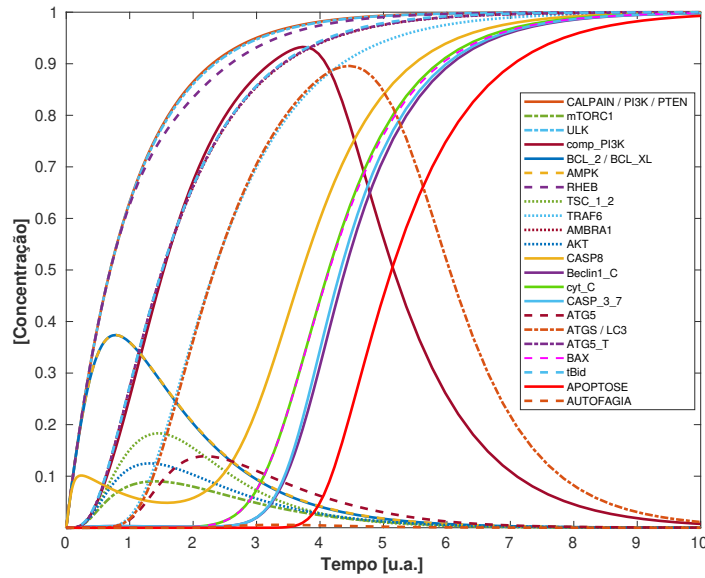
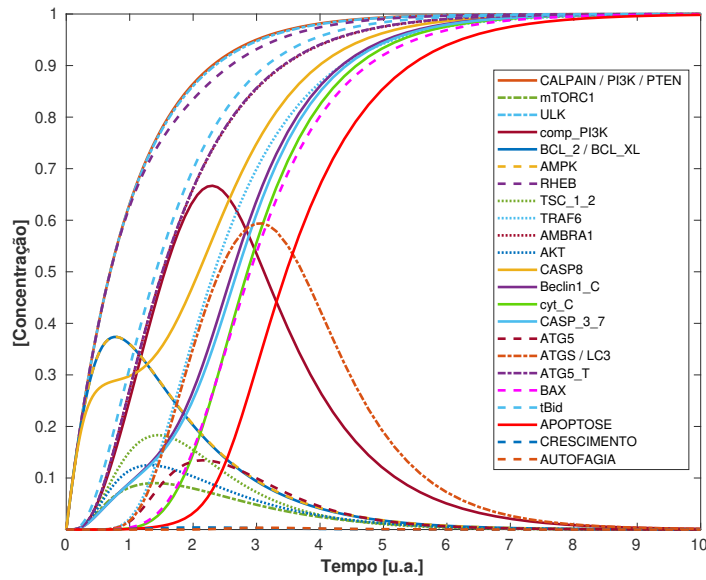


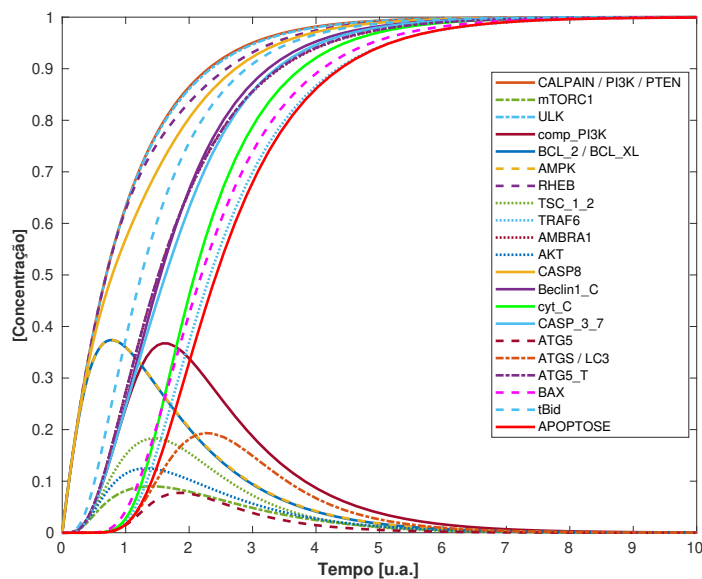
Figura 47 – Resultado da simulação com k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} iguais a 0.1. [u.a.] refere-se às unidades arbitrárias. Na visualização do gráfico foram consideradas todas as variáveis que apresentam mudança em suas concentrações. Variáveis com concentrações fixas, como os *inputs*, não estão representadas no gráfico.

Figura 48 – Resultado da simulação com k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} iguais à 0.3. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. Na visualização do gráfico foram consideradas todas as variáveis que apresentam mudança em suas concentrações. Variáveis com concentrações fixas, como os *inputs*, não estão representadas no gráfico.



Fonte – A autora.

Figura 49 – Resultado da simulação com k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} iguais à 0.8. [u.a.] refere-se à unidades arbitrárias. Na visualização do gráfico foram consideradas todas as variáveis que apresentam mudança em suas concentrações. Variáveis com concentrações fixas, como os *inputs*, não estão representadas no gráfico.



