DANIELE CARVALHO CALVANO MENDES

**Caracterização da expressão de microRNAs em carcinoma de
mama receptores hormonais positivos e HER-2 negativo**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mendes, Daniele Carvalho Calvano

Caracterização da expressão de microRNAs em carcinoma de mama receptores hormonais positivos e HER-2 negativo / Daniele Carvalho Calvano Mendes. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 3.Expressão gênica 4.Carcinoma ductal de mama/patologia 5.Carcinoma ductal de mama/genética 6.Prognóstico 7.Genes supressores de tumor 8.Imuno-histoquímica 9.Marcadores biológicos de tumor/análise 9.Neoplasias da mama/patologia

USP/FM/DBD-437/14

A Nosso Senhor, pela certeza de que vale a pena seguir em frente.

Aos meus pais, Carlos e Adalgisa, e ao meu querido irmão Carlos, por me ensinar o amor verdadeiro.

Ao amor da minha vida Ivam, por trazer cores ao caminho.

Aos pequenos Carlos Augusto e Maria Luísa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir esta vida e todos os ensinamentos que ela carrega consigo.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, pela confiança e colaboração.

A minha amiga Ana Maria Massad Costa, por ter dado os primeiros passos comigo na confecção desta dissertação.

Aos amigos do LIM-58, especialmente Kátia Cândido Carvalho, por garantir um excelente meio de trabalho.

*Há homens que lutam um dia e são bons
Há homens que lutam um ano e são melhores
Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons
Mas há os que lutam toda a vida
Esses são imprescindíveis*

(Bertold Brecht)

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 Introdução	2
1.1 Revisão da Literatura	2
1.1.1 Câncer como doença genética	2
1.2 miRNA na regulação gênica	5
1.2.1 Definição de miRNA.....	5
1.2.2 Formação do miRNA	6
1.2.3 Principais técnicas utilizadas para investigar o miRNA.....	8
1.2.4 Funções do miRNA	9
1.3 Perfil de miRNAs no câncer	12
1.3.1 miRNAs e apoptose	16
1.3.2 Regulação da apoptose por miRNAs por meio de sua ação sobre vias oncogênicas e supressoras tumorais	17
1.3.2.1 PDCD4.....	17
1.3.2.2 TPM1	18
1.3.2.3 PTEN	18
1.3.2.4 p53.....	19
1.3.2.5 HMGA2	19
1.4 O perfil de expressão dos miRNAs no câncer de mama	21
1.5 miRNAs e a resposta à terapia oncológica	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	26
3.1 Casuística	26
3.2 Métodos	26

3.2.1 Preparo dos cortes de parafina para purificação de RNA	28
3.2.2 Protocolo de desparafinização	28
3.2.2.1 Princípios	28
3.2.2.2 Procedimentos	29
3.2.2.3 Quantificação e qualificação da amostra obtida	32
3.2.3 Fase de transcrição reversa (conversão em cDNA)	33
3.2.3.1 Princípios	33
3.2.3.2 Protocolo de conversão em cDNA	34
3.2.3.2.1 Procedimentos	34
3.2.4 Fase de PCR em tempo real	35
3.2.4.1 Protocolo para PCR	36
3.2.5 Método Estatístico	37
4 RESULTADOS	40
4.1 Expressão de miRNAs e taxas de recidiva locorregional e de metástase a distância	53
4.2 Expressão de miRNAs e parâmetros clínicos	53
4.2.1 Expressão de microRNAs e idade das pacientes	53
4.2.2 Expressão de microRNAs e estado menopausal	55
4.2.3 Expressão de microRNAs e paridade	55
4.2.4 Expressão de microRNAs e amamentação	55
4.2.5 Expressão de microRNAs e idade ao primeiro parto a termo	55
4.2.6 Expressão de microRNAs e história familiar de câncer de mama e/ou ovário	57
4.2.7 Expressão de microRNAs e tabagismo	57
4.3 Expressão de microRNAs e parâmetros histológicos	59
4.3.1 Expressão de microRNAs e tamanho tumoral	59
4.3.2 Expressão de microRNAs e invasão linfática	60
4.3.3 Expressão de microRNAs e invasão perineural	60
4.3.4 Expressão de microRNAs e componente intraductal	61
4.3.5 Expressão de microRNAs e estadiamento	61
4.3.6 Expressão de microRNAs e índices de KI-67	62
4.3.7 Expressão de microRNAs e receptor de estrogênio	63
4.3.8 Expressão de microRNAs e receptor de progesterona	63
4.3.9 Expressão de microRNAs e grau histológico	67

4.3.10 Expressão de microRNAs e grau nuclear	68
4.3.11 Expressão de microRNAs e multicentralidade	70
4.3.12 Expressão de microRNAs e bilateralidade	72
5 DISCUSSÃO.....	75
5.1 miRNAs hiperexpressos.....	75
5.2 miRNAs hipoexpressos.....	78
5.3 Expressão de microRNAs e parâmetros clínicos	80
5.3.1 Expressão de microRNAs e idade das pacientes	80
5.3.2 Expressão de microRNAs e estado menopausal.....	81
5.3.3 Expressão de microRNAs e idade ao primeiro parto a termo	81
5.3.4 Expressão de microRNAs e tabagismo	83
5.4 Expressão de microRNAs e parâmetros histológicos	84
5.4.1 Expressão de microRNAs e tamanho tumoral	84
5.4.2 Expressão de microRNAs e invasão linfática.....	84
5.4.3 Expressão de microRNAs e invasão perineural.....	85
5.4.4 Expressão de microRNAs e componente intraductal.....	85
5.4.5 Expressão de microRNAs e estadiamento.....	86
5.4.6 Expressão de microRNAs e índices de KI-67	86
5.4.7 Expressão de microRNAs e receptor de estrogênio	87
5.4.8 Expressão de microRNAs e receptor de progesterona.....	89
5.4.9 Expressão de microRNAs e grau histológico	90
5.4.10 Expressão de microRNAs e grau nuclear	91
5.4.11 Expressão de miRNA e multicentricidade	91
5.4.12 Expressão de microRNAs e bilateralidade.....	92
6 CONCLUSÕES.....	94
7 ANEXOS.....	96
ANEXO A – Solicitação para Execução do Estudo.....	97
ANEXO B – Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	98
8 REFERÊNCIAS	101
9 APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µl	Microlitro
AGO2	Proteína Argonaute2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
cDNA	DNA complementar
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
dsRBD	<i>Double-stranded RNA-binding domain</i>
ER	Receptor de estrogênio
ErbB2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HMGA	Proteína de alta mobilidade do grupo A2
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
Ki-67	Proteína nuclear associada à proliferação celular
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LLC	Leucemia linfocítica crônica
miRNAs	MicroRNAs
mRNA	RNA mensageiro
Ng	Nanograma
p53	Proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa
pri-miRNAs	miRNAs primários
PTEN	<i>Fosfatase and tensin homologue</i>
Ran-GTP	Proteína nuclear que se liga ao GTP
GTP	Guanosina trifosfato
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNase III	Enzima endonuclease

siRNAs	<i>Short interfering RNAs</i>
snoRNA	RNAs nucleolares
snRNA	RNAs nucleares
TPM-1	Tropomiosina 1
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRBP	<i>Trans-activation response RNA-binding protein</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes da reação de transcrição reversa	35
Tabela 2	Componentes do mix para PCR	36
Tabela 3	Condições de ciclagem para PCR em tempo real	37
Tabela 4	Parâmetros clínicos das 33 pacientes avaliadas	41
Tabela 5	Parâmetros histológicos dos tumores das 33 pacientes avaliadas.....	42
Tabela 6	Parâmetros histológicos dos tumores das 33 pacientes avaliadas.....	43
Tabela 7	Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido tumoral	44
Tabela 8	Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido normal	45
Tabela 9	Valores do <i>fold-change</i> , intervalo de confiança, valor de p e <i>fold-regulation</i> nos 84 miRNAs avaliados	46
Tabela 10	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade – teste ANOVA	54
Tabela 11	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade – teste Post-hoc	54
Tabela 12	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade ao primeiro parto a termo – análise de grupos.....	55
Tabela 13	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade ao primeiro parto a termo – teste Post-hoc.....	56
Tabela 14	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com hábito tabagismo – análise de grupos.....	58
Tabela 15	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com hábito tabagismo – teste Post-hoc	58

Tabela 16	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o tamanho tumoral	60
Tabela 17	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com a presença de invasão linfática – análise de grupos.....	60
Tabela 18	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o estadiamento – análise de grupos	61
Tabela 19	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o estadiamento – teste Post-hoc.....	62
Tabela 20	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o índice de proliferação ki67	63
Tabela 21	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o percentual de positividade do receptor de estrogênio	64
Tabela 22	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o percentual de positividade do receptor de progesterona – análise de grupos	64
Tabela 23	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o percentual de positividade do receptor de progesterona – teste Post-hoc.....	66
Tabela 24	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o grau histológico- análise de grupos.....	68
Tabela 25	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o grau histológico – teste Post-hoc	68
Tabela 26	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o grau nuclear - análise de grupos.....	68
Tabela 27	Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com o grau nuclear –teste Post-hoc	70
Tabela 28	Diferença de expressão de miRNA de acordo com a presença de multicentricidade	71
Tabela 29	Diferença de expressão de miRNA de acordo com a presença de bilateralidade.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biogênese e processamento de miRNA.	7
Figura 2	Regulação gênica pelo miRNA (Lynam-Lennon, 2009).	12
Figura 3	Modelo dos mecanismos moleculares dos miRNAs envolvidos na patogênese do câncer.	20
Figura 4	Procedimento de desparafinização e extração de RNA. Extraído de MiRNeasy FFPE Handbook. 09/2010. Qiagen.	32
Figura 5	Conversão em DNA complementar. Extraído de Handbook 09/2010. Qiagen.	34
Figura 6	Casos bem sucedidos da extração de RNA total à quantificação de miRNA	40
Figura 7	Categorização de acordo com a expressão de 28 miRNAs entre CDI luminal A e parênquima mamário normal	50
Figura 8	Categorização hierárquica supervisionada de acordo com a expressão de cinco miRNAs	52

RESUMO

Mendes DCC. *Caracterização da expressão de microRNAs em carcinoma de mama receptores hormonais positivos e HER-2 negativo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: O câncer de mama é, em sua essência, uma doença genética. O acúmulo de alterações moleculares no genoma das células somáticas é a base para a progressão do câncer. Além de ter biologia natural mais favorável, os tumores com alta expressão de receptores de estrogênio têm terapia-alvo bem estabelecida. Apesar disso, as pacientes podem apresentar resistência medicamentosa, recidiva e óbito. Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenas moléculas não codificadoras de proteínas que regulam a expressão gênica durante a etapa de tradução. Esta regulação é feita pelo pareamento de bases com o mRNA-alvo (RNA mensageiro), resultando na supressão da tradução ou na clivagem do mRNA. Se os miRNAs têm como alvo genes supressores de tumor ou oncogenes, podem atuar como supressores tumorais ou oncogenes. **OBJETIVO:** avaliar a expressão de microRNAs, por PCR em tempo real, no carcinoma mamário ductal invasivo (CDI) com receptores hormonais positivos e HER-2 negativo (luminal A). **MÉTODOS:** Foram avaliados materiais em parafina de 33 pacientes com tumores luminal A, bem como tecido mamário histologicamente normal. Foram utilizados *kit* para extração de RNA de amostras fixadas e parafinadas – miRNeasy FFPE; *kit* para síntese de cDNA - miScript II RT; *kit* miScript SYBR Green PCR e miScript miRNA PCR Arrays para análise de 84 sequências de miRNA de câncer humano. Analisaram-se dados clínicos, como idade, paridade, amamentação, estado menopausal; variáveis histológicas, como tamanho do tumor, estado linfonodal, invasão linfática; características imunoistoquímicas, como expressão de Ki-67. Para a análise estatística utilizou-se o *software* miScript miRNA PCR Array Data Analysis, que

emprega o método de quantificação relativa $\Delta\Delta C_t$. RESULTADOS: A análise comparativa dos 33 casos de CDI luminal A com os 15 casos de parênquima mamário normal revelou haver microRNAs hiperexpressos, sendo eles: miR-96-5p (*fold-regulation* = 9,245, $p = 0,000192$), miR-182-5p (*fold-regulation* = 6,4813, $p = 0,00024$), miR-21-5p (*fold-regulation* = 6,3129, $p = 0,000001$), miR-210-3p (*fold-regulation* = 4,3584, $p = 0,001002$) e miR-7-5p (*fold-regulation* = 4,0166, $p = 0,036407$). Apontou, ainda, microRNAs com hipoexpressão, a saber: miR-204-5p (*Fold-regulation* = -8,2104, $p = 0,000000$), miR-125b-5p (*Fold-regulation* = -6,332, $p = 0,000000$), let-7c-5p (*Fold-regulation*: -4,5142, $p = 0,000000$) e let-7e-5p (*Fold-regulation* = -4,059, $p = 0,011625$): CONCLUSÕES: CDI luminal A apresentou hiperexpressão de miR-96-5p, miR-182-5p, miR-21-5p, miR-210-3p e miR-7-5p. Apontou, ainda, hipoexpressão do miR-204-5p, miR-125b-5p, let-7c-5p e let-7e-5p, permitindo diferenciá-lo do tecido normal.

Descritores: MicroRNAs; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Expressão gênica; Carcinoma ductal de mama/patologia; Carcinoma ductal de mama/genética; Prognóstico; Genes supressores de tumor; Imuno-histoquímica; Marcadores biológicos de tumor/análise; Neoplasias da mama/patologia.

SUMMARY

Mendes DCC. *Caracterização da expressão de microRNAs em carcinoma de mama receptores hormonais positivo e HER-2 negativo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: Breast cancer is a genetic disease and the accumulation of molecular alterations in the genome of somatic cells is the basis for cancer progression. Besides having a more favorable natural biology, tumors with high expression of estrogen receptor have a well established targeted therapy. Nevertheless, patients may present with resistance and eventually relapse and death. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding protein molecules that regulate gene expression during the translation stage. This adjustment is made by base pairing with the mRNA (messenger RNA) target resulting in suppression of translation or cleavage of the mRNA. Depending on whether miRNAs target tumor suppressor genes or oncogenes, they can act as tumor suppressors or oncogenes. OBJECTIVE: evaluate the expression of microRNAs by RT-PCR in positive hormonal receptors, negative HER 2 (luminal A) invasive ductal carcinoma (IDC). METHODS: Paraffin embedded tumor material from 33 patients with luminal A IDC, and histologically normal breast tissue. Were used: Kit for RNA extraction from fixed and paraffin embedded samples - miRNeasy FFPE; cDNA synthesis kit - miScript II RT; miScript SYBR Green PCR Kit and miScript miRNA PCR Arrays for analysis of 84 miRNA sequences of human cancer. Clinical data such as age, parity, breastfeeding, menopausal status; histological variables such as tumor size, lymph node status, lymphatic invasion; immunohistochemical characteristics, such as expression of Ki-67, were evaluated. For statistical analysis the miScript miRNA PCR Array Data Analysis software, which uses the method of relative quantification $\Delta\Delta Ct$, was used. RESULTS: A comparative analysis of 33 cases of luminal A IDC with 15 cases of normal breast parenchyma defined

microRNAs overexpressed, as follows: miR-96-5p (*fold-regulation* = 9,245, $p = 0,000192$), miR-182-5p (*fold-regulation* = 6,4813, $p = 0,00024$), miR-21-5p (*fold-regulation* = 6,3129, $p = 0,000001$), miR-210-3p (*fold-regulation* = 4,3584, $p = 0,001002$) and miR-7-5p (*fold-regulation* = 4,0166, $p = 0,036407$). Furthermore, microRNAs with reduced expression, as follows: miR-204-5p (*Fold-regulation* = -8,2104, $p = 0,000000$), miR-125b-5p (*Fold-regulation* = -6,332, $p = 0,000000$), let-7c-5p (*Fold-regulation*: -4,5142, $p = 0,000000$) and let-7e-5p (*Fold-regulation* = -4,059, $p = 0,011625$): CONCLUSION: Luminal A CDI breast cancer has shown overexpression of miR-96-5p, miR-182-5p, miR-21-5p, miR-210-3p and miR-7-5p. Also has shown, downregulation of miR-204-5p, miR-125b-5p, let-7c-5p e let-7e-5p, allowing differentiating it from normal tissue.

Descriptors: MicroRNAs; Real-time polymerase chain reaction; Gene expression; Carcinoma, ductal, breast/pathology; Carcinoma, ductal, breast/genetics; Prognosis; Genes, tumor suppressor; Immunohistochemistry; Tumor markers, biological/analysis; Breast neoplasms/pathology.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- Revisão da Literatura

1.1.1- Câncer como doença genética

O câncer é, em sua essência, uma doença genética. O acúmulo de alterações moleculares no genoma das células somáticas é a base para a progressão do câncer (Vogelstein *et al*, 2004). Nos últimos anos, a disponibilidade da sequência do genoma humano e o progresso nas tecnologias de sequenciamento de DNA alavancaram o conhecimento sobre essa afecção. O mapa completo do genoma normal humano, em 2004, aliado à construção do *HapMap* – polimorfismos de nucleotídeo simples – e o consequente delineamento da variação genômica natural permitiram catalogar as mutações somáticas em câncer. Esses projetos ofereceram uma oportunidade sem precedentes: a identificação das mudanças genéticas associadas ao câncer humano.