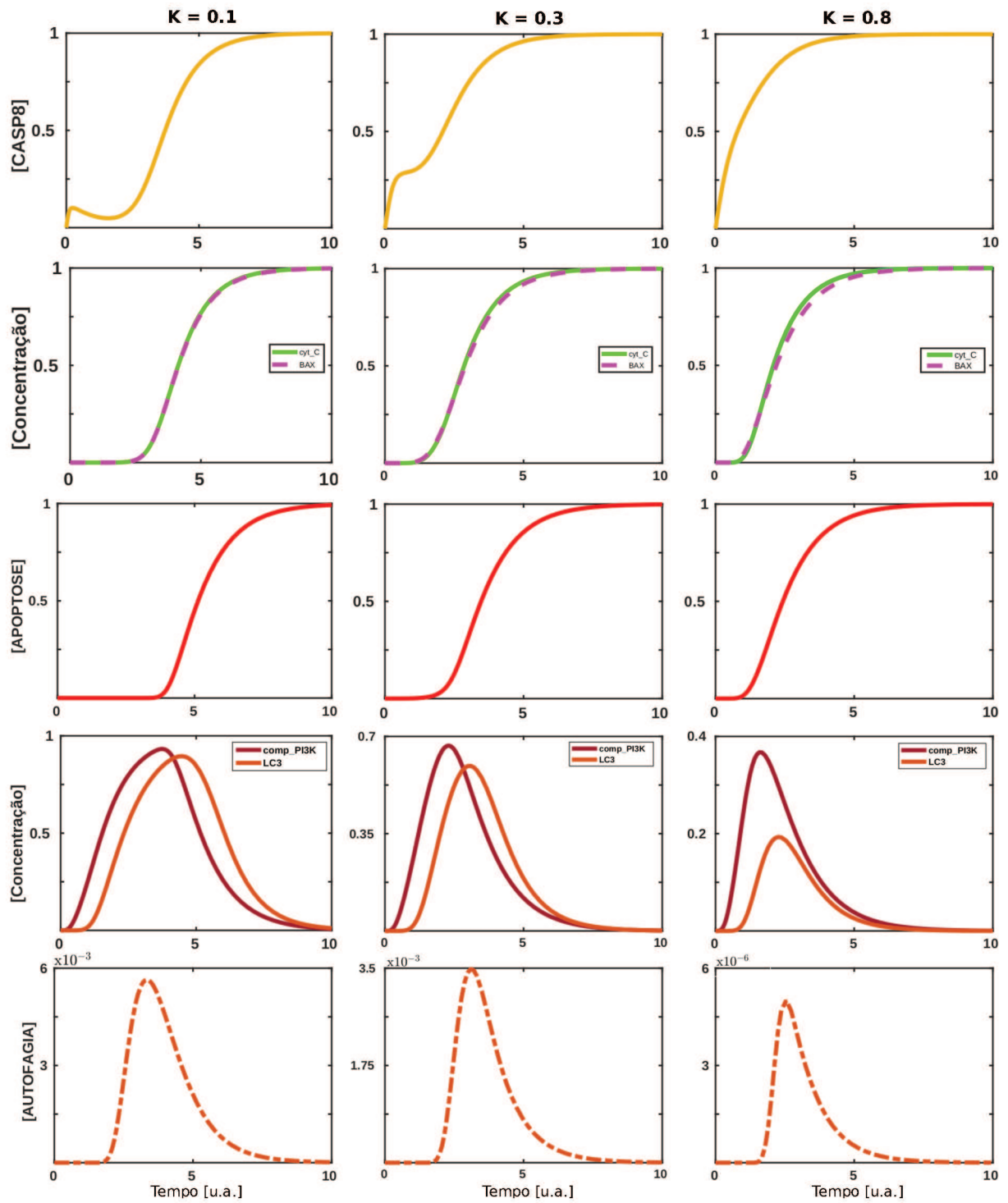
Fonte – A autora.

Além disso, a figura 50 mostra de forma mais detalhada os casos anteriores, com foco nas variáveis diretamente influenciadas por BCL_2 e BCL_XL, e os respectivos *outputs* de suas vias de sinalização. Como podemos observar, as concentrações de BAX, cyt_C e CASP8 demoram mais para aumentar quando os parâmetros são iguais à 0.1 do que nos casos seguintes, visto que as reações de inibição por BCL_2 e BCL_XL acontecem mais rápido. Logo, uma mudança no *output* APOPTOSE acontece mais tarde do que nos outros casos. Curiosamente, no mesmo caso observa-se um padrão de comportamento inverso para as concentrações de LC3, comp_PI3K e do *output* AUTOFAGIA, apesar de BCL_2 e BCL_XL também inibirem o comp_PI3K e de não termos mudado os parâmetros da interação do comp_PI3K com BCL_2 e BCL_XL. Assim, isto deve estar relacionado à inibição do comp_PI3K por Beclin1-C. Quando BCL_2 e BCL_XL inibem mais rápido BAX, cyt_C e CASP8, conseqüentemente a ativação de Beclin1_C é atrasada, o que impede Beclin1_C de inibir o comp_PI3K. Do mesmo modo, quanto mais demorar para BCL_2 e BCL_XL inibirem BAX, cyt_C e CASP8, menor será a concentração do comp_PI3K e conseqüentemente de LC3 e do *output* AUTOFAGIA.

Nos três casos, o comportamento dinâmico geral do sistema parece ser o mesmo, exceto para a concentração de CASP8 que apresenta uma mudança de padrão de comportamento mais sutil quando comparados os casos em que $k = 0.1$ e $k = 0.8$.

Conclui-se que, no geral, a comparação de alguns resultados de estados estáveis do modelo contínuo com os resultados do modelo booleano foi feita com o objetivo de ilustrar o que já foi provado por Wittmann e colaboradores: a transformação com funções do tipo *HillCube* normalizado preserva os estados estáveis do modelo booleano. Portanto, realizamos a transformação do modelo pois o formalismo lógico é uma abordagem mais simplificada da realidade biológica, e a transformação do modelo booleano para um método quantitativo complementa as informações do sistema que o modelo fornece - como a presença de concentrações contínuas das variáveis ou escalas de tempo realísticas -, o que se aproxima mais da realidade de sistemas biológicos. Logo, pode-se analisar experimentalmente a atividade de concentração de alguma proteína da rede quando induzida a alguma perturbação, teremos o modelo contínuo para a previsão deste comportamento, projetando e otimizando possíveis experimentos.

Figura 50 – Comparação de diferentes parâmetros do *cross-talk* em relação ao comportamento geral do sistema. Todos os outros parâmetros utilizados, exceto k_{80} , k_{88} , k_{90} , k_{127} e k_{129} , são os seguintes: $n = 3$, $\tau = 1$ e $k = 0.5$.