No entanto, a progressão DNA-RNA-proteína pode, em cada etapa, sofrer alterações que contribuam para a carcinogênese. Novos conceitos em epigenética, microRNAs e análise de expressão gênica afetaram profundamente o conhecimento da patogênese do câncer na última década.

Segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, o câncer de mama é comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. A estimativa de casos novos, no Brasil, em 2012, foi de 52.680. O número de mortes, em 2010, atingiu 12.705 mulheres e 147 homens. Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil. A sobrevida média após cinco anos na população de países desenvolvidos apresentou discreto aumento, atingindo 85%. Entretanto, nos países subdesenvolvidos, a sobrevida é de cerca de 60% (INCA, 2012).

Assim, o câncer de mama é considerada uma doença heterogênea fundamentalmente causada pelo acúmulo progressivo de alterações genéticas, incluindo mutações pontuais, amplificações cromossômicas, deleções, rearranjos, translocações e duplicações (Wood *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2010). Entre essas alterações estão incluídas aquelas que ocorrem no nível de transcrição e tradução. Toda esta diversidade na carcinogênese explica a heterogeneidade dos tumores malignos mamários.

Parte desta diversidade foi confirmada por análises moleculares realizadas por estudos da expressão genética que mostraram que cada tumor mamário tem sua própria identidade molecular.

A classificação do câncer de mama por parâmetros tradicionais foi acrescida de categorizações baseadas na expressão gênica. Entre as mais populares plataformas estão MammaPrint®, Oncotype DX®, o modelo de dois genes, o índice de graduação genômica e o modelo de subtipos intrínsecos. Este último contempla ampla informação biológica e permite uma classificação em subtipos: luminal A, luminal B, mama normal símile, HER-2/ErbB2 e basaloide (Sörlie *et al.*, 2001; Torsten *et al.*, 2004).

Esses subtipos refletem os padrões de expressão gênica dos dois principais tipos de células epiteliais do tecido mamário adulto normal:

- ✓ Células epiteliais luminais (que formam camada celular única margeando o lúmen de ductos e lóbulos);
- ✓ Células mioepiteliais (que formam uma segunda camada em torno das células luminais em contato direto com a membrana basal).

Muitos métodos vêm sendo aplicados em pesquisa para identificar esses subtipos intrínsecos. O set de genes PAM-50 é, geralmente, utilizado para a subclassificação molecular do câncer de mama baseada em expressão gênica. No entanto, marcadores imunoistoquímicos ainda são amplamente utilizados na prática clínica. Com o intuito de avaliar o grau de concordância entre estes dois métodos, foi identificado que a positividade

para o receptor de estrogênio por imunohistoquímica é fortemente associada ao subtipo luminal (A e B). O tipo luminal A definido pelo PAM 50 em 94% das vezes expressava receptor de progesterona. O grau de concordância em relação aos índices imunohistoquímicos de proliferação foi 89% (Bastien *et al.*, 2012).

Utilizando microarranjos de tecidos (TMAs), 1.006 pacientes com câncer de mama tiveram seus tumores classificados em subtipos moleculares principais por expressão de RE, RP, HER-2 e Ki-67. Os tumores luminal A eram bem diferenciados e coexpressavam os receptores hormonais comparados ao luminal B. O grupo HER-2 mostrava maior tamanho e mais metástases linfonodais. As pacientes do subtipo triplo negativo apresentavam idade mais jovem no momento do diagnóstico, maior tamanho, indiferenciação, alta proliferação e metástases viscerais frequentes. O pico de recorrência para luminal A foi 36 meses, enquanto o do triplo negativo e do HER-2 foram 12 meses. Luminal A mostrou a melhor sobrevida, mas não houve essa diferença nos outros subtipos. Quando considerado o acometimento linfonodal, o triplo negativo mostrou os piores resultados nas pacientes com linfonodos positivos. Na análise multivariada, luminal A permaneceu como significado de bom prognóstico (Park *et al.*, 2012).

Outros autores já haviam apontado os tumores luminal A como associados a baixo índice de recidivas regionais ou a distância (Voduk *et al.*, 2010).

Além de ter biologia natural mais favorável, os tumores com alta expressão de receptores de estrogênio têm terapia-alvo bem estabelecida. O papel do receptor de estrogênio como preditor da resposta ao tratamento endócrino já foi confirmado. O benefício desse tratamento foi proporcional ao nível de expressão do receptor de estrogênio. O receptor de progesterona foi de valor prognóstico tempo dependente e não foi validado como indicador de eficácia da terapêutica com tamoxifeno. Baixos níveis de expressão de RE, RP e positividade para HER-2 foram associados a resposta deficitária a qualquer terapia endócrina. Estudos moleculares recentes mostram que a

resposta ao tratamento endócrino é altamente dependente das vias relacionadas ao receptor de estrogênio (Rastelli *et al*, 2008).

Estas novas classificações não são completamente aplicáveis na prática clínica por falta de padronização e, também, por questões econômicas. No entanto, contribuíram para o melhor entendimento das vias de sinalização que regulam os processos de formação, manutenção e expansão dos tumores. Pesquisadores sabem mais sobre HER-2, receptor de estrogênio, IGF1R, PI3K/AKT, mTOR, AMPK e angiogênese, e esse conhecimento permitiu o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, ainda testados em ensaios clínicos (Eroles *et al*, 2012).

Mesmo com essas informações, os fatores prognósticos habituais não são completamente capazes de explicar as diferentes evoluções observadas em casos aparentemente similares do ponto de vista clínico-patológico. Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual se controem os diferentes fenótipos do câncer de mama, pesquisas abordam temas como metilação de DNA, acetilação de histonas, interferência de RNA e regulação gênica por miRNAs.

1.2- miRNA na regulação gênica

1.2.1- Definição de miRNA

O primeiro miRNA foi descrito em 1993 quando o RNA transcrito do gene lin-4 não era um codificador de proteínas e, mesmo assim, regulava o desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans*. Essa regulação se concentrava na capacidade do miRNA lin-4 de inibir a tradução do transcrito do gene lin-14 por meio de um pareamento de base na região 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA (Lee *et al*, 1993).

Surge assim o conceito de microRNAs (miRNAs): uma classe de RNAs não codificadores de proteínas que regulam a expressão gênica por pareamento de bases com RNAs mensageiros (mRNAs) alvos, resultando

em supressão da tradução ou quebra do mRNA (Lai *et al*, 2002; de Moor *et al*, 2005).

São membros de uma família de pequenos RNAs que possuem, tipicamente, 19 a 30 nucleotídeos. A esta família pertencem os pequenos RNAs nucleares (snRNA) que estão envolvidos no *splicing* de RNA, os pequenos RNAs nucleolares (snoRNA) que orientam a modificação do RNA ribossômico e os *short interfering* RNAs (siRNA) que são produzidos a partir de precursores de RNA com duplo cordão longo e, também, atuam na regulação da expressão gênica (Lynam-Lennon *et al.*, 2009)

1.2.2- Formação do miRNA

Os miRNAs maduros são produzidos por um processo complexo que se inicia no núcleo, em que os miRNAs primários (pri-miRNA) são transcritos pela RNA-polimerase II (Lee *et al*, 2002; Lee *et al*, 2004). Os pri-miRNA de algumas centenas a milhares de nucleotídeos são processados a um precursor de miRNA (pré-miRNA) de 70 a 85 nucleotídeos, em um evento mediado por Drosha, uma enzima RNAase III, e um cofator DGCR8 (Denli *et al*; Gregory *et al*, 2004). Posteriormente, pré-microRNAs são exportados ao citoplasma pela exportina 5 (Yi *et al*, 2003; Lund *et al*, 2004) e clivados pelo Dicer, outra enzima RNAase III, a uma dupla fita de microRNA com cerca de 22 nucleotídeos (Grishok *et al.*; Hutvagner *et al.*; Ketting *et al.*, 2001) (Figura 1).

A fita contendo ligação de hidrogênio menos estável no final 5' é o miRNA maduro que se integra ao complexo silenciador RNA-induzido (RISC), enquanto a outra fita parece ser degradada (Gregory *et al.*; Lin *et al.*, 2005). Foi sugerido que algumas proteínas sejam componentes essenciais do RISC, mediador do pareamento de bases entre miRNA e mRNA (Zhang *et al.*, 2007).

Figura 1 - Biogênese e processamento de miRNA

NOTA: MiRNAs maduros são produzidos por meio de um processo que começa no núcleo, em que miRNAs primários (pri-miRNA) são transcritos pela RNA polimerase II. Pri-miRNAs são convertidos em um precursor de miRNA (pré-miRNA) de 70 a 85 nucleotídeos, mediados por DROSHA, uma enzima RNAase III e seu cofator DGCR8. Posteriormente, pré-miRNAs são exportados ao citoplasma pela exportina-5 e, então, clivados pelo Dicer, outra enzima RNAase III, em um miRNA dupla hélice de cerca de 22 nucleotídeos. A fita contendo a ligação de hidrogênio menos estável no seu final 5' é o miRNA maduro, incorporado ao complexo silenciador RNA-induzido (RISC), enquanto a outra fita é degradada. Extraído de Khoshnaw SM *et al*, 2009

1.2.3 Principais técnicas utilizadas para investigar o miRNA

Extração de miRNA de tecidos fixados em formol e embebidos na parafina (FFPE). As amostras FFPE são de valor limitado ao analisar a expressão gênica devido ao dano e à alteração provocados ao mRNA durante a fixação e o processamento. Sugere-se que o RNA é submetido a modificações químicas induzidas pelo formol e à degradação adicional durante a armazenagem (Cronin *et al.*, 2004). Isto é devido, provavelmente, à ocorrência de ligações metil cruzadas entre RNA e proteínas durante o processamento do tecido. Apesar disso, pequenos RNAs são extraídos eficazmente pois parecem ser menos afetados por esse fenômeno. MiRNAs possuem melhor estabilidade e mantêm seu perfil de expressão confiável quando investigados a partir de amostras FFPE arquivadas comparadas a amostras congeladas (Li *et al.*, 2007). As concentrações de miRNA detectadas na extração de RNA total de FFPE utilizando *real-time* quantitativo PCR (RT-qPCR) foram maiores do que as isoladas de células congeladas. Isso pode significar que a análise de miRNA terá grande impacto na patologia diagnóstica rotineira (Khoshnaw *et al.*, 2009).

Análise Northern blot. Expressão gênica pode, confiavelmente, ser detectada pela concentração de mRNA usando a análise *northern blot*. Esta técnica tem sido usada para quantificar a expressão de miRNA em células tumorais (Hayashita *et al.*, 2005). Não tem boa sensibilidade, mas tem a habilidade de detectar, simultaneamente, as formas maduras e os precursores de miRNA (Jiang *et al.*, 2005). Uma das limitações é a eficiência de hibridização desigual de probes individuais (Thomson *et al.*, 2004). Também é difícil detectar múltiplos miRNAs concomitantemente.

Microarray miRNA. É importante comparar o padrão de expressão de todos os miRNAs conhecidos entre as células malignas e as células normais nos estudos do câncer; por essa razão, deve-se utilizar técnicas capazes de detectar a expressão de múltiplos miRNA simultaneamente. Tecnologia de *microarray* de DNA baseado em fluorescência de duas cores tem sido usada

para estudar os perfis de expressão gênica. Alguns laboratórios ajustaram essa técnica para desenvolver *microarrays* de miRNA (Thomsom *et al*; Babak *et al*; Barad *et al*, 2004).

Uma desvantagem da técnica de *microarray glass-side* é a possibilidade de hibridização cruzada de miRNAs com sequências muito parecidas (Thomson *et al*, 2004).

Perfil de expressão de miRNA por citometria de fluxo bead-based. Foi desenvolvido um método para avaliar o perfil de expressão de miRNA utilizando citometria de fluxo (Lu *et al*, 2005). As vantagens incluem acurácia potencializada, alta velocidade, implementação fácil e baixo custo. Posteriormente, a técnica foi aperfeiçoada e permitiu a detecção apenas de miRNAs maduros, utilizando gel de poliacrilamida nativo. Esta inovação pode ser apropriada para classificar os casos de câncer de mama por subtipos moleculares prognósticos (Blenkiron *et al*, 2007).

RT-qPCR. Esta técnica é suficientemente sensível para se quantificar moléculas simples. Foi desenvolvida uma técnica para detectar a expressão de miRNAs maduros na escala de, pelo menos, 7 log, específico para miRNAs maduros (Chen *et al*, 2005). Posteriormente, elaborou-se método que permitiu a avaliação simultânea de diversos miRNAs com uma quantidade de RNA total reduzido ao nível de uma única célula. Isto foi possível graças à implementação de uma técnica de pré-amplificação. Tal método mostra-se fundamental quando apenas poucas células de câncer estão disponíveis (Mestdagh *et al*, 2008).

1.2.4- Funções do miRNA

Foi sugerido que os genes de miRNA perfaçam 1% de todos os genes humanos (Lim *et al*, 2003) e que mais de um terço destes sejam alvos de microRNAs (Lewis *et al*, 2005). Os centros de pesquisa em carcinogênese

procuram elucidar os aspectos funcionais dos miRNAs nos cânceres humanos em geral e, especialmente, no câncer de mama.

Os miRNAs estão envolvidos em processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (Miska *et al*, 2005). Acredita-se que miRNAs possam prevenir a divisão celular e guiar a diferenciação final (Lu *et al*, 2005). Isso implica que a hipoexpressão de alguns miRNAs pode ter importância no desenvolvimento ou progressão do câncer (Lu *et al*, 2005).

Muitas proteínas celulares estão envolvidas nas funções regulatórias do miRNA, porém o papel exato e o mecanismo de ação de muitas delas ainda não foram determinados. Algumas dessas proteínas parecem ser componentes essenciais do RISC, que medeia o pareamento de bases dos miRNAs com mRNA (Zhang *et al*; Hock *et al*, 2007). A subunidade principal do RISC é a proteína Argonaute2 (Ago 2), que foi identificada como endonuclease catalítica do RISC humano (Liu *et al*, 2004; Peters *et al*, 2007).

Uma série de mecanismos propostos tentam explicar como os miRNAs controlam a tradução de mRNAs e regulam sua concentração. O grau de complementaridade entre a região 3'-UTR do mRNA-alvo e a chamada "região de semente" na extremidade 5' do miRNA determina o mecanismo pelo qual o miRNA regula o alvo (Figura 2). O RISC pode combinar com a 3' UTR do mRNA necessitando apenas de complementaridade imperfeita, resultando em repressão da tradução (Wightman *et al*, 1993; Olsen *et al*, 1999; Pilai *et al*, 2005). Este, geralmente, é o mecanismo em mamíferos. Caso o miRNA tenha complementaridade de sequência suficiente (quase perfeita) para o mRNA-alvo, então, a regulação ocorrerá por meio de um processo chamado interferência de RNA, em que o complexo RISC é dirigido para clivar o mRNA-alvo (Hutvagner e Zamore, 2002), pela ação da Ago2 (Llave *et al*, 2002; Esquela-Kerscher *et al*, 2006).

Também foi demonstrado que miRNAs podem inibir o início da tradução por meio da ligação das proteínas Ago ao m7G do mRNA, dessa forma, prevenindo sua ligação com o fator iniciador da tradução eIF4E (Kiriakidou *et al*, 2007).

A diminuição da regulação de genes-alvo por miRNAs é refletida ao nível da proteína, mas os níveis de mRNA permanecem inalterados, indicando que a regulação ocorre na tradução. Vários estudos forneceram provas de que a repressão translacional ocorre na fase pré-início da tradução (Humphreys *et al.*; Pillai *et al.*, 2005). No entanto, outros sugerem que a repressão ocorre pós-iniciação da tradução (Nottrott *et al.*; Petersen *et al.*, 2006).

Acredita-se que os corpos de processamento (*p-bodies*), estruturas citoplasmáticas envolvidas no armazenamento e na degradação de mRNAs, também desempenham papel na regulação do miRNA. Os miRNAs são responsáveis por guiar os mRNAs e as proteínas associadas do RISC para estas estruturas de armazenamento, processo que tem sido demonstrado como sendo uma consequência mais do que a causa da repressão de tradução causada pelo miRNA. Assim, os *p-bodies* atuariam como unidades de armazenamento para mRNAs reprimidos, protegendo os mRNAs reprimidos do maquinário de tradução (Eulalio *et al.*, 2007).

O processo de regulação do miRNA é extremamente dinâmico e a sua complexidade é aumentada pelo fato de a complementaridade perfeita para o alvo não ser necessária para a regulação, o que indica que um único miRNA pode regular vários genes-alvo. Os miRNAs de vertebrados fazem sinalização com cerca de 200 mRNA cada e uma simples sinalização pode ser coordenada por mais de um microRNA (Krek *et al.*, 2005). Isto faz com que a identificação de genes-alvo seja muito mais difícil. Por isso, as funções de muitos miRNAs ainda são desconhecidas (Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

Figura 2 - Regulação gênica pelo miRNA (Lynam-Lennon, 2009)

1.3- Perfil de miRNAs no câncer

A relação entre miRNAs e câncer foi evidenciada quando descreveram-se dois genes de miRNA, miR-16 e miR-15, que estão localizados em uma região do cromossomo 13 deletada em mais de 65% de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) (Callin, 2002). A ligação com o câncer foi reforçada com a descoberta de que o posicionamento genômico do miRNA parece ser não aleatório e que número significativo de genes de miRNA estão localizados em locais frágeis. Isto é regiões instáveis que têm sido associadas com a promoção da instabilidade do DNA em células cancerosas.