Fonte – A autora.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudamos o comportamento de um sistema formado pelo *cross-talk* entre autofagia e apoptose em células de TNBC e qual a influência que diferentes miRNAs desempenham nestes processos. Nosso modelo permitiu a análise do nocaute ou ativação fixa da expressão dos miRNAs da rede, e com os resultados das simulações do modelo, conseguimos analisar quais perturbações de miRNAs são mais prováveis de induzir os processos de autofagia e apoptose, ou o crescimento celular. Ainda, a transformação do modelo booleano para um método quantitativo complementa os resultados do modelo, permitindo a análise da atividade de concentração das proteínas da rede. Os resultados da tabela da figura 42 nos mostram que, em condições específicas, a combinação da atividade ectópica 1 do miR-100 com o nocaute do miR-144 e do miR-200c parece ser a perturbação mais eficiente para induzir autofagia, enquanto que a superexpressão do miR-144 segue sendo o estímulo mais importante para induzir apoptose.

Deve-se observar que a construção desse tipo de modelo matemático considera simplificações da realidade biológica, como no caso das interações moleculares. Sendo assim, um sistema desse tipo certamente apresenta limitações, como foi discutido na análise de perturbações no capítulo 5. Porém, esperamos que os resultados do modelo sirvam como previsões robustas para possíveis experimentos futuros, com o objetivo de detectar os miRNAs que podem ser alvos em potencial para abordagens terapêuticas em câncer de mama triplo negativo.

7.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados neste trabalho abrem outras perspectivas para estudos futuros. Além de um aperfeiçoamento do modelo, pretendemos verificar experimentalmente algumas perturbações de miRNAs, usando condições experimentais que assemelham-se aos casos do modelo. Com os dados das perturbações dos miRNAs com a maior soma de probabilidades de autofagia e apoptose, utilizaremos mímicos e anti-miRNAs para induzir esses processos na linhagem celular MDA-MB-231. Através de técnicas como *Western Blot* e RT-qPCR, pretende-se avaliar a expressão de algumas proteínas das vias de sinalização quando influenciadas pelo nocaute ou superexpressão dos miRNAs, e comparar as taxas de incidência de apoptose e atividade autofágica do grupo de células com os resultados obtidos neste trabalho. Assim, pretendemos conseguir a validação do modelo.

REFERÊNCIAS

- ABEDIN, M. J.; WANG, D.; MCDONNELL, M. A.; LEHMANN, U.; KELEKAR, A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 500–510, 2007. ISSN 13509047. DOI: [10.1038/sj.cdd.4402039](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402039).
- ABOU-JAOUDE, Wassim; TRAYNARD, Pauline; MONTEIRO, Pedro T; SAEZ-RODRIGUEZ, Julio; HELIKAR, Tomáš; THIEFFRY, Denis; CHAOUIYA, Claudine. Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. **Frontiers in genetics**, Frontiers, v. 7, p. 94, 2016.
- AGARWAL, Vikram; BELL, George W; NAM, Jin-Wu; BARTEL, David P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **elife**, eLife Sciences Publications Limited, v. 4, e05005, 2015.
- AMARAL, Alex Evangelista do; CISILOTTO, Júlia; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz; LUCCA SCHIAVON, Leonardo de. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological research**, Elsevier, v. 128, p. 274–287, 2018.
- AMELIO, Ivano; MELINO, Gerry; KNIGHT, Richard A. Cell death pathology: Cross-talk with autophagy and its clinical implications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Elsevier Inc., v. 414, n. 2, p. 277–281, 2011. ISSN 0006291X. DOI: [10.1016/j.bbrc.2011.09.080](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.080).
- BAGCI, EZ; VODOVOTZ, Y; BILLIAR, TR; ERMENROUT, GB; BAHAR, I. Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 90, n. 5, p. 1546–1559, 2006.
- BENTO, Carla F; RENNA, Maurizio; GHISLAT, Ghita; PURI, Claudia; ASHKENAZI, Avraham; VICINANZA, Mariella; MENZIES, Fiona M; RUBINSZTEIN, David C. Mammalian Autophagy: How Does It Work? **Annual review of biochemistry**, v. 85, p. 685–713, 2016. ISSN 1545-4509. DOI: [10.1146/annurev-biochem-060815-014556](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014556).
- BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L; TORRE, Lindsey A; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Wiley Online Library, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

- BROWN, Monica; TSODIKOV, Alex; BAUER, Katrina R; PARISE, Carol A; CAGGIANO, Vincent. The role of human epidermal growth factor receptor 2 in the survival of women with estrogen and progesterone receptor-negative, invasive breast cancer: The California Cancer Registry, 1999–2004. **Cancer**, Wiley Online Library, v. 112, n. 4, p. 737–747, 2008.
- CAI, Junhong; ZHANG, Ying; HUANG, Sizhe; YAN, Mengdan; LI, Jingjie; JIN, Tianbo; BAO, Shan. MiR-100-5p, miR-199a-3p and miR-199b-5p induce autophagic death of endometrial carcinoma cell through targeting mTOR. **International journal of clinical and experimental pathology**, e-Century Publishing Corporation, v. 10, n. 9, p. 9262, 2017.
- CAI, Kemin; WANG, Yu; BAO, Xueli. MiR-106b promotes cell proliferation via targeting RB in laryngeal carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, Springer, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2011.
- CHATTERJEE, Abhisek; CHATTOPADHYAY, Dhrubajyoti; CHAKRABARTI, Gopal. MiR-16 targets Bcl-2 in paclitaxel-resistant lung cancer cells and overexpression of miR-16 along with miR-17 causes unprecedented sensitivity by simultaneously modulating autophagy and apoptosis. **Cellular signalling**, Elsevier, v. 27, n. 2, p. 189–203, 2015.
- CHAVEZ, Kathryn J; GARIMELLA, Sireesha V; LIPKOWITZ, Stanley. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast disease**, NIH Public Access, v. 32, n. 1-2, p. 35, 2010.
- CHEN, Dan; CHEN, Zujian; JIN, Yi; DRAGAS, Dragan; ZHANG, Leitao; ADJEI, Barima S.; WANG, Anxun; DAI, Yang; ZHOU, Xiaofeng. MicroRNA-99 family members suppress homeobox A1 expression in epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013. ISSN 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0080625](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080625).
- CHEN, Shanshan *et al.* MiR-144 inhibits proliferation and induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells by targeting TIGAR. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 997–1007, 2015. ISSN 14219778. DOI: [10.1159/000369755](https://doi.org/10.1159/000369755).
- CHEN, Sheng *et al.* MicroRNA-495-3p inhibits multidrug resistance by modulating autophagy through GRP78/mTOR axis in gastric cancer. **Cell death & disease**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 11, p. 1–12, 2018.
- CICCHINI, Michelle; KARANTZA, Vassiliki; XIA, Bing. Molecular pathways: Autophagy in cancer-A matter of timing and context. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 3, p. 498–504, 2015. ISSN 15573265. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-13-2438](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2438).