Genes que possam sofrer mutação que promova ganho de função ou potencialização de função levando à malignização são chamados de proto-oncogenes. Eles, geralmente, codificam proteínas promotoras de crescimento e proliferação. Mutações em genes que causem perda de função, levando à malignização, são mutações em genes supressores tumorais. Genes supressores tumorais em geral, codificam reguladores

negativos de crescimento e proliferação, ou seja, protegem células da malignização.

Enquanto mutações que criam oncogenes tendem a ser dominantes, as que ocorrem em genes supressores tumorais são, geralmente, recessivas. Mutações em genes supressores tumorais respeitam o modelo de carcinogênese *two-hit*. Ou seja, o fenótipo carcinogênico necessita mutação ou perda do segundo alelo, processo conhecido como perda da heterozigosidade. Alternativamente, um segundo alelo de um gene supressor tumoral pode ser silenciado epigeneticamente sem alteração direta no material genético.

A denominação “oncomirs” é utilizada para os miRNAs que apresentam expressão diferenciada em diversos tipos de cânceres humanos e que estão envolvidos na oncogênese. Aqueles regulados negativamente, em cânceres, têm sido considerados como prováveis supressores de tumor, enquanto os regulados positivamente foram classificados como oncogenes (Kent *et al.*, 2006; Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

A depender se o alvo do miRNA é um gene supressor tumoral ou um oncogene, eles podem agir como oncogenes ou supressores tumorais (Cimmino; O'Donnel; Johnson, 2005). Os miRNAs oncogênicos (p. ex.: miR-21 e miR-155) estão hiperexpressos em tecido tumoral (Iorio *et al.*; Chan *et al.*, 2005), enquanto os miRNAs supressores tumorais (p. ex.: let-7, miR-15 e miR-16) estão hipoexpressos (Calin *et al.*, 2002; Takamizawa *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005).

São experimentalmente oncogênicos o BIC/miR-155 (linfoma de pequenas células, mama, cólon, pulmão e tireoide); miR-21 (mama, cólon, glioblastoma, pulmão, pâncreas, estômago e próstata) e miR-372 (tumor de células germinativas de testículo). São experimentalmente supressores tumorais o miR-15 a e miR 16-1 (CLL, mieloma múltiplo, próstata); let-7 (mama, colo uterino, ovário e urotelial); miR-143 e miR-145 (mama, colorretal e síndrome mielodisplásica) (Cimmino *et al.*; O'Donnel *et al.*; Johnson *et al.*, 2005).

Iorio *et al.* (2005) demonstraram que os diferentes perfis de expressão de apenas 15 miRNAs conseguiam distinguir o tumor e o tecido normal, sem erros, em 76 amostras malignas e 10 amostras de tecidos normais da mama. Cinco miRNAs: miR-10b, miR-125b, miR-145, miR-21 e miR-155 foram os mais desregulados, com hipoexpressão de miR-10b, miR-125b e miR-145, e hiperexpressão de miR-21 e miR-155, visto no tecido maligno. Além disso, a expressão diferencial de miRNAs também atuou como marcador de características histopatológicas, como estadio tumoral, a capacidade de proliferação e invasão vascular. A desregulação de miR-145 e miR-21, que faziam parte do subconjunto de miRNAs que diferenciava tecido tumoral de normal, mostrou-se associada com a progressão do tumor.

O aumento de metástases linfonodais e da capacidade de proliferação associou-se à redução da expressão do let-7, sugerindo um papel para esse miRNA na progressão e no prognóstico do câncer. Blenkiron *et al.* analisaram 93 tumores da mama humanos e obtiveram dados que permitiram sugerir uma possível classificação do tecido tumoral com base na expressão diversa de miRNA nos subtipos luminal A, Luminal B, *basal-like* e HER-2 (Blenkiron *et al.*, 2007). Estes dados corroboraram as descobertas anteriores, que relataram correlação entre a desregulação de miRNA e tumores RE positivo e RE negativo em biópsias de câncer de mama (Mattie *et al.*, 2006). Esses autores também foram capazes de classificar os tumores ErbB2 + em dois subgrupos clínicos (ErbB2 + \ ER - e ErbB2 + \ ER +) com base na expressão diferencial de miRNAs, destacando possível papel para os miRNAs no diagnóstico de cânceres e de subtipos de câncer.

Participação de miRNAs em metástase de câncer de mama também foi sugerida. Seis miRNAs apresentaram-se hipoexpressos em células metastáticas do câncer da mama. Hiperexpressão de três destes miRNAs (miR-335, miR-126 e miR-206) foi relacionada com a redução da metástase da doença para pulmão e osso em ratos, o que indica um papel de repressão de metástases. Também foi observado *in vivo* que a redução da expressão de miR-335 e miR-126, em tumores primários, resulta em menor sobrevida livre de doença (Tavazoie *et al.*, 2008).

A existência de assinaturas de miRNA para o câncer da mama poderia diagnosticar malignidade e classificar o subtipo do tumor. O fato de os perfis de expressão de miRNA poderem classificar o subtipo tumoral tem implicações importantes, uma vez que podem vir a ser úteis como ferramentas de diagnóstico e terapêutica. Atualmente, o curso do tratamento do câncer da mama é determinado pelo estado de receptor HER2 e receptores hormonais do tumor, portanto, a classificação do subtipo pelo perfil miRNA pode ser importante na determinação de outros tipos de terapias-alvo.

Tão importante quanto definir o perfil de expressão de miRNAs é verificar se o mRNA-alvo é, de fato, regulado pelo miRNA com mudanças no perfil de expressão proteica. Com este intuito, após identificação de miRNAs diferencialmente expressos, busca-se desvendar o papel funcional destes miRNAs na carcinogênese.

O fato de um miRNA estar hipo ou hiperexpresso em um tipo tecidual tumoral específico não indica, necessariamente, que exista um envolvimento deste miRNA no processo da carcinogênese (Kent *et al.*, 2006). O indício de participação no processo tumorigênico, seja de forma oncogênica ou supressora, é reforçado quando coexistem, pelo menos, quatro evidências(Kent *et al.*, 2006):

- (a) dados que demonstrem desregulação do miRNA em diversos tipos de câncer;
- (b) demonstração de deleção, amplificação ou mutação que causem ganho ou perda de função do miRNA;
- (c) comprovação da supressão ou promoção da atividade tumoral em modelos animais;
- (d) identificação e verificação de alvos oncológicos relevantes que contribuam com o entendimento do mecanismo que o miRNA utiliza na oncogênese.

1.3.1- miRNAs e apoptose

A apoptose é um processo irreversível, essencial para o desenvolvimento normal e a homeostase, que regula de forma altamente programada a morte celular.

Parece haver um papel regulador dos miRNAs no processo apoptótico por meio de sua influência nas vias de sinalização. No entanto, estes mecanismos de interação ainda têm que ser completamente determinados.

A via de sinalização TRAIL envolve a ligação do TRAIL aos receptores de superfície de morte celular DR 4 e 5 (Degterev *et al.*, 2003). Após a ligação, o receptor trimeriza recruta a proteína adaptadora FADD e inicia a cascata de caspases que resulta em apoptose (Chinnaiyan *et al.*, 1995).

No entanto, algumas células tumorais exibem um fenótipo resistente a TRAIL. Garofalo *et al.* identificaram o miR-221 e o miR-222 como reguladores de sensibilidade a essa via em NSCLC (*non small cell lung cancer*) (Garofalo *et al.*, 2008). Nas células resistentes à TRAIL, a análise indicou expressão diferencial de sete miRNAs em comparação com as sensíveis. A hiperexpressão de dois destes miRNAs, miR-221 e miR-222, em células sensíveis, aumentou a resistência à morte induzida pela TRAIL em cerca de 40%, e reduziu a ativação das caspase-3 e caspase-8. Por outro lado, a inibição destes miRNAs em células resistentes resultou em um fenótipo sensível à TRAIL, o que indica um papel na determinação da sensibilidade celular a essa via.

O proto-oncogene Kit e o supressor tumoral p27^{KIP1} (Felli *et al.*, 2005; Galardi *et al.*, 2007) desempenham papel importante no ciclo celular e estão hipoexpressos nas células que apresentam resistência à TRAIL. A inibição e a superexpressão *in vitro* de miR-221 e miR-222 modulam a expressão de Kit e p27^{KIP1}, fortalecendo a evidência de que são genes alvos. O silenciamento de p27^{KIP1} aumenta a resistência celular à TRAIL, implicando um papel para esta proteína na manutenção da sensibilidade a essa via.

Estudo demonstrou que a regulação negativa da p27^{KIP1} pelo miR-221 e miR-222, em células de câncer de mama, confere resistência ao tamoxifeno (Miller *et al.*, 2008), sugerindo um papel comum para estes miRNAs no câncer de pulmão e de mama.

Há, portanto, forte evidência do papel dos miRNAs na regulação de importantes proteínas envolvidas nas vias da apoptose.

1.3.2- Regulação da apoptose por miRNAs por meio de sua ação sobre vias oncogênicas e supressoras tumorais

1.3.2.1- PDCD4

A PDCD4 (*programmed cell death 4*) é uma proteína supressora tumoral que, durante a apoptose, apresenta-se superexpressa. O miR-21 tem função reguladora sobre a PDCD4 (Lankat-Buttgereit *et al.*, 2003). Esta proteína inibe a transformação neoplásica induzida pela TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato), a promoção e a progressão tumoral. Na verdade, a PDCD4 está reprimida em uma série de cânceres humanos e sua hipoexpressão correlacionou-se com prognóstico ruim nos cânceres de pulmão e colorretal.

A inibição de miR-21 em células RKO de carcinoma de cólon resultou em aumento significativo da proteína PDCD4. Em contrapartida, a superexpressão do miR-21 em células Colo206f produziu o efeito oposto, indicando a regulação negativa da PDCD4 pelo miR-21 (Asangani *et al.*, 2008)

A regulação da PDCD4 por miR-21 também foi relatada em câncer de mama (Frankel *et al.*, 2008). Esta regulação ocorre ao nível da tradução e é mediada por interação direta na “região da semente” em células MCF-7 de câncer de mama.

1.3.2.2- TPM1

A tropomiosina 1 (TPM1) é um supressor tumoral que foi identificada como um alvo do miR-21. As proteínas deste grupo estabilizam o microfilamento do citoesqueleto. A desestabilização deste microfilamento é, muitas vezes, vista nas células tumorais e acredita-se estar ligada ao controle de crescimento (Boyd *et al.*, 1995). A TPM1 mostrou-se suprimida em células malignas, o que sugere participação no processo de transformação maligna (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Zhu *et al.*, 2007, demonstraram a regulação da TPM1 pelo miR-21 no câncer de mama. Quando se inibiu o miR-21 *in vitro*, houve aumento da expressão da proteína TPM1.

1.3.2.3- PTEN

A PTEN (*fosfatase and tensin homologue*) é um supressor tumoral que regula negativamente a proliferação e sobrevivência celular. O miR-21 é um regulador potencial da PTEN no carcinoma hepatocelular (HCC). Foi demonstrado que o miR-21 está hiperexpresso em tumores de HCC e em linhagens celulares (Meng *et al.*, 2007). Quando inibido *in vitro*, ocorreu aumento da expressão de PTEN, e houve diminuição das capacidades de migração, proliferação e invasão. No câncer de mama, a introdução e a inibição de miR-21 causam apenas mudanças sutis na expressão da PTEN (Frankel *et al.*, 2008), sugerindo que as funções de miR-21 podem ser diferentes em tipos de tecidos diversos. É interessante que o miR-21 parece regular diferentes proteínas supressoras tumorais, dependendo do tipo de tecido, o que sugere uma função oncogênica comum.

1.3.2.4- p53

O miR-34 é um importante componente da via supressora de tumor p53 (Bommer *et al.*; Chang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007a; 2007b). A p53 mantém a homeostase dos tecidos ao promover a parada do ciclo celular e a apoptose em resposta a sinais de estresse, muitos dos quais estão associados com o desenvolvimento e a progressão do câncer (Fridman e Lowe *et al.*; Oren *et al.*, 2003). A inibição da via p53 é uma característica comum da maioria dos cânceres (Janicke *et al.*, 2008). Quando se induz a expressão de miR-34, mimetizam-se os efeitos da p53, induzindo a parada do crescimento e apoptose (Bommer *et al.*; Chang *et al.*, 2007). Portanto, a família miR-34 é efetora positiva de p53, regulando genes antiapoptóticos e pró-apoptóticos (Hermeking *et al.*, 2007).

1.3.2.5- HMGA2

A proteína de alta mobilidade do grupo A2 (HMGA2) está hiperexpressa em vários tipos de câncer, por exemplo: gástrico, ovariano e pulmonar (Sarhadi *et al.*, 2006; Motoyama *et al.*, 2008).

HMGA2 está, frequentemente, sujeita a um rearranjo cromossômico que resulta na perda da região C-terminal, que poderia ser a causa da transformação celular. Este rearranjo provoca a separação da estrutura de leitura aberta e do 3'-UTR do transcrito do gene, o que sugere que a evolução neoplásica pode ser devido à perda dos elementos repressores na 3'-UTR (Borrmann *et al.*, 2001).

Existem sete locais alvos do let-7 dentro da 3'-UTR do HMGA2, indicando que let-7 desempenha papel na sua regulação (Shell *et al.*, 2007).

O let-7 inibe, portanto, a proliferação celular regulando negativamente o HMGA2. A interrupção desta regulação pode ser um evento importante na promoção do crescimento tumoral.

Os miRNAs desempenham papel importante na apoptose, e nas redes de oncogênese e supressão tumoral. Essa função se dá por meio da ação sobre importantes proteínas reguladoras envolvidas em vias de apoptose e sobrevivência (Figura 3). A desregulação dos miRNAs envolvidos nestes processos pode proporcionar um mecanismo para a iniciação, progressão e patogênese de muitos cânceres humanos. O conhecimento sobre a ação dos miRNAs traz informações para que se compreenda melhor os mecanismos de resistência à terapia e podem ser potenciais alvos de intervenção (Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

Figura 3 - Modelo dos mecanismos moleculares dos miRNAs envolvidos na patogênese do câncer.

NOTA: Agem regulando diretamente o crescimento celular ou indiretamente controlando a apoptose, tendo como alvo fatores de transcrição ou vias de sinalização. Neste modelo, o let-7, miR-15a e miR-16-1 funcionam como supressores tumorais, enquanto o miR-17-92, miR-155, miR-372 e miR-373 são considerados oncogenes. As linhas pontilhadas representam interações indiretas. As linhas contínuas em preto representam interações experimentalmente confirmadas. As azuis não foram confirmadas (Zhang *et al.*, 2007).

1.4- O perfil de expressão dos miRNAs no câncer de mama

Os perfis de expressão de miRNA são aberrantes no câncer de mama, em comparação com os tecidos mamários normais, com o miR-10b, miR-125b e miR-145 sendo hipoexpressos, enquanto o miR-21 e miR-155 são hiperexpressos. Além disso, as características biopatológicas do câncer de mama, como o estado de receptor de progesterona e estrogênio, o índice de proliferação, a invasão vascular e o estágio da doença parecem estar correlacionados com o perfil de expressão de miRNA (Iorio *et al.*, 2005).

Blenkiron *et al.*, em 2007, realizaram análise integrada de expressão de miRNA, expressão de mRNA e alterações genômicas em câncer de mama. Descobriram que muitos miRNAs foram diferencialmente expressos entre os subtipos moleculares *basal-like*, luminal A, luminal B, HER-2 + e tecido normal. Reconheceram a possibilidade de uma assinatura de miRNA que diferenciava os subtipos basal e luminais em suas amostras, e identificaram nove miRNAs diferencialmente expressos entre os subtipos luminal A e B (miR-100, miR-99a, miR-130, miR-126, miR-136, miR-146b, miR-15b, miR-107 e miR-103). As alterações na expressão de miRNA ocorreram, provavelmente, devido a alterações genômicas, modificações transcricional e pós-transcricional, e às alterações na expressão de enzimas envolvidas na biogênese do miRNA. Foi demonstrada associação significativa entre o perfil de expressão de miRNA e fatores clínicos, como estado do receptor de estrogênio e grau tumoral.

1.5- miRNAs e a resposta à terapia oncológica

Os mecanismos de escape à terapia medicamentosa representam um grande obstáculo ao tratamento bem-sucedido e à sobrevivência da paciente com diagnóstico de câncer. Dada a crescente evidência que aponta um papel para os miRNAs como reguladores de malignidade e apoptose, é possível que eles desempenhem papéis importantes na modulação da

resistência e da sensibilidade para os tratamentos de câncer mais comuns (Cummings *et al.*, 2004).

A forte sugestão de um papel para os miRNAs na modulação de fenótipos de sensibilidade e resistência à terapia citotóxica tem implicações para a terapia de câncer e destaca a importância de uma investigação, mais aprofundada bem como a validação de funções dos miRNAs.

Com o propósito de definir o perfil de expressão de miRNAs de carcinomas ductais invasores do subtipo molecular luminal A, foi desenvolvido este projeto de pesquisa de caracterizar estes tumores a partir da expressão quantificada por RT-PCR de 84 miRNAs.

2- OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o padrão de expressão de microRNAs em tumores de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor (CDI) de mama luminal A (receptor de estrogênio positivo, receptor de progesterona positivo, HER 2 negativo, Ki67 < 15%), em relação ao parênquima mamário normal.

2.2- Objetivos Específicos

Verificar se a expressão de miRNAs se relaciona às taxas de recidiva locorregional e de metástase a distância;

Verificar se a expressão de miRNAs se relaciona com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global;

Verificar se a expressão de microRNAs se relaciona com parâmetros clínicos, como amamentação, estado menopausal, idade, história familiar de câncer de mama e/ou ovário, idade no primeiro filho, paridade e tabagismo;

Verificar se a expressão de miRNAs se relaciona com parâmetros histológicos como multicentricidade, bilateralidade, índice de proliferação ki67, presença de componente *in situ*, invasão linfática, invasão perineural, tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, percentual de positividade do receptor de estrogênio, percentual de positividade do receptor de progesterona e estadiamento.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

Estudo descritivo de características de expressão de miRNA em câncer de mama luminal A foi definido por imunoistoquímica. Foram analisadas amostras teciduais provenientes de ressecção cirúrgica de carcinoma ductal invasivo de mama de pacientes tratadas e acompanhadas no Setor de Mastologia da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo a partir de 2002.

Foram avaliados material em parafina de tumor de 33 pacientes com as seguintes características: carcinoma ductal invasivo de mama, receptores de estrogênio e de progesterona positivos e HER 2 negativo com ki67 < 15%, bem como, tecido mamário histologicamente normal das mesmas pacientes.

Foram excluídos os casos em que houve acometimento linfonodal ou metastático à época do procedimento cirúrgico, bem como, as pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante.

3.2- Métodos

Após aprovação da CAPpesq, obtivemos os blocos parafinados de tumores das pacientes selecionadas. Os espécimes utilizados, fixados em formol e emblocados em parafina, foram dissecados para purificação do tecido tumoral sob orientação dos patologistas Dra. Ana Paula Torres e Dr. Fernando Nalesso Aguiar, sob técnica padronizada. O processo de extração, quantificação e análise da expressão de miRNA foi realizado no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58) da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação da bióloga Dra. Kátia Cândido Carvalho.

Para a extração de RNA de tecidos FFPE, foi utilizado o Qiagen miRNeasy FFPE®.

Para síntese de cDNA e quantificação relativa de miRNA, foram utilizados Qiagen kit miScript II RT®, Qiagen kit miScript SYBR Green PCR® e Qiagen miScript miRNA PCR Arrays®. A placa contém 96 poços assim distribuídos: 84 *primers* de miRNA, dois controles de extração de miRNA, seis *housekeeping* snRNAs, dois controles de reação de transcrição reversa, e dois controles positivos de PCR.

Mais especificamente, para identificar sequências de miRNA, utilizou-se o Qiagen Human Cancer miRNA PCR Array de câncer de mama (MIHS 109Z). Este define a expressão de 84 sequências de miRNA, cujos níveis potencialmente se relacionam com diagnóstico, estadiamento e prognóstico do câncer de mama, sendo prováveis reguladores de genes relacionados a este câncer. O *Human Breast Cancer miScript miRNA PCR Array®* permite definir o perfil de expressão de 84 miRNAs com expressão presumível ou conhecida alterada durante a iniciação ou progressão do câncer de mama. Esse *array* inclui miRNAs que estão desregulados em tumores receptores de estrogênio positivo ou em tumores resistentes a drogas. Os miRNAs com funções conhecidas no câncer de mama foram incluídos, assim como miRNAs potencialmente envolvidos, tanto via estudos de *microarray* quanto estudos por bioinformáticas de prováveis reguladores de genes relacionados ao câncer de mama.

O material foi analisado em equipamento de PCR em Tempo Real modelo ABI 7500 *Real Time PCR System*.

Os controles presentes na placa permitiram a análise usando método de quantificação relativa $\Delta\Delta CT$, averiguação da performance da transcrição reversa e do PCR.

Todos reagentes e placas são comercializados no Brasil exclusivamente pela Importação Indústria e Comércio Ambriex S.A.

O desfecho clínico desse grupo de pacientes foi acompanhado por consultas do Setor de Mastologia da Disciplina de Ginecologia no ICESP conforme registro em prontuário eletrônico.

Os custos da pesquisa foram financiados pela FAPESP sob Projeto número 2010/16824-4.

A seguir, os protocolos utilizados nas etapas de obtenção dos cortes de tecido, desparafinização, extração de RNA, conversão em c-DNA e RT PCR em tempo real, são descritos.

3.2.1- Preparo dos cortes de parafina para purificação de RNA

- As lâminas foram, previamente, marcadas pelo patologista para orientação da dissecação das amostras. Tumor e parênquima normal foram sempre dissecados em blocos diferentes;
- Foram obtidos cortes de tecido parafinado, cada um não ultrapassando 20 μm . Seções mais espessas poderiam resultar em rendimento menor de ácidos nucleicos, mesmo após incubação prolongada com proteinase K;
- Até 4 cortes, cada um com espessura de até 10 μm e uma superfície de até 250 mm^2 , podem ser combinados em uma preparação. Mais que 4 seções podem ser preparadas se a soma não ultrapassar 40 μm ;
- O excesso de material poderia sobrecarregar a coluna *RNeasy MinElute spin column*, e isso significaria rendimento e qualidade de RNA comprometidos.

3.2.2- Protocolo de desparafinização

3.2.2.1- Princípios

Primeiro, toda a parafina foi removida dos cortes recentes de tecidos parafinados por meio do tratamento com a solução de desparafinização.

Após, amostras foram incubadas em um tampão lítico otimizado, que contém proteinase K, para liberar RNA dos cortes. Uma breve incubação em altas temperaturas parcialmente reverte os *crosslinks* dos ácidos nucleicos, melhorando o rendimento e a qualidade do RNA, assim como a sua performance em *downstream enzymatic assays*.

Em seguida, tratamento otimizado com DNase para eliminar todo DNA genômico, incluindo fragmentos muito pequenos de DNA frequentemente presentes em tecidos parafinados de longa data. Após, o lisado foi misturado com tampão RBC. Etanol foi adicionado para permitir condições apropriadas de ligação do RNA.

A amostra foi colocada em RNeasy MinElute spin column, em que o RNA total, incluindo o miRNA, se liga à membrana e os contaminantes são eficientemente lavados. RNA Total, incluindo miRNA, é eluído, no mínimo, em 14 µl de RNase-free water. Definimos 17 µl de RNase-free water na primeira eluição, caso a concentração ultrapassasse 250ng/ µl, prosseguíamos com novas eluições.

3.2.2.2- Procedimentos

A seguir, descrevemos os detalhes do protocolo que foi utilizado:

1. Usando bisturi, aparou-se o excesso de parafina do bloco. Projetou-se a área da qual foram retirados os cortes parafinados de tecido para análise;
2. Cortaram-se seções de 5-20 µm de espessura, desprezando-se as primeiras 2 ou 3 seções;
3. Imediatamente, colocaram-se os cortes em tubos para microcentrifugação de 1,5 ml e fechou-se a tampa;
4. Adicionaram 160 µl de solução de desparafinização. Vortexou-se, vigorosamente, por 10 segundos, seguido por breve centrifugação, para levar a amostra para o fundo do tubo;

5. Incubação a 56°C por 3 min, depois, resfriamento até temperatura ambiente (15 a 25°C);
6. Adicionaram-se 150 µl do TAMPÃO PKD e misturou-se vortexando;
7. Centrifugou-se por 1 min a 10,000 rpm;
8. Adicionaram-se 10 µl proteinase K para a fase mais funda, clara. Misturou-se, gentilmente, pipetando para baixo ou para cima;
9. Incubou-se a 56°C por 15 min, depois, a 80°C por mais 15 min.

IMPORTANTE: assegurar que o *heating block* atinja 80°C antes de iniciar a incubação por 15 min. A incubação a 80°C é crítica para ótima performance de RNA nas aplicações RT-PCR.

A incubação a 80°C no tampão PKD parcialmente reverte as modificações formaldeído dos ácidos nucleicos. Incubação em tempos maiores pode resultar em RNAs mais fragmentados, mas também pode reduzir os valores de Ct em aplicações como RT-PCR.

10. Transferência da fase clara, mais funda para um novo tubo de microcentrifugação de 2 mL;
11. Incubação no gelo por 3 min. Após, centrifugou-se por 15 min a 13.500 rpm;
12. Transferência do supernadante para novo tubo de microcentrífuga, tomando cuidado para não perturbar o pellet (O pellet contém debris de tecido insolúveis, incluindo DNA *cross linked*);
13. Adicionou-se tampão DNase Booster equivalente a um décimo do total volume da amostra (aproximadamente, 16 µL) e 10 µl da solução DNase I *stock*. Inverteu-se o tubo para misturar. Centrifugação breve para coletar o líquido residual das paredes do tubo;
14. Incubação à temperatura ambiente por 15 min.;

15. Adicionaram-se 320 µl do TAMPÃO RBC para ajustar as condições de ligação e misturar o lisado completamente;
16. Adicionaram-se 1120 µl de etanol 100% à amostra e pipetou-se para misturar. Não centrifugou-se. Procedeu-se, imediatamente, ao passo 17;
17. Transferiu-se 700 µl da amostra, incluindo qualquer precipitado que tenha se formado ao RNeasy MinElute spin column localizado num tubo de 2 mL. Fechou-se a tampa gentilmente e centrifugou-se por 15 segundos a $\geq 10,000$ rpm. Descartou-se o flow-through.

Reutilizou-se o tubo da coleção no passo 18.

18. Repetiu-se o passo 17 até toda a amostra ter passado pelo RNeasy MinElute spin column.

Reutilizou-se o tubo da coleção no passo 19.

19. Adicionaram-se 500 µl TAMPÃO RPE ao RNeasy MinElute spin column. Fechou-se a tampa por 15 s a $\geq 10,000$ rpm. Descartou-se o *flow-through*;
20. Adicionaram-se 500 µl TAMPÃO RPE ao RNeasy MinElute spin column. Fechou-se a tampa, gentilmente, e centrifugou-se por 2 min a $\geq 10,000$ rpm) para lavar a membrana da coluna. Descartou-se o tubo da coleção com o *flow-through*;
21. Colocou-se o RNeasy MinElute spin column em um novo tubo da coleção de 2 mL. Abriu-se a tampa e centrifugou-se na velocidade máxima por 5 min. Descartou-se o tubo coletor com o *flow-through*;
22. Colocou-se o RNeasy MinElute spin column num novo tubo de coleção de 1,5mL. Adicionaram-se 17 µl de água livre de RNase diretamente à membrana da coluna. Fechou-se a tampa cuidadosamente e centrifugou-se por um minuto na velocidade

máxima para eluir o RNA. O volume morto do RNeasy MinElute spin column é 2 µl: eluição com 17 µl RNase-free water resultou em eluato de 15 µl.

Figura 4 - Procedimento de desparafinização e extração de RNA. Extraído de MiRNeasy FFPE Handbook. 09/2010. Qiagen.

3.2.2.3- Quantificação e qualificação da amostra obtida

Um microlitro (μL) do eluato de RNA obtido foi, então, submetido à leitura de concentração e determinação das razões 260/280 e 260/230 no aparelho Nanodrop. A determinação da concentração é necessária para saber se a quantidade de RNA extraído será suficiente para as etapas seguintes da reação (concentração inicial 250 ng/ μL). As razões devem ter valores próximas a 2.0 para sabermos que a contaminação da amostra com proteínas e fenóis é baixa, não atrapalhando, assim, as etapas seguintes do experimento.

3.2.3- Fase de transcrição reversa (conversão em cDNA)

3.2.3.1- Princípios

O cDNA preparado em uma reação de transcriptase reversa usando tampão miScript HiSpec serve como um molde/base para análise RT PCR usando miScript miRNA PCR Array (que contém *primers* de miRNAs específicos) e miScript SYBR Green kit, que contém miScript Universal Primer (primer reverso), e QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix.

Para determinar o perfil de expressão de miRNA, uma mistura de cDNA, miScript Universal Primer, QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix e RNase-free water é adicionada ao miScript miRNA PCR Array.

A Figura 5 resume a técnica de conversão em cDNA.

Figura 5 - Conversão em DNA complementar. Extraído de Handbook 09/2010. Qiagen.

3.2.3.2- Protocolo de conversão em cDNA

3.2.3.2.1- Procedimentos

- 1 Descongelar a solução/molde de RNA no gelo;
- 2 Descongelar a água livre de RNase, o 10x miScript Nucleics Mix e o 5x miScript HiSpec Buffer na temperatura ambiente (15-25°C);
- 3 Misturar cada solução petelecando os tubos. Centrifugar, brevemente, para coletar o líquido das paredes dos tubos e reservar no gelo;

- 4 Preparar a reação de transcriptase reversa NO GELO de acordo com a Tabela 1. Misturar gentilmente e reservar no gelo.

Nota: A mistura de transcriptase reversa contém todos os componentes necessários para síntese de cDNA, exceto a solução de RNA;

Tabela 1 - Componentes da reação de transcrição reversa

COMPONENTE	VOLUME
5x miScript HiSpec Buffer	4 µl
10x miScript Nucleics Mix	2 µl
RNase-free water	VARIÁVEL
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Template RNA	VARIÁVEL
TOTAL	20 µl

5. Adicionar solução de RNA em cada tubo contendo mistura master de transcriptase reversa. Misturar gentilmente, centrifugar brevemente e reservar no gelo;
6. Incubar por 60 minutos a 37°C;
7. Incubar por 5 minutos a 95°C para inativar o miScript Reverse Transcriptase Mix e colocar no gelo;
8. Diluir o cDNA em água livre de RNase (adicionar 200µl de água livre de RNase para cada 20µl da reação de transcrição reversa), e proceder a real-time PCR imediatamente.

3.2.4- Fase de PCR em tempo real

A reação de PCR deve começar com um passo inicial de incubação a 95°C para ativar a HotStarTaq DNA Polymerase (incluída na 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix).

Não vortexar a solução de cDNA ou quaisquer dos componentes do miScript SYBR Green PCR Kit.

Os volumes-padrão de reação do miScript miRNA PCR Array são 25 µl por poço para uma placa de 96-poços, e 20 µl por poço para a placa de 96 poços.

3.2.4.1- Protocolo para PCR

1. Descongelar o 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, o 10x miScript Universal Primer, a solução de cDNA e a água livre de RNase na temperatura ambiente (15–25°C). Misturar as soluções individualmente;
2. Preparar a reação de acordo com a Tabela 2 a seguir:

Tabela 2 - Componentes do mix para PCR

COMPONENTE	VOLUME
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375 µl
10x miScript Universal Primer	275 µl
RNase-free water	1000 µ
Template cDNA	100 µl
TOTAL	2750 µl

3. Cuidadosamente, removemos o miScript miRNA PCR Array de sua embalagem;
4. Se a reação estiver num tubo, transferi-la para o reservatório do RT2 PCR Array);
5. Adicionar 25 µl do mix da reação para cada poço da placa de 96 poços, com o auxílio de uma pipeta multicanal;
6. Cuidadosamente, feche o miScript miRNA PCR Array com as tiras ópticas;
7. Centrifugar a placa de PCR, por um minuto, a 1000g na temperatura ambiente para remover eventuais bolhas existentes nos poços. As bolhas podem atrapalhar a leitura;
8. Programar o cicladador de acordo com a Tabela 3.

Nota: Devido ao *hot start*, não é necessário manter as amostras no gelo enquanto programamos o ciclador.

Tabela 3 - Condições de ciclagem para PCR em tempo real

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	COMENTÁRIOS
Ativação inicial de PCR	15 minutos	95°C	<i>HotStarTaq DNA polymerase</i> é ativada por esta etapa de aquecimento.
03 passos de ciclagem:			
Desnaturação	15 segundos	94°C	
Recozimento	30 segundos	55°C	
Extensão	34 segundos	70°C	Realizar a coleta de dados de fluorescência.
Número do ciclo	40 ciclos		Número do ciclo depende da quantidade de molde de c-DNA e da abundância do alvo.

FONTE: Qiagen

9. Colocar a placa no ciclador e começar o programa de ciclos;
10. Realizar análise dos resultados.

3.2.5- Método Estatístico

Para caracterizar a população celular de câncer de mama receptores hormonais positivos e HER-2 negativo, de acordo com expressão de microRNA, foi utilizado o *software miScript miRNA PCR Array Data Analysis*, que usa o método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$. A análise estatística dos casos de tumor em comparação com o tecido normal foi feita por meio do *WEB based Data Analysis* no endereço eletrônico <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. A análise de subgrupos considerando aspectos clínicos e histológicos foi feita pelo método ΔCt , e os resultados dessa subanálise foram descritos a partir desses valores. Todas as análises foram precedidas de uma avaliação da normalidade da distribuição de cada variável frente à expressão dos microRNAs pelo teste

de Kolmogorov-Smirnov. Para as análises das variáveis com distribuição normal, foram utilizados os testes de T de Student (2 categorias) e ANOVA (3 categorias). Junto aos testes de testes de ANOVA, também foi feito um teste Post-Hoc que avalia entre quais dos grupos está a significância, caso ela exista. O teste Post-Hoc que foi utilizado foi o teste de Bonferroni. Para as análises das variáveis com distribuição não normal, foram utilizados os testes de Mann–Whitney (2 categorias) e Kruskal-Wallis (3 categorias).