DAI, Xiaofeng; CHENG, Hongye; BAI, Zhonghu; LI, Jia. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. **Journal of Cancer**, Ivyspring International Publisher, v. 8, n. 16, p. 3131, 2017.

DENT, Rebecca *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clinical cancer research**, AACR, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 2007.

DIAS, Kay; DVORKIN-GHEVA, Anna; HALLETT, Robin M; WU, Ying; HASSELL, John; POND, Gregory R; LEVINE, Mark; WHELAN, Tim; BANE, Anita L. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. **PloS one**, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 12, n. 1, e0168669, 2017.

DUNLOP, Elaine A.; HUNT, David K.; ACOSTA-JAQUEZ, Hugo A.; FINGAR, Diane C.; TEE, Andrew R. ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. **Autophagy**, v. 7, n. 7, p. 737–747, 2011. ISSN 15548635. DOI: [10.4161/auto.7.7.15491](https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15491).

ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007. ISSN 01926233. DOI: [10.1080/01926230701320337](https://doi.org/10.1080/01926230701320337).

ERSAHIN, Tulin; TUNCBAG, Nurcan; CETIN-ATALAY, Rengul. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular BioSystems**, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 7, p. 1946–1954, 2015.

ESKES, Robert; DESAGHER, Solange; ANTONSSON, Bruno; MARTINOU, Jean-Claude. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. **Molecular and cellular biology**, Am Soc Microbiol, v. 20, n. 3, p. 929–935, 2000.

FENG, Tongbao *et al.* miR-124 downregulation leads to breast cancer progression via LncRNA-MALAT1 regulation and CDK4/E2F1 signal activation. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16205–16216, 2016. ISSN 19492553. DOI: [10.18632/oncotarget.7578](https://doi.org/10.18632/oncotarget.7578).

FENG, Tongbao *et al.* miR-124 inhibits cell proliferation in breast cancer through downregulation of CDK4. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 5987–5997, 2015. ISSN 14230380. DOI: [10.1007/s13277-015-3275-8](https://doi.org/10.1007/s13277-015-3275-8).

FLOBAK, Åsmund; BAUDOT, Anais; REMY, Elisabeth; THOMMESEN, Liv; THIEFFRY, Denis; KUIPER, Martin; LÆGREID, Astrid. Discovery of drug synergies in

gastric cancer cells predicted by logical modeling. **PLoS Comput Biol**, Public Library of Science, v. 11, n. 8, e1004426, 2015.

FOULKES, William D; SMITH, Ian E; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer. **New England journal of medicine**, Mass Medical Soc, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 2010.

FRIEDMAN, Robin C; FARH, Kyle Kai-How; BURGE, Christopher B; BARTEL, David P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, Cold Spring Harbor Lab, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 7, p. 856–880, 2015. DOI: [10.15252/embj.201490784](https://doi.org/10.15252/embj.201490784).

GARRIDO-CASTRO, Ana C; LIN, Nancy U; POLYAK, Kornelia. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. **Cancer discovery**, AACR, v. 9, n. 2, p. 176–198, 2019.

GE, Yi-Yuan; SHI, Qing; ZHENG, Zhi-Yuan; GONG, Jiao; ZENG, Chunxian; YANG, Jine; ZHUANG, Shi-Mei. MicroRNA-100 promotes the autophagy of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the expression of mTOR and IGF-1R. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, 2014. DOI: [10.18632/oncotarget.2189](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2189).

GEBESHUBER, C. A.; MARTINEZ, J. MiR-100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 32, n. 27, p. 3306–3310, 2013. ISSN 09509232. DOI: [10.1038/onc.2012.372](https://doi.org/10.1038/onc.2012.372).

GHASABI, Mehri; MAJIDI, Jafar; MANSOORI, Behzad; MOHAMMADI, Ali; SHOMALI, Navid; SHIRAFKAN, Naghmeh; BAGHBANI, Elham; KAZEMI, Tohid; BARADARAN, Behzad. The effect of combined miR-200c replacement and cisplatin on apoptosis induction and inhibition of gastric cancer cell line migration. **Journal of cellular physiology**, Wiley Online Library, v. 234, n. 12, p. 22581–22592, 2019.

GIL-PARRADO, Shirley *et al.* Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 30, p. 27217–27226, 2002. ISSN 00219258. DOI: [10.1074/jbc.M202945200](https://doi.org/10.1074/jbc.M202945200).

GONG, Yi; HE, Tianliang; YANG, Lu; YANG, Geng; CHEN, Yulei; ZHANG, Xiaobo. The role of miR-100 in regulating apoptosis of breast cancer cells. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: [10.1038/srep11650](https://doi.org/10.1038/srep11650).

GOZUACIK, Devrim; AKKOC, Yunus; OZTURK, Deniz Gulfem; KOCAK, Muhammed. Autophagy-Regulating microRNAs and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 7, April, p. 1–22, 2017. DOI: [10.3389/fonc.2017.00065](https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00065).