Os cálculos ΔC_t e $\Delta\Delta C_t$ foram feitos da seguinte forma:

1. Cálculo diferença de $C(t)$ entre cada miRNA de interesse de cada placa e o controle normalizador (housekeeping gene=HKG):
 $\Delta C(t) = C(t)_{\text{miRNA}} - C(t)_{\text{HKG}}$
2. Cálculo média de $\Delta C(t)$ para cada miRNA entre todos os casos do grupo tumor e média de $\Delta C(t)$ do grupo de tecido normal: Média $\Delta C(t)_{\text{tumor}}$ e Média $\Delta C(t)_{\text{normal}}$;
3. Cálculo diferença das médias $C(t)$ para cada miRNA entre grupo tumoral e grupo normal: $\Delta\Delta C(t)$;
 $\Delta\Delta C(t) = \text{Média } \Delta C(t)_{\text{tumor}} - \text{Média } \Delta C(t)_{\text{normal}}$;
4. Cálculo Fold Change: $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$;
5. *Fold-Regulation* representa os resultados do *fold-change* com significado biológico. Valores de *fold-change* maiores que um indicam hiperexpressão e o *fold-regulation* é igual ao *fold-change*. Valores de *Fold-change* menores que um indicam hipoexpressão, e o *fold-regulation* é o inverso negativo do *fold-change*;
6. *Fold-regulation* igual a 2 significa que o miRNA é 2 vezes mais expresso no grupo tumoral quando comparado ao grupo normal. *Fold-regulation* igual a - 2 significa que o miRNA é 2 vezes menos expresso no grupo tumoral quando comparado ao grupo normal.

4- RESULTADOS

4- RESULTADOS

Foram selecionadas 59 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor reconhecido como luminal A por imunoistoquímica. Foram obtidos 43 blocos de tecido tumoral e 30 blocos de tecido normal. Dos 43 blocos de tecido tumoral, foram extraídas 35 amostras adequadas de RNA. Dos 30 blocos parafinados de tecido normal, foram extraídas 18 amostras adequadas de RNA.

Das 35 amostras de RNA de tecido tumoral, 33 PCRs em tempo real passaram no controle de qualidade da placa obtendo análise satisfatória da expressão de miRNA. Das 18 amostras com quantidade adequada de RNA total, 15 obtiveram quantificação de miRNA adequada por RT-PCR (Figura 6).

Foi avaliada, portanto, a expressão de miRNAs em 33 amostras de tumores luminal A e em 15 amostras de tecido mamário normal. Denominamos as amostras de parênquima mamário normal como grupo controle e os CDI luminal A como grupo 1.

Figura 6 – Fluxograma de estudo com casos bem-sucedidos da extração de RNA total à quantificação de miRNA

A Tabela 4 mostra os parâmetros clínicos dessas pacientes. Foram avaliados parâmetros como idade, paridade, estado menopausal, idade do primeiro parto, amamentação, história familiar e tabagismo (Tabela 4). As Tabelas 5 e 6 mostram os parâmetros histológicos dos tumores destas pacientes. Foram considerados: tamanho do tumor, estadiamento, invasão linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório, percentual de positividade para receptores de estrogênio e progesterona, índice Allred para positividade de receptores de estrogênio e progesterona, índice de proliferação Ki67, presença de componente *in situ* (Tabelas 5 e 6). As amostras de CDI luminal A que tiveram a expressão de miRNAS determinada obtiveram os valores de concentração de RNA e as razões de controle de qualidade das amostras (após as fases de desparafinização e extração de RNA), conforme discriminado na Tabela 7.

Tabela 4 – Parâmetros clínicos das 33 pacientes avaliadas

AMOSTRA	Idade	Paridade	Primeiro filho	Amamentação	Estado menopausal	tabagismo	História Familiar
LA4615	73	1	37 anos	sim	45 anos	pregresso	Não
LA854	77	0		não	40 anos	pregresso	Não
LA001	81	2			50 anos	não	Não
LA5211	52	2				sim	mãe. Irmã
LA925	63	2	31 anos	sim	48 anos	não	Não
LA186	89	3	25 anos	sim	50 anos	não	Não
LA3449	37	1	28 anos	sim	37 anos	pregresso	mãe.2 irmã
LA4884	38	2			39 anos	não	Não
LA5488	69	3			49 anos	não	Não
LA5559	61	0		não	45 anos	não	Não
LA3523							
LA834	73	2			pré	não	não
LA 46	71	2	36 anos	sim		não	não
LA7327	45	1	27 anos	sim	pré	não	não
LA5321	61	3	21 anos	sim	54 anos	não	não
LA5136	47	1			48 anos	não	não
LA6440	55	4			pré	não	ca de ovário irmã 49 anos

continua

							conclusão
AMOSTRA	Idade	Paridade	Primeiro filho	Amamentação	Status menopausal	tabagismo	História Familiar
LA1651	75	1			50 anos	não	não
LA9047	64	4	37 anos	não	45 anos	não	não
LA1414	71	0			54 anos	não	mama tia materna
LA5100	81	3				não	não
LA8522	57	3			pós	não	não
LA9315	66	4	28 anos		50 anos	pregresso	irmã
LA18413	71	4			44 anos	sim	não
LA19192		4	30 anos	sim	50 anos	não	não
LA12662	67	2			42 anos	pregresso	sim
LA18877	73	5			pós	pregresso	não
LA13334	56	2			pré	pregresso	não
LA12255	72	1	27 anos	sim	50 anos	não	não
LA15821	76	3	28	sim	50 anos	não	não
LA1302331	50	2	18	sim	48 anos	sim	não
LA1302145	67	4			52 anos	não	avó
LA5494		1	37 anos	sim	45 anos	pregresso	não

Tabela 5 - Parâmetros histológicos dos tumores das 33 pacientes avaliadas

AMOSTRA	Tamanho	Estadiamento	Invasão linfática	Invasão perineural	Grau histológico	Grau nuclear
LA4615	3	T2N0	não	sim	1	2
LA854	1,5	T1cN0	não	sim	1	2
LA001	1,6	T1cN0	não	não	1	2
LA5211	1,8	T1cN0	sim	sim	2	3
LA925	2,5	T2N0	não	não	3	3
LA186	2,5	T2N0	não	não	2	2
LA3449	1	T1bN0	não	não	2	2
LA4884	1,8	T1cN0	não	não	3	3
LA5488	0,9	T1bN0	não	não	2	2
LA5559	1,3	T1cN0	não	sim	2	2
LA3523						
LA834	2	T1cN0	não	sim	2	2
LA 46	1,3	T1cN0	não	não	2	2
LA7327	2.1 + 2.5	T2N0	sim	sim	2	2
LA5321	4.8	T2N0	sim	não	1	2

continua

AMOSTRA	Tamanho	Estadiamento	Invasão linfática	Invasão perineural	conclusão	
					Grau histológico	Grau nuclear
LA5136	2.3+1.6+ 0.8+0.6	T1cN0	não	não	2	3
LA6440	1.4	T1cN0	não	não	1	2
LA1651	1.5	T1cN0	não	sim	2	2
LA9047	0.9	T1cN0	não	não	1	2
LA1414	0,9	T1bN0	não	sim	1	2
LA5100	2.8	T2N0	não	não	2	2
LA8522	0,8	T1bN0	não	não	1	1
LA9315	1,3	T1cN0	não	não	1	2
LA18413	6	T3N0	não	não	2	2
LA19192	1,2	T1cN0	não	não	1	2
LA12662	1,5	T2N0	não	sim	2	3
LA18877	1	T1bN0	não	não	1	1
LA13334	1,8	T1cN0	não	sim	1	2
LA12255	1,2	T1cN0	não	não	2	3
LA15821	0,7	T1bN0	não	não	1	1
LA1302331	0,9	T1bN0	não	não	2	2
LA1302145	1,6	T1cN0	não	não	2	2
LA5494						

Tabela 6 - Parâmetros histológicos dos tumores das 33 pacientes avaliadas

AMOSTRA	RE	Allred	RP	Allred	CDIS	Ki67
LA4615	65%	6	10%	3	não	10%
LA854	100%		100%		sim	5%
LA001	90%	8	70%	7	sim	10%
LA5211	66%		66%		sim	14%
LA925	66%	8	66%	8	não	13%
LA186	90%	8	10%	5	sim	10%
LA3449	75%		75%		sim	5%
LA4884	11-33%	4	34 - 66%	6	sim	1%
LA5488	90%		80%		não	10%
LA5559	100%	8	80%	8	sim	10%
LA3523						
LA834	90%	8	0%		sim	5%
LA 46	100%		80%		sim	10%

continua

AMOSTRA	RE	Allred	RP	Allred	CDIS	conclusão
						Ki67
LA7327	95%	8	40%	5	sim	10%
LA5321	66%	8	66%	8	sim	6%
LA5136	66%	8	66%	8	sim	15%
LA6440	60%	6	60%	7	sim	10%
LA1651	66%		34-66%		sim	10%
LA9047	70%		75%		não	10%
LA1414	66%		10%		sim	10%
LA5100	66%	8	negativo		sim	13%
LA8522	66%	8	66%	8	sim	14%
LA9315	95%	8	95%	8	sim	10%
LA18413	95%	8	2%	4	sim	10%
LA19192	60%	8	60%	8	sim	10%
LA12662	90%	8	90%	8	sim	10%
LA18877	95%	8	95%	8	sim	1%
LA13334	95%	8	95%	8	não	10%
LA12255	100%	8	60%	7	sim	10%
LA15821	95%	8	95%	8	sim	5%
LA1302331	66%	8	66%	8	sim	14%
LA1302145	66%		66%		sim	14%
LA5494						

Tabela 7 - Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido tumoral

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (Ng/ MI)	260/280	260/230
LA 7327 T	67.2	2.03	2.12
LA 5100 T	162	1.96	1.67
LA 46 T	112	1.96	1.77
LA 834 T	226.8	1.99	1.62
LA 9047 T	97.4	1.87	1.66
LA 5321 T	184.6	1.94	1.59
LA 186 T	182.3	1.95	1.36
LA 5559 T	133.5	1.93	1.62
LA 0001 T	96.7	1.93	1.61-
LA 854 T	78.3	1.91	1.25
LA 925 T	145.8	1.93	1.71

continua

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (Ng/ MI)	conclusão	
		260/280	260/230
LA 1651 T	161.5	1.96	1.71
LA 4884 T	107.5	1.99	1.84
LA 6440 T	70.6	1.91	1.75
LA 5211 T	254.2	1.93	1.69
LA 5136 T	144.3	1.73	1.30
LA 1414 T	137.6	1.94	1.97
LA 3449 T	112.5	1.89	1.28
LA 5488 T	208.0	1.91	1.62
LA 4615 T	183.1	2.01	1.89
LA18877T	126.0	1.90	2.27
LA19192T	244.3	1.94	1.51
LA5494T	108.4	2.13	1.78
LA9315T	232.7	1.92	1.90
LA15821T	70.2	1.93	1.69
LA13334T	173.0	1.82	1.21
LA12662T	85,4	2.04	2.14
LA8522T	237.6	1.95	1.71
LA3523T	145.2	1.90	1.34
LA1302145T	242.7	1.95	1.55
LA18413T	140.5	1.92	1.38
LA1302331T	95.2	1.85	1.81
LA12225T	145.4	1.93	1.56

As amostras de parênquima mamário normal, que tiveram a expressão de miRNAs determinada, obtiveram os valores de concentração de RNA e as razões de controle de qualidade das amostras (após as fases de desparafinização e extração de RNA), conforme discriminado na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido normal

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (Ng/ MI)	260/280	260/230
LA 3449 N	111.2	1.98	1.72
LA 1414 N	51.3	1.51	0.67
LA 5100 N	38.9	1.97	1.64
LA 6440 N	47.1	1.93	1.40
LA 7327 N	32.3	2.04	1.88
LA 0001 N	31.8	1.93	1.60
LA 9047 N	15.1	1.86	1.66
LA7651 N	34.1	1.85	2.57
1954 N	48.4	1.91	1.43
6447 N	40.9	1.86	1.84
6514 N	60.6	1.90	1.61
45303 N	42.0	1.99	2.48
25872 N	34.1	1.93	1.17
3303 N	58.9	1.84	1.19
9073 N	36.0	1.89	1.75

Comparando-se a expressão de miRNA das 33 amostras de tecido luminal A com as 15 amostras de tecido normal, obtivemos os resultados descritos na Tabela 9.

Tanto na hiperexpressão quanto na hipoexpressão, foi considerado o *fold regulation* de 4,0 e o $p < 0,05$. Na hiperexpressão, o *fold change* é igual ao *fold regulation*, pois ambos traduzem em quantas vezes o grupo 1 está maior que o controle (resultado positivo). Na hipoexpressão, o valor do *fold regulation* é calculado dividindo o inteiro pelo valor do *fold change*, com resultado negativo. O *fold regulation* traduz em quantas vezes a amostra está hiper ou hipoexpressa comparando com o grupo controle.

Tabela 9 - Valores do fold-change, intervalo de confiança, valor de p e *fold-regulation* nos 84 miRNAs avaliados

mi-RNA	Fold-change	95%IC	p	Fold-regulation
hsa-let-7a-5p	0,3825	(0.00001, 1.08)	0,13264	-2,6141
hsa-let-7b-5p	0,5244	(0.21, 0.84)	0,023929	-1,9069
hsa-let-7c-5p	0,2215	(0.09, 0.35)	0	-4,5142
hsa-let-7d-5p	0,5033	(0.24, 0.77)	0,023129	-1,9868
hsa-let-7e-5p	0,2464	(0.04, 0.46)	0,011625	-4,059
hsa-let-7f-5p	0,5965	(0.19, 1.01)	0,426689	-1,6764
hsa-let-7g-5p	0,7493	(0.36, 1.14)	0,654874	-1,3345
hsa-let-7i-5p	0,7558	(0.39, 1.12)	0,145552	-1,323
hsa-miR-1	0,8376	(0.16, 1.51)	0,501836	-1,1939
hsa-miR-100-5p	0,4821	(0.21, 0.76)	0,016808	-2,0745
hsa-miR-107	1,7098	(0.88, 2.54)	0,105044	1,7098
hsa-miR-10a-5p	0,8043	(0.15, 1.45)	0,529552	-1,2432
hsa-miR-10b-5p	0,4458	(0.16, 0.74)	0,033694	-2,2432
hsa-miR-125b-5p	0,1579	(0.04, 0.27)	0	-6,332
hsa-miR-125b-1-3p	0,2996	(0.15, 0.45)	0	-3,3374
hsa-miR-128	0,7749	(0.31, 1.24)	0,602676	-1,2904
hsa-miR-129-5p	0,5445	(0.27, 0.82)	0,999373	-1,8364
hsa-miR-130a-3p	0,4241	(0.30, 0.55)	0,000009	-2,3577
hsa-miR-130b-3p	0,7949	(0.56, 1.03)	0,327604	-1,2581
hsa-miR-132-3p	0,6078	(0.41, 0.81)	0,01121	-1,6453
hsa-miR-140-5p	0,7775	(0.20, 1.35)	0,003257	-1,2862
hsa-miR-141-3p	3,1678	(1.93, 4.41)	0,000123	3,1678
hsa-miR-145-5p	0,3958	(0.27, 0.52)	0	-2,5263
hsa-miR-148a-3p	1,0747	(0.67, 1.48)	0,229002	1,0747
hsa-miR-152	1,1946	(0.78, 1.61)	0,215617	1,1946
hsa-miR-155-5p	1,4776	(0.88, 2.08)	0,052999	1,4776
hsa-miR-15a-5p	1,4593	(0.71, 2.21)	0,097306	1,4593
hsa-miR-15b-5p	1,5718	(0.94, 2.21)	0,006639	1,5718
hsa-miR-16-5p	2,003	(1.26, 2.74)	0,001522	2,003
hsa-miR-17-5p	0,9614	(0.65, 1.28)	0,775088	-1,0401
hsa-miR-181a-5p	2,4137	(1.62, 3.21)	0,000374	2,4137
hsa-miR-181b-5p	1,7228	(1.17, 2.28)	0,0089	1,7228
hsa-miR-181c-5p	1,857	(1.15, 2.56)	0,006554	1,857
hsa-miR-181d	1,5541	(1.08, 2.02)	0,022086	1,5541

continua

				conclusão
mi-RNA	Fold-change	95%IC	p	<i>Fold-regulation</i>
hsa-miR-182-5p	6,4813	(3.87, 9.10)	0,00024	6,4813
hsa-miR-186-5p	1,3182	(0.90, 1.74)	0,108532	1,3182
hsa-miR-18a-5p	1,783	(0.31, 3.25)	0,723715	1,783
hsa-miR-193b-3p	2,5028	(1.51, 3.50)	0,001702	2,5028
hsa-miR-195-5p	0,7788	(0.53, 1.02)	0,05253	-1,284
hsa-miR-199b-3p	0,9642	(0.58, 1.35)	0,771687	-1,0371
hsa-miR-199a-5p	1,8902	(1.12, 2.66)	0,008458	1,8902
hsa-miR-19a-3p	1,0751	(0.53, 1.62)	0,799404	1,0751
hsa-miR-19b-3p	0,9845	(0.53, 1.44)	0,976829	-1,0157
hsa-miR-200a-3p	3,1159	(1.82, 4.41)	0,000634	3,1159
hsa-miR-200b-3p	1,7664	(1.23, 2.30)	0,003857	1,7664
hsa-miR-200c-3p	1,9203	(1.45, 2.39)	0,001149	1,9203
hsa-miR-202-3p	0,9425	(0.49, 1.39)	0,339686	-1,061
hsa-miR-203a	1,4469	(0.73, 2.16)	0,101137	1,4469
hsa-miR-204-5p	0,1218	(0.06, 0.18)	0	-8,2104
hsa-miR-205-5p	0,2591	(0.12, 0.40)	0,002317	-3,8591
hsa-miR-206	1,964	(0.54, 3.38)	0,495538	1,964
hsa-miR-20a-5p	0,8828	(0.57, 1.19)	0,249093	-1,1328
hsa-miR-20b-5p	0,8103	(0.51, 1.11)	0,258972	-1,2341
hsa-miR-21-5p	6,3129	(4.07, 8.56)	0,000001	6,3129
hsa-miR-210-3p	4,3584	(2.76, 5.96)	0,001002	4,3584
hsa-miR-212-3p	1,3942	(0.92, 1.87)	0,251111	1,3942
hsa-miR-214-3p	1,0036	(0.69, 1.32)	0,490826	1,0036
hsa-miR-22-3p	2,7945	(1.50, 4.09)	0,000346	2,7945
hsa-miR-222-3p	0,7912	(0.55, 1.03)	0,942778	-1,2639
hsa-miR-223-3p	0,9959	(0.54, 1.45)	0,627147	-1,0041
hsa-miR-25-3p	1,0776	(0.72, 1.44)	0,524687	1,0776
hsa-miR-26a-5p	0,8581	(0.62, 1.09)	0,191739	-1,1653
hsa-miR-26b-5p	0,7699	(0.49, 1.05)	0,084166	-1,2989
hsa-miR-27a-3p	1,8062	(1.11, 2.50)	0,004177	1,8062
hsa-miR-27b-3p	1,3917	(0.98, 1.80)	0,022415	1,3917
hsa-miR-29a-3p	1,0282	(0.72, 1.33)	0,709409	1,0282
hsa-miR-29b-3p	2,0133	(1.41, 2.62)	0,005173	2,0133
hsa-miR-29c-3p	1,027	(0.16, 1.89)	0,032558	1,027
hsa-miR-31-5p	0,471	(0.23, 0.71)	0,305262	-2,1233

continua

				conclusão
mi-RNA	Fold-change	95%IC	p	<i>Fold-regulation</i>
hsa-miR-328	0,446	(0.31, 0.59)	0,000026	-2,2421
hsa-miR-340-5p	1,9664	(1.02, 2.92)	0,000047	1,9664
hsa-miR-424-5p	0,8503	(0.41, 1.29)	0,511787	-1,1761
hsa-miR-429	3,0172	(1.54, 4.50)	0,004312	3,0172
hsa-miR-485-5p	0,8454	(0.32, 1.38)	0,29088	-1,1829
hsa-miR-489	0,7961	(0.48, 1.11)	0,717419	-1,2561
hsa-miR-495-3p	1,4165	(0.00001, 3.37)	0,044133	1,4165
hsa-miR-497-5p	0,6649	(0.42, 0.91)	0,043311	-1,5039
hsa-miR-548c-3p	1,0169	(0.56, 1.47)	0,556419	1,0169
hsa-miR-607	0,7356	(0.37, 1.10)	0,095189	-1,3595
hsa-miR-613	1,1901	(0.78, 1.61)	0,316635	1,1901
hsa-miR-7-5p	4,0166	(1.39, 6.65)	0,036407	4,0166
hsa-miR-93-5p	2,0881	(1.37, 2.81)	0,000557	2,0881
hsa-miR-96-5p	9,245	(5.13, 13.36)	0,000192	9,245
hsa-miR-98-5p	2,2651	(1.33, 3.20)	0,005058	2,2651
cel-miR-39-3p	0,7844	(0.40, 1.17)	0,126677	-1,2749
cel-miR-39-3p	0,8	(0.41, 1.19)	0,143657	-1,2499
SNORD61	0,7743	(0.66, 0.89)	0,038068	-1,2916
SNORD68	0,6501	(0.56, 0.74)	0,000003	-1,5382
SNORD72	1,3572	(1.13, 1.59)	0,00617	1,3572
SNORD95	1,0603	(0.89, 1.23)	0,37657	1,0603
SNORD96A	1,1275	(1.01, 1.25)	0,042177	1,1275
RNU6-2	1,2244	(1.02, 1.43)	0,026781	1,2244
miRTC	1,4622	(0.75, 2.17)	0,092285	1,4622
miRTC	1,4874	(0.76, 2.21)	0,094824	1,4874
PPC	0,635	(0.30, 0.97)	0,046539	-1,5748
PPC	0,6301	(0.30, 0.96)	0,062886	-1,5869

NOTA: Em vermelho: miRNAs com *fold-regulation* >4 - hiperexpressos. Em azul: miRNAs com *fold-regulation* <-4 – hipoexpressos.

Considerando-se *fold-regulation* > 4 selecionamos 5 miRNAs hiperexpressos: miR-96-5p (*fold-regulation* = 9,245, p = 0,000192), miR-182-5p (*fold-regulation* = 6,4813, p = 0,00024), miR-21-5p (*fold-regulation* = 6,3129, p = 0,000001), miR-210-3p (*fold-regulation* = 4,3584, p = 0,001002) e. miR-7-5p (*fold-regulation* = 4,0166, p = 0,036407) (Gráfico 3). Em relação aos miRNAs hipoexpressos, quatro deles apresentaram *fold-regulation* < -4: miR-204-5p (*Fold-regulation* = -8,2104, p = 0,000000), miR-125b-5p (*Fold-*

Gráfico 1 - Gráfico de dispersão: em vermelho miRNAs hiperexpressos, em verde, os hipoexpressos ($p < 0.05$; *fold regulation* > 4 ou < -4)

Considerando-se a menor quantidade de miRNAs diferencialmente expressos entre grupo 1 (luminal A) e o grupo controle (parênquima mamário normal), temos a categorização hierárquica supervisionada a seguir baseada na expressão de miR 96-5p, miR-21-5p, miR-210-5p, miR-145-5p e miR-205-5p (Figura 8).

Figura 8 - Categorização hierárquica supervisionada de acordo com expressão de cinco miRNAs

Gráfico 2 - miRNAs hipoexpressos - diferenças de fold-change entre parênquima mamário normal e CDI luminal A

Gráfico 3 - miRNAs hiperexpressos - diferenças de fold-change entre parênquima mamário normal e CDI luminal A

4.1- Expressão de miRNAs e taxas de recidiva locorregional e de metástase a distância

Avaliamos a expressão de miRNA em dois casos de recidiva tumoral local. O número baixo de recidivas impossibilitou análise estatística comparativa entre expressão de miRNA e sobrevida livre de doença. Não foram observadas metástases a distância no tempo de seguimento das 33 pacientes. Também não foram observados óbitos na nossa casuística.

4.2- Expressão de miRNAs e Parâmetros clínicos

4.2.1- Expressão de microRNAs e idade das pacientes

As pacientes foram agrupadas de acordo com a idade em menores que 40 anos, de 40 a 60 anos e maiores de 60 anos. A análise de expressão de miRNA entre esses grupos revelou maior expressão do miR-129-5p no

grupo < 40 anos quando comparado ao grupo entre 40 e 60 anos ($p = 0$) e maior expressão no grupo < 40 anos quando comparado com o grupo > 60 anos ($p = 0$). Houve também maior expressão em relação ao miR 210-3p no grupo 40 a 60 anos comparado com > 60 anos ($p = 0,030$). Em relação ao miR 204-5p, este estava mais expresso na comparação < 40 anos x 40-60 anos ($p=0,007$) e menos expresso na comparação 40 a 60 anos x > 60 anos ($p = 0,036$) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade – análise de grupos

	< 40 anos (delta Ct/DP)	40-60 – anos (delta Ct/DP)	>60 anos (delta Ct/DP)
miR-129-5p	4,6 (1,13137)	8,65 (1,24900)	8,4 (1,03877)
miR-210-3p	2,65 (1,20208)	0,8 (0,49857)	1,54 (0,91738)
miR-204-5p	3,3500 (0,63640)	6,1500 (0,60945)	4,9762 (1,18021)

Tabela 11 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade – teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	p
miR-129-5p	< 40 anos	40-60 anos	-4,05000	0,000
		>60 anos	-3,80000	0,000
	40 – 60 anos	< 40 anos	4,05000	0,000
		>60 anos	0,25000	1,000
	>60 anos	< 40 anos	3,80000	0,000
		40-60 anos	-0,25000	1,000
miR-210-3p	< 40 anos	40-60 anos	1,85000	0,030
		>60 anos	1,10909	0,261
	40 – 60 anos	< 40 anos	-1,85000	0,030
		>60 anos	-0,74091	0,129
	>60 anos	< 40 anos	-1,10909	0,261
		40-60 anos	0,74091	0,129
miR-204-5p	< 40 anos	40-60 anos	-2,80000	0,007
		>60 anos	-1,62619	0,137
	40 – 60 anos	< 40 anos	2,80000	0,007
		>60 anos	1,17381	0,036
	>60 anos	< 40 anos	1,62619	0,137
		40-60 anos	-1,17381	0,036

4.2.2- Expressão de microRNAs e estado menopausal

As pacientes foram divididas em dois grupos em relação ao estado menopausal: doença diagnosticada na pré-menopausa ou na pós-menopausa. Foi verificado que o miR 222-3p era mais expresso no grupo pós-menopausa quando comparado ao grupo na pré-menopausa. (delta Ct: -1,15 x delta Ct: -0,43, $p=0,035$).

4.2.3- Expressão de microRNAs e paridade

A análise foi feita a partir da divisão das pacientes em três grupos: nulíparas, um parto, dois ou mais partos. Não foi verificada diferença significativa em relação à paridade e expressão de miRNA.

4.2.4- Expressão de microRNAs e amamentação

As pacientes foram divididas entre as que amamentaram e as que não amamentaram. Não foi verificada diferença significativa em relação à amamentação e expressão de miRNA.

4.2.5- Expressão de microRNAs e idade ao primeiro parto a termo

As pacientes foram divididas em < 25 anos, 25 a 35 anos e > 35 anos (Tabela 12). Foram encontradas diferenças significativas na expressão dos seguintes miRNAs: miR 10a-5p, miR 181a-5p, miR 181b-5p, miR 181c-5p, miR-29c-3p e miR 31-5p. Considerando como mais expressos aqueles com menores valores de delta Ct, conforme Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade ao primeiro parto a termo – análise de grupos

	< 25 anos	25 a 35 anos	>35 anos
miR-10a-5p	1,4 (0,14142)	0,3250 (1,28420)	1,42 (1,22979)
miR-181a-5p	-2,3 (0,54772)	-1,24 (0,62412)	-2,35 (0,70711)
miR-181b-5p	-1,3750(0,5058)	-0,1714(0,74992)	-1,6 (0,70711)
miR-181c-5p	-1,35 (0,58023)	-0,1571 (0,66045)	-1,55 (0,21213)
miR-29c-3p	-5,3 (0,79373)	-4,95 (0,81416)	-7,3 (1,27279)
miR-31-5p	0,95 (1,78606)	1,4 (0,68313)	4,15 (0,91924)

Tabela 13 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com idade ao primeiro parto a termo – teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	p
miR-10a-5p	< 25 anos	25-35 anos	-1,75357	0,136
		>35 anos	2,67500	0,091
	25 – 35 anos	< 25 anos	1,75357	0,136
		>35 anos	4,42857	0,003
	>35 anos	< 25 anos	-2,67500	0,091
		25-35 anos	-4,42857	0,003
miR-181a-5p	< 25 anos	25-35 anos	-1,05714	0,043
		>35 anos	0,05000	1,000
	25 – 35 anos	< 25 anos	1,05714	0,043
		>35 anos	1,10714	0,107
	>35 anos	< 25 anos	-0,05000	1,000
		25-35 anos	-1,10714	0,107
miR-181b-5p	< 25 anos	25-35 anos	-1,20357	0,055
		>35 anos	0,22500	1,000
	25 – 35 anos	< 25 anos	1,20357	0,055
		>35 anos	1,42857	0,077
	>35 anos	< 25 anos	-0,22500	1,000
		25-35 anos	-1,42857	0,077
miR-181c-5p	< 25 anos	25-35 anos	-1,19286	0,031
		>35 anos	0,20000	1,000
	25 – 35 anos	< 25 anos	1,19286	0,031
		>35 anos	1,39286	0,050
	>35 anos	< 25 anos	-0,20000	1,000
		25-35 anos	-1,39286	0,050

continua

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	conclusão
				p
miR-29c-3p	< 25 anos	25-35 anos	-0,34286	1,000
		>35 anos	2,00000	0,100
	25 – 35 anos	< 25 anos	0,34286	1,000
		>35 anos	2,34286	0,026
	>35 anos	< 25 anos	-2,00000	0,100
		25-35 anos	-2,34286	0,026
miR-31-5p	< 25 anos	25-35 anos	-0,45000	1,000
		>35 anos	-3,20000	0,028
	25 – 35 anos	< 25 anos	0,45000	1,000
		>35 anos	-2,75000	0,041
	>35 anos	< 25 anos	3,20000	0,028
		25-35 anos	2,75000	0,041

4.2.6- Expressão de microRNAs e história familiar de câncer de mama e/ou ovário

As pacientes foram divididas em com história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário, e sem antecedentes familiares de câncer de mama ou ovário. Não foi verificada diferença significativa em relação à história familiar de câncer de mama e/ou ovário, e expressão de miRNA.

4.2.7- Expressão de microRNAs e tabagismo

As pacientes foram avaliadas de acordo com hábito tabagismo em: ausente, pregresso e presente. Houve menor expressão dos miR 130b-3p e do miR181b-5p no grupo pregresso x tabagismo presente. Houve maior expressão do miR-193b-3p, do miR 199a-5p e do miR 613 no grupo que nunca fumou comparado ao grupo tabagismo presente. Houve menor expressão do miR 497-5p no grupo que nunca havia fumado comparado ao grupo com tabagismo pregresso (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com hábito tabagismo – análise de grupos

miRNA	tabagismo	N	Delta Ct	DP	P
miR-130b-3p	ausente	22	1,9409	0,61463	0,021
	pregresso	7	2,3571	0,56526	
	presente	3	1,1333	0,50332	
miR-181b-5p	ausente	22	-1,0045	0,88988	0,049
	pregresso	7	-,4000	0,73485	
	presente	3	-1,9000	0,78102	
miR-193b-3p	ausente	22	-1,0955	0,98100	0,023
	pregresso	7	-,4143	0,91548	
	presente	3	,4333	0,20817	
miR-199a-5p	ausente	22	-3,4000	0,70576	0,026
	pregresso	7	-3,6714	0,71114	
	presente	3	-4,6000	0,17321	
miR-497-5p	ausente	22	-1,0409	0,73657	0,022
	pregresso	7	-2,0286	0,94112	
	presente	3	-1,3333	0,51316	
miR-613	ausente	22	8,2909	0,89064	0,032
	pregresso	7	8,5286	0,91600	
	presente	3	9,8333	0,94516	

Tabela 15 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com hábito tabagismo – teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	P
miR-130b-3p	não	pregresso	-0,41623	0,358
		Sim	0,80758	0,109
	pregresso	Não	0,41623	0,358
		Sim	1,22381*	0,018
	sim	Não	-0,80758	0,109
		pregresso	-1,22381*	0,018
miR-181b-5p	não	pregresso	-0,60455	0,339
		Sim	0,89545	0,296
	pregresso	Não	0,60455	0,339
		Sim	1,50000*	0,049
	sim	Não	-0,89545	0,296
		pregresso	-1,50000*	0,049

continua

				conclusão
miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	P
miR-193b-3p	não	pregresso	-0,68117	0,311
		Sim	-1,52879*	0,038
	pregresso	Não	0,68117	0,311
		Sim	-0,84762	0,597
	sim	Não	1,52879*	0,038
		pregresso	0,84762	0,597
miR-199a-5p	não	pregresso	0,27143	1,000
		Sim	1,20000*	0,024
	pregresso	Não	-0,27143	1,000
		Sim	0,92857	0,176
	sim	Não	-1,20000*	0,024
		pregresso	-0,92857	0,176
miR-497-5p	não	pregresso	0,98766	0,019
		Sim	0,29242	1,000
	pregresso	Não	-0,98766	0,019
		Sim	-0,69524	0,605
	sim	Não	-0,29242	1,000
		pregresso	0,69524	0,605
miR-613	não	pregresso	-0,23766	1,000
		Sim	-1,54242	0,028
	pregresso	Não	0,23766	1,000
		Sim	-1,30476	0,133
	sim	Não	1,54242*	0,028
		pregresso	1,30476	0,133

4.3- Expressão de microRNAs e parâmetros histológicos

4.3.1- Expressão de microRNAs e tamanho tumoral

As pacientes foram divididas em tumores de até 2 cm e tumores de 2,1 a 5 cm. Verificou-se que miR-107 estava menos expresso no grupo até 2 cm ($p=0,005$), assim como miR-155-5p ($p=0,048$). O miR-497-5p, no entanto, estava mais expresso no grupo de até 2 cm ($p=0,003$)(Tabela 16).