GREEN, Michelle F.; ANDERSON, Kristin A.; MEANS, Anthony R. Characterization of the CaMKK–AMPK signaling complex. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 12, p. 2005–2012, 2011. ISSN 0898-6568. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.07.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656811002233>.

GRIECO, Luca; CALZONE, Laurence; BERNARD-PIERROT, Isabelle; RADVANYI, François; KAHN-PERLES, Brigitte; THIEFFRY, Denis. Integrative modelling of the influence of MAPK network on cancer cell fate decision. **PLoS Comput Biol**, Public Library of Science, v. 9, n. 10, e1003286, 2013.

GROSS, Atan; JOCKEL, Jennifer; WEI, Michael C.; KORSMEYER, Stanley J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. **EMBO Journal**, v. 17, n. 14, p. 3878–3885, 1998. ISSN 02614189. DOI: [10.1093/emboj/17.14.3878](https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3878).

GWINN, Dana M; SHACKELFORD, David B; EGAN, Daniel F; MIHAYLOVA, Maria M; MERY, Annabelle; VASQUEZ, Debbie S; TURK, Benjamin E; SHAW, Reuben J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular cell**, Elsevier, v. 30, n. 2, p. 214–226, 2008.

HILL, Archibald Vivian. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **j. physiol.**, v. 40, p. 4–7, 1910.

HU, Jinhua; XU, Juan; WU, Yuquan; CHEN, Qingyong; ZHENG, Wei; LU, Xiaojun; ZHOU, Chun; JIAO, Demin. Identification of microRNA-93 as a functional dysregulated miRNA in triple-negative breast cancer. **Tumor Biology**, v. 36, n. 1, p. 251–258, jan. 2015. ISSN 1010-4283. DOI: [10.1007/s13277-014-2611-8](https://doi.org/10.1007/s13277-014-2611-8).

HUMPHRIES, Brock; WANG, Zhishan; OOM, Aaron L; FISHER, Theresa; TAN, Dongfeng; CUI, Yuehua; JIANG, Yiguo; YANG, Chengfeng. MicroRNA-200b targets protein kinase C α

and suppresses triple-negative breast cancer metastasis. **Carcinogenesis**, Oxford University Press UK, v. 35, n. 10, p. 2254–2263, 2014.

INCA. **Estatísticas de câncer**. [S.l.: s.n.], 2020.

<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso: 04-04-2021.

INGALLS, Brian P. **Mathematical modeling in systems biology: an introduction**. [S.l.]: MIT press, 2013.

IWAYA, Takeshi *et al.* Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 12, p. 2391–2397, dez. 2012. ISSN 01433334. DOI: [10.1093/carcin/bgs288](https://doi.org/10.1093/carcin/bgs288).

JEGGA, Anil G.; SCHNEIDER, Lonnie; OUYANG, Xiaosen; ZHANG, Jianhua. Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. **Autophagy**, v. 7, n. 5, p. 477–489, 2011. ISSN 15548635. DOI: [10.4161/auto.7.5.14811](https://doi.org/10.4161/auto.7.5.14811).

JIANG, Qian *et al.* MicroRNA-100 suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by targeting FZD-8 and inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Tumor Biology**, Springer, v. 37, n. 4, p. 5001–5011, 2016.

JUNG, Chang Hwa; RO, Seung-Hyun; CAO, Jing; OTTO, Neil Michael; KIM, Do-Hyung. mTOR regulation of autophagy. **FEBS Letters**, Elsevier, v. 584, n. 7, p. 1287–1295, abr. 2010. ISSN 00145793. DOI: [10.1016/j.febslet.2010.01.017](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017).

JUNG, Chang Hwa; SEO, Minchul; OTTO, Neil Michael; KIM, Do Hyung. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. **Autophagy**, v. 7, n. 10, p. 1212–1221, 2011. ISSN 15548635. DOI: [10.4161/auto.7.10.16660](https://doi.org/10.4161/auto.7.10.16660).

KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, jan. 2000. ISSN 0305-1048. DOI: [10.1093/nar/28.1.27](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27).

KARAGKOUNI, Dimitra *et al.* DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 46, n. D1, p. d239–d245, 2018.

KASINSKI, Andrea L; SLACK, Frank J. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 12, p. 849–864, 2011.

KAUR, Jasvinder; DEBNATH, Jayanta. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Nature Publishing Group, v. 16, n. 8, p. 461–472, 2015. ISSN 14710080. DOI: [10.1038/nrm4024](https://doi.org/10.1038/nrm4024).

KAWAGUCHI, Tsutomu; YAN, Li; QI, Qianya; PENG, Xuan; GABRIEL, Emmanuel M.; YOUNG, Jessica; LIU, Song; TAKABE, Kazuaki. Overexpression of suppressive microRNAs, miR-30a and miR-200c are associated with improved survival of breast cancer patients. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, dez. 2017. ISSN 20452322. DOI: [10.1038/s41598-017-16112-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16112-y).

KAWANO, Masanori; TANAKA, Kazuhiro; ITONAGA, Ichiro; IKEDA, Shinichi; IWASAKI, Tatsuya; TSUMURA, Hiroshi. microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. **Journal of experimental & clinical cancer research**, BioMed Central, v. 34, n. 1, p. 1–11, 2015.

KIM, Joungmok; KUNDU, Mondira; VIOLLET, Benoit; GUAN, Kun-Liang. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol.**, v. 13, n. 2, p. 132–141, 2011. DOI: [10.1038/ncb2152](https://doi.org/10.1038/ncb2152).

KITADATE, Akihiro *et al.* MicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence–apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 35, n. 28, p. 3692–3704, 2016.

KLAMT, Steffen; KAMP, Axel von. An application programming interface for CellNetAnalyzer. **Biosystems**, Elsevier, v. 105, n. 2, p. 162–168, 2011.