Tabela 16 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com tamanho tumoral

miRNA	subgrupos	Delta Ct	DP	p
miR-107	Até 2 cm	3,6095	1,10630	0,005
	2,1 a 5 cm	2,3364	1,13514	
miR-155-5p	Até 2 cm	3,0952	0,98310	0,048
	2,1 a 5 cm	2,3727	0,85918	
miR-497-5p	Até 2 cm	-1,5905	0,80181	0,003
	2,1 a 5 cm	-0,7000	0,61968	

4.3.2- Expressão de microRNAs e invasão linfática

Observamos, no grupo com invasão linfática, hiperexpressão de miR-107 ($p=0,035$) e miR212-3p ($p=0,043$), hipoexpressão de miR-223-3p ($p=0,012$) e miR-497-5p ($p=0,028$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com presença de invasão linfática – análise de grupos

miRNA	subgrupos	Delta Ct	DP	P
miR-107	não	3,33	1,24014	0,035
	sim	2,02	0,71356	
miR-212-3p	não	2,73	0,75979	0,043
	sim	1,85	1,01489	
miR-223-3p	não	-1,08	1,12964	0,012
	sim	0,55	1,20692	
miR-497-5p	não	-1,40	0,81283	0,028
	sim	-0,42	0,63443	

4.3.3- Expressão de microRNAs e invasão perineural

Foi observada menor expressão do miR-130b-3p no grupo com invasão perineural (com invasão x sem invasão = 2,31 x 1,76; $p=0,032$) quando comparado ao grupo sem invasão.

4.3.4- Expressão de microRNAs e componente intraductal

Foi observada hiperexpressão dos miR-210-3p (CDISx CDI puro = 1,3 x 2,1; $p=0,038$) e miR-31-5p (1,11 x 2,58; $p=0,047$) no grupo com componente *in situ* comparado ao grupo sem componente *in situ*.

4.3.5- Expressão de microRNAs e estadiamento

Em relação ao estadiamento, dividimos as pacientes em T1bN0, T1cN0 e T2N0. Houve diferença da expressão com p significativo na análise de miR130a-3p na comparação T1bN0 x T1cN0 (-0,25 x -1,3; $p=0,015$); T1cN0 x T2N0 (-1,31 x 0,64; $p=0,012$). Houve, também, diferença significativa quando se comparou T1bN0 x T1cN0 na análise de expressão do miR155-5p (3,62 x 2,54; $p=0,046$) (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com estadiamento – análise de grupos

		n	Delta Ct	DP	p
miR-130-3p	T1bN0	7	-0,2571	0,46496	0,003
	T1cN0	15	-1,3133	0,64016	
	T2N0	10	-0,3400	1,04371	
miR-155-5p	T1bN0	7	3,6286	0,54685	0,048
	T1cN0	15	2,5400	0,97965	
	T2N0	10	2,7600	1,02654	

Tabela 19 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com estadiamento – teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	P
hsa_miR_130a_3p	T1bN0	T1cN0	1,05619	0,015
		T2N0	0,08286	1,000
	T1cN0	T1bN0	-1,05619	0,015
		T2N0	-0,97333	0,012
	T2N0	T1bN0	-0,08286	1,000
		T1cN0	0,97333	0,012
hsa_miR_155_5p	T1bN0	T1cN0	1,08857	0,046
		T2N0	0,86857	0,199
	T1cN0	T1bN0	-1,08857	0,046
		T2N0	-0,22000	1,000
	T2N0	T1bN0	-0,86857	0,199
	T1bN0	T1cN0	0,22000	1,000

4.3.6- Expressão de microRNAs e índices de Ki-67

Houve menor expressão de miR-129-5p no grupo com Ki67 maior que 10% (8,49) quando comparado ao grupo com Ki67 menor que 10% (7,27) com significância ($p=0,044$). Quando avaliamos a expressão de miR-210-3p, observa-se menor expressão no grupo com índice menor que 10% (2,04) quando comparado ao grupo com $Ki67>10\%$ (1,25), com $p=0,047$. (tabela 20)

Tabela 20 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com índice de proliferação ki67

miRNA	Ki67%	n	Delta Ct	DP	p
miR-129-5p	menor que 10%	7	7,2714	1,99225	0,044
	maior ou igual a 10%	25	8,4920	1,14197	
miR-210-3p	menor que 10%	7	2,0429	0,89788	0,047
	maior ou igual a 10%	25	1,2520	0,89028	

4.3.7- Expressão de microRNAs e receptor de estrogênio

As pacientes foram divididas de acordo com o percentual de positividade para receptor de estrogênio em dois grupos: até 90% e > 90%. Encontrou-se hiperexpressão no grupo até 90% dos seguintes miRNAs: miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181c-5p, miR-181d-5p, miR-212-3p, miR-328-3p, com $p < 0,05$. Houve hipoexpressão de miR-206 e miR-223-3p, com $p < 0,05$ no grupo com RE até 90%. (tabela 21)

Tabela 21 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com percentual de positividade do receptor de estrogênio

miRNA	%RE	N	Delta Ct	DP	p
miR-181a-5p	Até 90%	18	-2,2722	0,73948	0,008
	>90%	14	-1,5571	0,66067	
miR-181b-5p	Até 90%	18	-1,4167	0,76254	0,001
	>90%	14	-0,3643	0,75305	
miR-181c-5p	Até 90%	18	-1,3944	0,74713	0,001
	>90%	14	-0,4071	0,70543	
miR-181d-5p	Até 90%	18	2,3167	0,63454	0,001
	>90%	14	3,2143	0,79310	
miR-206	Até 90%	17	9,0471	3,38344	0,028
	>90%	14	8,0643	1,66577	
miR-212-3p	Até 90%	18	2,4278	0,95166	0,044
	>90%	14	2,8857	0,58159	
miR-223-3p	Até 90%	18	-0,4444	1,10252	0,022
	>90%	14	-1,4429	1,2302	
miR-328-3p	Até 90%	18	2,9111	0,73556	0,037
	>90%	14	3,4500	0,63700	

4.3.8- Expressão de microRNAs e receptor de progesterona

As pacientes foram divididas em relação à positividade do receptor de progesterona em 3 grupos: grupo 1: < 40%; grupo 2: 40-80% e grupo 3: >95%. Foi observada hiperexpressão do miR-17-5p($p=0,015$) e miR-20b-5p

($p=0,008$) comparando-se grupo 1 com grupo 2. Verificou-se hiperexpressão comparando grupo 1 x 3 dos seguintes miRNAs: miR-17-5p ($p=0,01$), let-7e-5p ($p=0,013$), let-7g-5p ($p=0,044$), miR-141-3p ($p=0,032$). miR-182-5p ($p=0,002$), miR-193b-3p ($p=0,028$), miR-20b-5p ($p=0,03$), miR-96-5p ($p=0,007$). Foi observada hiperexpressão no grupo 2 x grupo 3 em relação ao miR-182-5p ($p=0,012$), let-7b-5p ($p=0,047$), do miR-96-5p ($p=0,046$), do miR-181c-5p ($p=0,026$) e do miR-181d-5p ($p=0,035$) (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com percentual de positividade do receptor de progesterona – análise de grupos

miRNA	%RP	n	Delta Ct	DP	p
Let-7b-5p	1	7	-4,4714	1,54458	0,031
	2	19	-4,1421	1,37450	
	3	6	-2,0833	2,70216	
hsa_let_7e_5p	1	7	-1,4429	1,16456	0,007
	2	18	-0,9833	1,80335	
	3	6	1,5500	2,00474	
hsa_let_7g_5p	1	7	-3,7429	1,13263	0,046
	2	19	-2,3947	1,93203	
	3	6	-1,2333	1,58829	
hsa_miR_1	1	7	2,9857	3,59742	0,049
	2	19	5,4789	1,96570	
	3	6	6,3667	2,87935	
hsa_miR_107	1	7	2,1143	1,29284	0,002
	2	19	3,1053	0,81818	
	3	6	4,6167	1,14441	
hsa_miR_10a_5p	1	7	-0,5143	1,24556	0,044
	2	18	0,0056	1,80179	
	3	6	1,8000	1,66253	
hsa_miR_10b_5p	1	7	-0,1143	1,15820	0,049
	2	19	0,5632	1,76799	
	3	6	2,4000	2,52349	
hsa_miR_141_3p	1	7	-3,7857	0,64402	0,035
	2	19	-3,1474	1,13938	
	3	6	-2,0667	1,51085	
hsa_miR_152_3p	1	7	-0,2571	0,40356	0,039
	2	19	0,1684	0,67828	
	3	6	0,7167	1,11967	

continua

miRNA	%RP	n	Delta Ct	DP	conclusão
					p
hsa_miR_15a_5p	1	7	-1,7429	1,12080	0,009
	2	19	-0,6105	1,40511	
	3	6	1,1167	1,54456	
hsa_miR_17_5p	1	7	-2,3000	0,58310	0,006
	2	19	-1,3000	0,80760	
	3	6	-0,9833	0,66458	
hsa_miR_181c_5p	1	7	-1,2143	0,74929	0,021
	2	19	-1,1421	0,78267	
	3	6	-0,1000	0,86255	
hsa_miR_181d_5p	1	7	2,9571	0,85021	0,027
	2	19	2,4105	0,64970	
	3	6	3,3667	0,97091	
hsa_miR_182_5p	1	7	-,4714	0,87123	0,002
	2	19	,1632	0,95406	
	3	6	1,4667	0,67429	
hsa_miR_18a_5p	1	7	1,2571	0,61334	0,003
	2	19	2,1474	0,84088	
	3	6	2,9833	0,79603	
hsa_miR_193b_3p	1	7	-1,3571	1,16456	0,028
	2	19	-,8842	0,84870	
	3	6	,1000	0,95708	
hsa_miR_20a_5p	1	7	-3,5143	0,67188	0,036
	2	19	-2,6053	0,90214	
	3	6	-2,5500	0,67157	
hsa_miR_20b_5p	1	7	-1,8429	0,78710	0,007
	2	19	-0,7105	0,81302	
	3	6	-,6500	0,61237	
hsa_miR_7_5p	1	7	,7429	1,14580	0,692
	2	19	,6895	1,79130	
	3	6	1,3833	2,11416	
hsa_miR_93_5p	1	7	-2,1143	0,71747	0,031
	2	19	-1,5526	0,80854	
	3	6	-0,9667	0,42740	
hsa_miR_96_5p	1	7	-0,8000	0,62716	0,008
	2	19	-0,0737	1,29822	
	3	6	1,2667	0,77374	

Tabela 23 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com percentual de positividade do receptor de progesterona – teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	p
hsa_let_7b_5p	1	2	-0,32932	1,000
		3	-2,38810	0,054
	2	1	0,32932	1,000
		3	-2,05877	0,047
	3	1	2,38810	0,054
		2	2,05877*	0,047
hsa_let_7e_5p	1	2	-0,45952	1,000
		3	-2,99286	0,013
	2	1	0,45952	1,000
		3	-2,53333	0,013
	3	1	2,99286*	0,013
		2	2,53333*	0,013
hsa_let_7g_5p	1	2	-1,34812	0,269
		3	-2,50952	0,044
	2	1	1,34812	0,269
		3	-1,16140	0,492
	3	1	2,50952	0,044
		2	1,16140	0,492
hsa_miR_141_3p	1	2	-0,63835	0,639
		3	-1,71905	0,032
	2	1	0,63835	0,639
		3	-1,08070	0,153
	3	1	1,71905	0,032
		2	1,08070	0,153
hsa_miR_17_5p	1	2	-1,00000	0,015
		3	-1,31667	0,010
	2	1	1,00000	0,015
		3	-0,31667	1,000
	3	1	1,31667*	0,010
		2	0,31667	1,000
hsa_miR_181c_5p	1	2	-0,07218	1,000
		3	-1,11429	0,051
	2	1	0,07218	1,000
		3	-1,04211	0,026
	3	1	1,11429	0,051
		2	1,04211	0,026

continua

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	conclusão
				p
hsa_miR_181d_5p	1	2	0,54662	0,341
		3	-0,40952	1,000
	2	1	-0,54662	0,341
		3	-0,95614	0,035
	3	1	0,40952	1,000
		2	0,95614	0,035
hsa_miR_182_5p	1	2	-0,63459	0,358
		3	-1,93810	0,002
	2	1	0,63459	0,358
		3	-1,30351	0,012
	3	1	1,93810	0,002
		2	1,30351	0,012
hsa_miR_193b_3p	1	2	-0,47293	0,795
		3	-1,45714	0,028
	2	1	0,47293	0,795
		3	-0,98421	0,100
	3	1	1,45714	0,028
		2	0,98421	0,100
hsa_miR_20b_5p	1	2	-1,13233	0,008
		3	-1,19286	0,030
	2	1	1,13233	0,008
		3	-0,06053	1,000
	3	1	1,19286	0,030
		2	0,06053	1,000
hsa_miR_93_5p	1	2	-0,56165	0,287
		3	-1,14762	0,027
	2	1	0,56165	0,287
		3	-0,58596	0,301
	3	1	1,14762	0,027
		2	0,58596	0,301
hsa_miR_96_5p	1	2	-0,72632	0,448
		3	-2,06667	0,007
	2	1	0,72632	0,448
		3	-1,34035	0,046
	3	1	2,06667	0,007
		2	1,34035	0,046

4.3.9- Expressão de microRNAs e grau histológico

As pacientes foram avaliadas também de acordo com o grau histológico e foi observado que miR-27a-3p estava hiperexpresso no grupo com grau histológico 1 x 3 ($p=0,046$). (tabela 24 e 25)

Tabela 24 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com grau histológico- análise de grupos

miRNA	subgrupos	n	Delta Ct	p
hsa_miR_22_3p	1	13	-3,8846	0,65428
	2	17	-3,4706	0,67153
	3	2	-2,5500	1,62635
hsa_miR_27a_3p	1	13	-4,8692	0,61831
	2	17	-4,4294	0,77360
	3	2	-3,4500	1,06066
hsa_miR_29a_3p	1	13	-4,6077	0,78045
	2	17	-3,9353	0,86164
	3	2	-3,1000	0,70711
hsa_miR_497_5p	1	13	-1,7308	0,77608
	2	17	-1,0118	0,80923
	3	2	-0,7000	0,42426

Tabela 25 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com grau histológico – teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	p
hsa_miR_27a_3p	1	2	-0,43982	0,333
		3	-1,41923	0,046
	2	1	0,43982	0,333
		3	-0,97941	0,245
	3	1	1,41923	0,046
		2	0,97941	0,245

4.3.10- Expressão de microRNAs e grau nuclear

As pacientes foram avaliadas de acordo com o grau nuclear. Observou-se que houve hipoexpressão do miR-107 no grupo com grau nuclear 1 x 2 (4,73 x 2,83; $p=0,033$), assim como do miR-10b-5p (3,13x 0,16; $p=0,027$), do miR-15a-5p (1,5 x -0,86; $p=0,049$) e do miR-199b-3p (-2,5 x -4,53; $p=0,01$). Houve hiperexpressão do miR-10a-5p no grupo com grau nuclear 2 x 3 (-0,29 x 1,88; $p=0,032$). (tabelas 26 e 27)

Tabela 26 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com grau nuclear – análise de grupos

miRNA	subgrupos	n	Delta Ct	p
hsa_miR_100_5p	1	3	-0,4667	1,07858
	2	23	-2,3696	1,56566
	3	6	-0,9000	1,27279
hsa_miR_107	1	3	4,7333	1,32035
	2	23	2,8348	1,16057
	3	6	3,6833	0,94322
hsa_miR_10a_5p	1	3	1,5667	1,27410
	2	23	-0,2957	1,67019
	3	5	1,8800	1,40961
hsa_miR_10b_5p	1	3	3,1333	0,95044
	2	23	0,1652	1,75256
	3	6	1,8500	1,83494
hsa_miR_152_3p	1	3	1,1667	0,80208
	2	23	-0,0174	0,69325
	3	6	0,4333	0,71181
hsa_miR_15a_5p	1	3	1,5000	2,10713
	2	23	-0,8652	1,47913
	3	6	-0,2833	1,36882
hsa_miR_199b_3p	1	3	-2,5000	0,20000
	2	23	-4,5304	1,08604
	3	6	-4,0833	1,01472
hsa_miR_203a	1	3	3,8333	1,05987
	2	23	1,4000	1,83080
	3	6	1,0000	0,37417