KRISHNAMURTHY, S; POORNIMA, R; CHALLA, Vasu Reddy; GOUD, YG Basavana. Triple negative breast cancer-our experience and review. **Indian journal of surgical oncology**, Springer, v. 3, n. 1, p. 12–16, 2012.

KRUMSIEK, Jan; PÖLSTERL, Sebastian; WITTMANN, Dominik M; THEIS, Fabian J. Odefy-from discrete to continuous models. **BMC bioinformatics**, Springer, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2010.

KUMAR, Pankaj; AGGARWAL, Rupali. An overview of triple-negative breast cancer. **Archives of gynecology and obstetrics**, Springer, v. 293, n. 2, p. 247–269, 2016.

LE NOVÈRE, Nicolas. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. **Nature Reviews Genetics**, Nature Publishing Group, v. 16, n. 3, p. 146–158, 2015.

LI, Honglin; ZHU, Hong; XU, Chi Jie; YUAN, Junying. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 491–501, 1998. ISSN 00928674. DOI: [10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1).

LI, Kay Ka-Wai; XIA, Tian; MA, Fanny Man Ting; ZHANG, Rong; MAO, Ying; WANG, Yin; ZHOU, Liangfu; LAU, Kin-Mang; NG, Ho-Keung. miR-106b is overexpressed in medulloblastomas and interacts directly with PTEN. **Neuropathology and applied neurobiology**, Wiley Online Library, v. 41, n. 2, p. 145–164, 2015.

LI, Nana; LIU, Yuejian; MIAO, Yuan; ZHAO, Lifen; ZHOU, Huimin; JIA, Li. MicroRNA-106b targets FUT6 to promote cell migration, invasion, and proliferation in human breast cancer. **IUBMB life**, Wiley Online Library, v. 68, n. 9, p. 764–775, 2016.

LI, Nana; MIAO, Yuan; SHAN, Yujia; LIU, Bing; LI, Yang; ZHAO, Lifen; JIA, Li. MiR-106b and miR-93 regulate cell progression by suppression of PTEN via PI3K/Akt pathway in breast cancer. **Cell death & disease**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 5, e2796, 2017. ISSN 20414889. DOI: [10.1038/cddis.2017.119](https://doi.org/10.1038/cddis.2017.119).

LIANG, Yong-Jun *et al.* MiR-124 targets Slug to regulate epithelial–mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. **Carcinogenesis**, Oxford University Press UK, v. 34, n. 3, p. 713–722, 2013.

LICATA, Luana *et al.* SIGNOR 2.0, the SIGNaling Network Open Resource 2.0: 2019 update. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 48, n. D1, p. d504–d510, 2020.

LIN, Jing; LIU, Cong; GAO, Fu; MITCHEL, REJ; ZHAO, Luqian; YANG, Yanyong; LEI, Jixiao; CAI, Jianming. miR-200c enhances radiosensitivity of human breast cancer cells. **Journal of cellular biochemistry**, Wiley Online Library, v. 114, n. 3, p. 606–615, 2013.

LIU, Bing; OLTVAI, Zoltán N; BAYIR, Hülya; SILVERMAN, Gary A; PAK, Stephen C; PERLMUTTER, David H; BAHAR, Ivet. Quantitative assessment of cell fate decision between autophagy and apoptosis. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

- LIU, Meng Xin *et al.* miR-93-5p transferred by exosomes promotes the proliferation of esophageal cancer cells via intercellular communication by targeting PTEN. **Biomedical and environmental sciences**, Elsevier, v. 31, n. 3, p. 171–185, 2018.
- LÖFFLER, Antje S. *et al.* Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. **Autophagy**, v. 7, n. 7, p. 696–706, 2011. ISSN 15548635. DOI: [10.4161/auto.7.7.15451](https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15451).
- LONG, Xiaomeng; LIN, Yenshou; ORTIZ-VEGA, Sara; YONEZAWA, Kazuyoshi; AVRUCH, Joseph. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Current biology**, Elsevier, v. 15, n. 8, p. 702–713, 2005.
- LOPICCOLO, Jaclyn; BLUMENTHAL, Gideon M; BERNSTEIN, Wendy B; DENNIS, Phillip A. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. **Drug Resistance Updates**, Elsevier, v. 11, n. 1-2, p. 32–50, 2008.
- LU, Changming *et al.* MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. **Gastroenterology**, Elsevier, Inc, v. 146, n. 1, p. 188–199, 2014. ISSN 15280012. DOI: [10.1053/j.gastro.2013.09.006](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.006).
- MAIURI, M Chiara *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. **The EMBO journal**, John Wiley & Sons, Ltd, v. 26, n. 10, p. 2527–2539, 2007.
- MARIA FIMIA, Gian *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1121–1125, 2007. ISSN 14764687. DOI: [10.1038/nature05925](https://doi.org/10.1038/nature05925).
- MCILWAIN, David R.; BERGER, Thorsten; MAK, Tak W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p. 1–28, 2013. ISSN 19430264. DOI: [10.1101/cshperspect.a008656](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656).
- MI, Huaiyu; EBERT, Dustin; MURUGANUJAN, Anushya; MILLS, Caitlin; ALBOU, Laurent-Philippe; MUSHAYAMAHA, Tremayne; THOMAS, Paul D. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. d394–d403, dez. 2020. ISSN 0305-1048. DOI: [10.1093/nar/gkaa1106](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1106). eprint: <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/49/D1/D394/35364375/gkaa1106.pdf>. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1106>.

- MOMBACH, José CM; BUGS, Cristhian A; CHAOUIYA, Claudine. Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint. **BMC genomics**, BioMed Central, v. 15, n. 7, p. 1–11, 2014.
- MOMENI, Hamid Reza. Role of calpain in apoptosis. **Cell Journal**, v. 13, n. 2, p. 65–72, 2011. ISSN 22285806.
- MORGENZTERN, Daniel; MCLEOD, Howard L. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. **Anti-cancer drugs**, LWW, v. 16, n. 8, p. 797–803, 2005.
- NALDI, A.; BERENGUIER, D.; FAURÉ, A.; LOPEZ, F.; THIEFFRY, D.; CHAOUIYA, C. Logical modelling of regulatory networks with GINsim 2.3. **Biosystems**, v. 97, n. 2, p. 134–139, 2009. ISSN 0303-2647. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2009.04.008>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303264709000665>.
- OLTVAL, Zoltán N.; MILLIMAN, Curt L.; KORSMEYER, Stanley J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609–619, 1993. ISSN 00928674. DOI: [10.1016/0092-8674\(93\)90509-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-0).
- PAEZ, Juan; SELLERS, William R. PI3K/PTEN/Akt Pathway. *In: SIGNAL transduction in cancer*. [S.l.]: Springer, 2004. P. 145–167.
- PAN, Yuliang; ZHANG, Jun; FU, Huiqun; SHEN, Liangfang. miR-144 functions as a tumor suppressor in breast cancer through inhibiting ZEB1/2-mediated epithelial mesenchymal transition process. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 6247–6255, 2016. ISSN 11786930. DOI: [10.2147/OTT.S103650](https://doi.org/10.2147/OTT.S103650).
- PATTINGRE, Sophie; TASSA, Amina; QU, Xueping; GARUTI, Rita; XIAO, Huan Liang; MIZUSHIMA, Noboru; PACKER, Milton; SCHNEIDER, Michael D.; LEVINE, Beth. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 927–939, 2005. ISSN 00928674. DOI: [10.1016/j.cell.2005.07.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002).
- POLIVKA JR, Jiri; JANKU, Filip. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Pharmacology & therapeutics**, Elsevier, v. 142, n. 2, p. 164–175, 2014.

- POMMIER, Roxane M *et al.* Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution. **Nature communications**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.
- PRESNEAU, N; SHALABY, A; IDOWU, B; GIKAS, P; CANNON, SR; GOUT, I; DISS, T; TIRABOSCO, R; FLANAGAN, AM. Potential therapeutic targets for chordoma: PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. **British journal of cancer**, Nature Publishing Group, v. 100, n. 9, p. 1406–1414, 2009.
- QIAGEN, Inc. **Ingenuity Target Explorer**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <https://targetexplorer.ingenuity.com/>.
- REINHARDT, H Christian; SCHUMACHER, Björn. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends in Genetics**, Elsevier, v. 28, n. 3, p. 128–136, 2012.
- RIAZ, Muhammad *et al.* miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. **Breast cancer research**, Springer, v. 15, n. 2, p. 1–17, 2013.
- RUSSELL, Ryan C.; YUAN, Hai Xin; GUAN, Kun Liang. Autophagy regulation by nutrient signaling. **Cell Research**, Nature Publishing Group, v. 24, n. 1, p. 42–57, 2014. ISSN 10010602. DOI: [10.1038/cr.2013.166](https://doi.org/10.1038/cr.2013.166).
- SABATIER, Renaud; FINETTI, Pascal; GUILLE, Arnaud; ADELAIDE, José; CHAFFANET, Max; VIENS, Patrice; BIRNBAUM, Daniel; BERTUCCI, François. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. **Molecular cancer**, Springer, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2014.
- SANTILLÁN, Moises. On the use of the Hill functions in mathematical models of gene regulatory networks. **Mathematical Modelling of Natural Phenomena**, EDP Sciences, v. 3, n. 2, p. 85–97, 2008.
- SEGAL, Meirav; SLACK, Frank J. Challenges identifying efficacious miRNA therapeutics for cancer. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Taylor Francis, v. 15, n. 9, p. 987–991, 2020. PMID: 32421364. DOI: [10.1080/17460441.2020.1765770](https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1765770).

SHEN, Gang; JIA, Hongyun; TAI, Qiang; LI, Yanhao; CHEN, Deji. miR-106b downregulates adenomatous polyposis coli and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, Oxford University Press UK, v. 34, n. 1, p. 211–219, 2013.

SILBER, Joachim *et al.* miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. **BMC medicine**, BioMed Central, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2008.

SONG, Cailu *et al.* miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. **Oncotarget**, Impact Journals LLC, v. 6, n. 33, p. 34968–34978, 2015. ISSN 19492553. DOI: [10.18632/oncotarget.5198](https://doi.org/10.18632/oncotarget.5198).

SOULÉ, Christophe. Mathematical approaches to differentiation and gene regulation. **Comptes rendus biologies**, Elsevier, v. 329, n. 1, p. 13–20, 2006.

SRINIVASAN, Anu; LI, Feng; WONG, Angela; KODANDAPANI, Lalitha; SMIDT JR, Robert; KREBS, Joseph F; FRITZ, Lawrence C; WU, Joe C; TOMASELLI, Kevin J. Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas-and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, Elsevier, v. 273, n. 8, p. 4523–4529, 1998.

STEINBACH, Bernd; KOHUT, Roman. Neural networks—a model of boolean functions. *In*: **BOOLEAN Problems**, Proceedings of the 5th International Workshop on Boolean Problems. [S.l.: s.n.], 2002. P. 223–240.

STELZER, Gil *et al.* The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. **Current protocols in bioinformatics**, Wiley Online Library, v. 54, n. 1, p. 1–30, 2016.

STIUSO, Paola *et al.* MicroRNA-423-5p promotes autophagy in cancer cells and is increased in serum from hepatocarcinoma patients treated with sorafenib. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, Elsevier, v. 4, e233, 2015.

SU, Zhenyi; YANG, Zuozhang; XU, Yongqing; CHEN, Yongbin; YU, Qiang. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 6, n. 11, p. 8474, 2015.

SUN, Jian *et al.* MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 411, mar. 2013. ISSN 1357-0560. DOI: [10.1007/s12032-012-0411-9](https://doi.org/10.1007/s12032-012-0411-9).

SUN, Quanquan *et al.* MiR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 1003–1012, 2015. ISSN 10970215. DOI: [10.1002/ijc.29065](https://doi.org/10.1002/ijc.29065).

SZKLARCZYK, Damian *et al.* STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 47, n. D1, p. d607–d613, 2019.

THOMAS, René; D'ARI, Richard. **Biological feedback**. [S.l.]: CRC press, 1990.

TOSS, Angela; CRISTOFANILLI, Massimo. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast cancer research**, BioMed Central, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2015.

VLACHOS, Ioannis S; ZAGGANAS, Konstantinos; PARASKEVOPOULOU, Maria D; GEORGAKILAS, Georgios; KARAGKOUNI, Dimitra; VERGOULIS, Thanasis; DALAMAGAS, Theodore; HATZIGEORGIOU, Artemis G. DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 43, W1, w460–w466, 2015.

WANG, Baiyao *et al.* Long noncoding RNA LINC02582 acts downstream of miR-200c to promote radioresistance through CHK1 in breast cancer cells. **Cell death & disease**, Nature Publishing Group, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2019.

WANG, Yanbo *et al.* miR-124-3p functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting CBL. **BMC cancer**, Springer, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

WEI, Ke; PAN, Chunfeng; YAO, Guoliang; LIU, Bin; MA, Teng; XIA, Yang; JIANG, Wei; CHEN, Liang; CHEN, Yijiang. MiR-106b-5p promotes proliferation and inhibits apoptosis by regulating BTG3 in non-small cell lung cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Karger Publishers, v. 44, n. 4, p. 1545–1558, 2017.

WEI, Michael C *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 292, n. 5517, p. 727–730, 2001.

- WIRAWAN, E. *et al.* Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. **Cell Death and Disease**, Nature Publishing Group, v. 1, n. 1, e18–10, 2010. ISSN 20414889. DOI: [10.1038/cddis.2009.16](https://doi.org/10.1038/cddis.2009.16).
- WITTMANN, Dominik M.; KRUMSIEK, Jan; SAEZ-RODRIGUEZ, Julio; LAUFFENBURGER, Douglas A.; KLAMT, Steffen; THEIS, Fabian J. Transforming Boolean models to continuous models: Methodology and application to T-cell receptor signaling. **BMC Systems Biology**, v. 3, p. 98, 2009. ISSN 17520509. DOI: [10.1186/1752-0509-3-98](https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-98).
- WU, Xiaoli; FENG, Xuefeng; ZHAO, Xiaoqing; MA, Futian; LIU, Na; GUO, Hongming; LI, Chaonan; DU, Huan; ZHANG, Baoxi. Role of Beclin-1-Mediated Autophagy in the Survival of Pediatric Leukemia Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1827–1836, 2016. ISSN 14219778. DOI: [10.1159/000447882](https://doi.org/10.1159/000447882).
- XIA, Jintang *et al.* miR-124 inhibits cell proliferation in gastric cancer through down-regulation of SPHK1. **The Journal of pathology**, Wiley Online Library, v. 227, n. 4, p. 470–480, 2012.
- XIANG, Cheng; CUI, Shi peng; KE, You. MiR-144 inhibits cell proliferation of renal cell carcinoma by targeting MTOR. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, Tongji Medical University, v. 36, n. 2, p. 186–192, abr. 2016. ISSN 16720733. DOI: [10.1007/s11596-016-1564-0](https://doi.org/10.1007/s11596-016-1564-0).
- YAN, Guiling *et al.* Decreased miR-124-3p promoted breast cancer proliferation and metastasis by targeting MGAT5. **American journal of cancer research**, e-Century Publishing Corporation, v. 9, n. 3, p. 585, 2019.
- YANG, Jie; LIU, Xuesong; BHALLA, Kapil; KIM, Caryn Naekyung; IBRADO, Ana Maria; CAI, Jiyang; PENG, Tsung-I; JONES, Dean P; WANG, Xiaodong. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 275, n. 5303, p. 1129–1132, 1997.
- YANG, Yifan *et al.* MicroRNA-221 induces autophagy through suppressing HDAC6 expression and promoting apoptosis in pancreatic cancer. **Oncology letters**, Spandidos Publications, v. 16, n. 6, p. 7295–7301, 2018.
- YE, Yun; LI, Su-Liang; WANG, Jian-Jun. miR-100-5p Downregulates mTOR to Suppress the Proliferation, Migration, and Invasion of Prostate Cancer Cells. **Frontiers in Oncology**, Frontiers, v. 10, p. 2695, 2020.

YOUSEFI, Shida; PEROZZO, Remo; SCHMID, Inès; ZIEMIECKI, Andrew; SCHAFFNER, Thomas; SCAPOZZA, Leonardo; BRUNNER, Thomas; SIMON, Hans Uwe. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 1124–1132, 2006. ISSN 14657392. DOI: [10.1038/ncb1482](https://doi.org/10.1038/ncb1482).

YU, Z.; LI, N.; JIANG, K.; ZHANG, N.; YAO, L. L. MiR-100 up-regulation enhanced cell autophagy and apoptosis induced by cisplatin in osteosarcoma by targeting mTOR. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 18, p. 5867–5873, 2018. ISSN 22840729.

ZHOU, Guohua; ZHANG, Fangli; GUO, Yu; HUANG, Jianfei; XIE, Yaqiong; YUE, Shuanglei; CHEN, Minghui; JIANG, Hao; LI, Mengjie. miR-200c enhances sensitivity of drug-resistant non-small cell lung cancer to gefitinib by suppression of PI3K/Akt signaling pathway and inhibites cell migration via targeting ZEB1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Elsevier, v. 85, p. 113–119, 2017.

ZHU, Wei; XU, Huaguo; ZHU, Dan Xia; ZHI, Hui; WANG, Tongshan; WANG, Jian; JIANG, Binghua; SHU, Yongqian; LIU, Ping. miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 723–731, mar. 2012. ISSN 03445704. DOI: [10.1007/s00280-011-1752-3](https://doi.org/10.1007/s00280-011-1752-3).