Tabela 27 - Diferença de expressão de miRNA entre subgrupos de acordo com grau nuclear –teste Post-hoc

miRNA	A	B	Ct (A) – Ct (B)	p
hsa_miR_107	1	2	1,89855 [*]	,033
		3	1,05000	,607
	2	1	-1,89855 [*]	,033
		3	-,84855	,344
	3	1	-1,05000	,607
		2	,84855	,344
hsa_miR_10a_5p	1	2	1,86232	,210
		3	-,31333	1,000
	2	1	-1,86232	,210
		3	-2,17565 [*]	,032
	3	1	,31333	1,000
		2	2,17565 [*]	,032
hsa_miR_10b_5p	1	2	2,96812 [*]	,027
		3	1,28333	,904
	2	1	-2,96812 [*]	,027
		3	-1,68478	,125
	3	1	-1,28333	,904
		2	1,68478	,125
hsa_miR_15a_5p	1	2	2,36522 [*]	,049
		3	1,78333	,319
	2	1	-2,36522 [*]	,049
		3	-,58188	1,000
	3	1	-1,78333	,319
		2	,58188	1,000
hsa_miR_199b_3p	1	2	2,03043 [*]	,010
		3	1,58333	,118
	2	1	-2,03043 [*]	,010
		3	-,44710	1,000
	3	1	-1,58333	,118
		2	,44710	1,000

4.3.11 Expressão de microRNAs e multicentricidade

Comparou-se os casos de tumores multicêntricos com tumores únicos e foi verificada menor expressão de miRNAs nos casos multicêntricos: miR-429 (2,73 x -0,2897; p=0,005), miR-96-5p (1,46 x -0,13; p=0,036), miR-200a-3p (0,5 x -2,33; p=0,001), entre outros. (tabela 28)

Tabela 28 - Diferença de expressão de miRNA de acordo com presença de multicentricidade

miRNA	grupo	n	Delta Ct	DP	p
hsa_let_7f_5p	não	29	-1,9138	1,97823	0,019
	sim	3	1,2333	3,37095	
hsa_miR_128_3p	não	28	1,9679	1,63980	0,042
	sim	3	4,1667	2,33524	
hsa_miR_130a_3p	não	29	-0,9103	0,74897	0,007
	sim	3	0,5000	1,38564	
hsa_miR_145_5p	não	29	-3,6759	0,72193	0,019
	sim	3	-2,5333	1,17189	
hsa_miR_15a_5p	não	29	-0,7138	1,58649	0,025
	sim	3	1,2000	0,79373	
hsa_miR_16_5p	não	29	-4,7448	0,73319	0,013
	sim	3	-3,0667	0,96090	
hsa_miR_17_5p	não	29	-1,5759	0,80341	0,014
	sim	3	-0,3333	0,50332	
hsa_miR_186_5p	não	29	-0,4897	0,73889	0,018
	sim	3	0,6333	0,70238	
hsa_miR_195_5p	não	29	-4,0897	0,79792	0,015
	sim	3	-2,6333	0,15275	
hsa_miR_19a_3p	não	29	-2,8621	0,93060	0,007
	sim	3	-0,3667	1,06927	
hsa_miR_19b_3p	não	29	-2,6034	0,86126	0,006
	sim	3	-0,2333	1,05040	
hsa_miR_200a_3p	não	29	-2,3379	1,28436	0,001
	sim	3	0,5000	1,82483	
hsa_miR_20a_5p	não	29	-2,9310	0,77464	0,004
	sim	3	-1,4667	0,90738	

continua

miRNA	grupo	n	Delta Ct	DP	conclusão
					p
hsa_miR_20b_5p	não	29	-1,0690	0,83670	0,02
	sim	3	0,2333	0,49329	
hsa_miR_22_3p	não	29	-3,6966	0,64724	0,006
	sim	3	-2,4667	1,15902	
hsa_miR_26a_5p	não	29	-5,7414	0,76135	0,004
	sim	3	-4,2000	1,44222	
hsa_miR_26b_5p	não	29	-4,5966	1,06653	0,042
	sim	3	-3,2000	1,31149	
hsa_miR_27a_3p	não	29	-4,6828	0,64147	0,001
	sim	3	-3,2333	1,01160	
hsa_miR_29a_3p	não	29	-4,3138	0,78999	0,005
	sim	3	-2,6333	0,35119	
hsa_miR_29b_3p	não	29	-4,1483	1,04936	0,007
	sim	3	-2,3333	0,41633	
hsa_miR_29c_3p	não	29	-5,6034	0,89781	0,019
	sim	2	-3,6000	0,00000	
hsa_miR_424_5p	não	29	-2,2138	1,01444	0,013
	sim	3	-0,6000	0,85440	
hsa_miR_429	não	29	-0,2897	1,59740	0,005
	sim	3	2,7333	2,20303	
hsa_miR_497_5p	não	29	-1,4034	0,79619	0,015
	sim	3	-0,1333	0,37859	
hsa_miR_548c_3p	não	28	9,4821	1,21748	0,048
	sim	3	11,0333	1,48436	
hsa_miR_96_5p	não	29	-0,1310	1,21629	0,036
	sim	3	1,4667	0,87369	

4.3.12 Expressão de microRNAs e bilateralidade

Foram comparadas as expressões de miRNA entre casos de tumor unilateral e bilateral. Verificou-se maior expressão de let-7a-5p ($p=0,040$) e menor expressão miR-98-5p ($p=0,043$) nos casos de tumor bilateral. (tabela 29)

Tabela 29 - Diferença de expressão de miRNA de acordo com presença de bilateralidade

miRNA	grupo	n	Delta Ct	DP	p
hsa_let_7a_5p	não	25	-3,9120	2,04824	0,040
	sim	4	-5,0250	0,58523	
hsa_miR_98_5p	não	27	0,5704	1,15453	0,043
	sim	5	1,3000	0,52915	

5- DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Sabe-se que a concordância entre as definições dos subtipos moleculares intrínsecos baseados em expressão gênica e em marcadores imunoistoquímicos não é perfeita. Os modelos que utilizam expressão gênica são preditores de prognóstico mais fidedignos. No entanto, vimos que os marcadores imunoistoquímicos receptor de estrogênio, receptor de progesterona e índices de proliferação conseguem selecionar o subtipo luminal A com boa acurácia. Alguns autores sugerem que o parâmetro receptor de progesterona > 20% seja incluído para a classificação imunoistoquímica de tumores luminal A (Prat *et al.*, 2013).

Os subtipos definidos por imunoistoquímica mostram características, padrões de recorrência e sobrevida diferentes. Por essa razão, os subtipos moleculares definidos por 4 marcadores agregam informações importantes sobre a biologia do tumor e seu comportamento clínico, podendo ser utilizados para determinar o tratamento e as estratégias de seguimento (Park *et al.*, 2012).

Embasados nestes dados, a seleção dos casos de carcinoma ductal invasor luminal A foi restrita aos com expressão positiva de receptor de estrogênio e de progesterona com o intuito de aumentar o grau de concordância entre os dois modelos de classificação.

5.1- miRNAs hiperexpressos

Em relação aos miRNAs hiperexpressos, temos que o miR-182-5p e o miR-96-5p têm origem em precursores bem próximos, com menos de 10 pares de base de distância, fazendo, assim, parte do mesmo *cluster*.

Encontramos hiperexpressão do miR-96-5p nas amostras tumorais com fold regulation de 9,245, $p = 0,000192$. Resultados semelhantes foram

descritos por outros autores em linhagens celulares de câncer de mama (Gutilla, 2009) e em amostras tumorais de câncer de próstata.

Lin *et al.* relataram que a expressão de miR-96 estava aumentada em tecidos e células de câncer de mama quando comparados com tecidos e células epiteliais normais de mama. A expressão ectópica de miR-96 induziu à proliferação e ao crescimento ancoragem-independente de células de câncer de mama, enquanto sua inibição reduziu este efeito. Além disso, a hiperexpressão de miR 96 nas células de câncer de mama resultou na modulação da entrada na fase transicional G1/S, provavelmente causada por diminuição da expressão dos inibidores quinase dependente de ciclina (CDK), do p27(Kip1) e do p21(Cip1), e por aumento da expressão do regulador do ciclo celular D1. Mais do que isso, foi demonstrado que o miR-96 diminui a expressão de FOXO 3a por se ligar diretamente à região não traduzida 3'. Vistos em conjunto, estes resultados sugerem que o miR-96 desempenha papel importante na promoção de proliferação em células de câncer de mama humano e representam um novo mecanismo de supressão direta, miRNA mediada, da expressão de FOXO3a em células de câncer (Lin *et al.*, 2010).

Nossos dados de hiperexpressão de miR 182-5p (*fold-regulation* = 6,4813, $p = 0,00024$) corroboram os resultados apontados por Krishnan *et al.*, evidenciando sua hiperexpressão em diversas amostras de câncer de mama humano e apontando seu potencial papel oncogênico (Krishnan *et al.*, 2013). Estes autores identificaram mais de 1.000 genes-alvo, incluindo oncogenes e supressores tumorais. Seus alvos incluem vários componentes da via de reparo BRCA1-dependente do DNA e do ponto de checagem G2 do ciclo celular. No contexto do câncer de mama, foi demonstrado que seu efeito primário é mediar a resposta de dano ao DNA.

O miR 182 se mostrou tumorigênico no melanoma (Segura *et al.*, 2009) e no câncer endometrial (Myatt *et al.*, 2010). É hiperexpresso nos cânceres de pulmão (Cho *et al.*, 2009), próstata (Schaefer *et al.*, 2010) e cólon (Sarver *et al.*, 2009). Apesar da expressão alterada em uma variedade de cânceres humanos, apenas alguns alvos foram identificados, incluindo FOXO3, MITF

(Segura *et al.*, 2009), FOXO1 (Guttilla e White, 2009), BRCA1 (Moskwa *et al.*, 2011), CTTN (Sun *et al.*, 2010), RGS17 (Sun *et al.*, 2010) e, mais recentemente, CREB1 (Kong *et al.*, 2012) e MTSS1 (Liu *et al.*, 2012). O miR-182-5p, junto com outros miRNAs em seu cluster, mostrou efeito na apoptose, senescência, proliferação e migração/motilidade no meduloblastoma. (Weeraratne *et al.*, 2012).

Uma correção do miR 96 e miR 182 foi evidenciada na via de FOXO1. Seus transcritos orquestram a regulação de genes envolvidos na resposta apoptótica, em pontos de checagem do ciclo celular e no metabolismo celular. O FOXO1 é um provável supressor tumoral e a expressão deste gene é desregulada em alguns cânceres, como o prostático e o endometrial. No entanto, os mecanismos moleculares dessa desregulação não são completamente conhecidos. Gutilla e White identificaram hipoexpressão do mRNA de FOXO1 em amostras de câncer de mama comparadas com tecido mamário normal. verificaram um novo mecanismo de regulação FOXO1 por meio da hiperexpressão de miR-27a, miR-96 e miR-182. Sugeriram, também, que o FOXO 1, como alvo de microRNA, pode contribuir para a manutenção de um estado oncogênico nas células de câncer de mama (Guttilla e White, 2009).

Hiperexpressão de miR-210-3p indica pior prognóstico segundo avaliação que envolveu 511 casos de câncer de mama (Hong *et al.*, 2012). Parece ser um fator prognóstico independente de mau prognóstico, verificado em casos de tumores triplo negativos numa casuística japonesa (Toyama *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstraram que miR-210 faz parte de um grupo de miRNAs hipóxia-regulados e demonstraram papel regulatório direto do HIF-1 alfa para sua transcrição (Toyama *et al.*, 2012).

Apesar de hiperexpresso em nossa casuística de carcinomas ductais invasivos (*fold-regulation* = 4,0166, $p = 0,036407$), o miR-7-5p pode representar um miRNA supressor da migração celular e da capacidade de invasão em melanoma, atuando, pelo menos em parte, via inibição da expressão de IRS-2 (insulin receptor substrate-2) e, conseqüentemente, da via da sinalização Akt (protein kinase B) (Giles *et al.*, 2013).

Encontramos hiperexpressão do miR-21-5p (*fold-regulation* = 6,3129, $p = 0,000001$), já identificado por outros pesquisadores como provável regulador de vias oncogênicas.

Os níveis de expressão do miR-21 em 15 casos de carcinoma mamário relacionaram-se positivamente com fenótipo mais agressivo, caracterizado por estágio mais avançado (Ozgün *et al.*, 2013). Li *et al.* (2013) sugeriram, como alvo do mir 21, a tradução do gene TIMP3 por meio da avaliação de seu mRNA por RT-qPCR em tempo real e da expressão proteica por western-blotting (Li *et al.*, 2013). Niu *et al.* sugeriram que a indução de miR-21 permitiria que células cancerígenas escapassem da apoptose induzida por dano ao DNA, aumentando seu potencial metastático pela repressão da expressão de PTEN e PDCD4 (Niu *et al.*, 2012).

5.2- MiRNAs hipoexpressos

Zhou *et al.* (2010) mostraram que a hiper-regulação do mir-125b-5p, em células tumorais de mama, confere resistência à ação citotóxica e apoptótica do taxol, por meio da supressão da expressão de Bak1 (pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1).

Em nossa casuística, foi observado padrão de hipoexpressão do miR-125b-5p nos tecidos mamários tumorais (*Fold-regulation* = -6,332, $p=0$).

O miR-204-5p aparece hipoexpresso em diversos cânceres humanos, sugerindo sua atuação como supressor tumoral. Foi evidenciada sua capacidade de inibir metástases *in vivo* quando acrescido em células tumorais. Demonstrou-se que o miR-204 exerce regulação em genes envolvidos na tumorigênese incluindo o fator neurotrófico cérebro-derivado (BDNF), um membro da família neurotropina conhecido por promover a invasão e angiogênese tumoral (Imam *et al.*, 2012).

O miR-204 parece ainda regular a indução da interleucina 11 (IL-11) mediada por TGF- β , atuando no processo de metastatização óssea. A análise de expressão gênica de células transfectadas com miR-204 e miR-

379 indicam que estes miRNAs diminuem a expressão de genes envolvidos na sinalização de TGF- β , incluindo prostaglandina-endoperoxídeo sintase 2 (PTGS2) (Pollari *et al.*, 2012).

O miR let-7c foi identificado como parte da assinatura baseada na expressão alterada de quatro genes que permite diferenciar um de dois perfis de câncer de mama. A assinatura baseada em 4 genes identificou, além do let-7c, outros 3 miRNAs (miR-320d, miR-139-5p e miR-567). O outro perfil detém a expressão alterada de 42 genes e relaciona como alterados outros 17 microRNAs (Cava *et al.*, 2014). Estudo que buscou avaliar o perfil de expressão de MiRNA de lesão precursora de câncer de mama – hiperplasia de células colunares – identificou em células epiteliais hipoexpressão de Let-7c. Sua função antiproliferativa é exercida potencialmente devido aos efeitos em Myb e Rex (Björner *et al.*, 2014).

A baixa expressão de MiR let-7e-5p já foi associada a pior prognóstico no câncer de mama (Aure *et al.*, 2013). Mais que isso, de forma geral, a hipoexpressão da família miR let 7 acontece nos cânceres humanos, parecendo ser desencadeada por um declínio no número de cópias do gene let 7 em função de uma deleção focal (Wang *et al.*, 2012)

Analizando a categorização supervisionada da Figura 8, observamos que cinco miRNAs diferencialmente expressos separam com exatidão o tecido de CDI luminal A do parênquima mamário normal: Estes miRNAs estão homogeneamente expressos nos casos do subtipo luminal A e, provavelmente, por essa razão, permitem diferenciar tumor de tecido normal.

Como perspectivas de pesquisas futuras, a avaliação dos mRNAs-alvo destes miRNAs permitirá avaliar se a diferença na expressão repercute em alteração fenotípica nesse tipo específico de tumor, indicando quais vias de sinalização estariam recrutadas e potencialmente reguladas por miRNAs nesta casuística de tumores luminal A.

No futuro, a chave para a correta utilização de terapias-alvo para os tumores luminais será a habilidade em subclassificar o câncer de mama receptor de estrogênio positivo. Espera-se que os miRNAs tenham papel nessa subclassificação.

5.3. Expressão de microRNAs e parâmetros clínicos

5.3.1. Expressão de microRNAs e idade das pacientes

A importância em se detectar se há diferentes perfis de miRNA a depender da idade das pacientes é uma questão pendente. Provavelmente, a doença em extremos de idade representa diferentes mecanismos de desregulação gênica. Um perfil de miRNA foi vislumbrado por um grupo de pesquisadores e incluía diferença de expressão em 6 miRNAs: miR-1228, miR-3196, miR-1275, miR-92b, miR-139 e miR-1207 em pacientes < 35 anos (Pena-Chilet, 2014).

Nossas pacientes foram agrupadas de acordo com a idade em menores que 40 anos (2 casos), de 40 a 60 anos (8 casos) e maiores de 60 anos (22 casos).

Encontramos maior expressão do miR-129-5p no grupo mais jovem (< 40 anos) e maior expressão em relação ao miR 210-3p no grupo 40 a 60 anos comparado com > 60 anos.

Geralmente hipoexpresso no câncer, o miR-129 é associado à morte celular e a pior prognóstico no câncer de bexiga. Foi observado que sua expressão impede a mobilidade e a migração em linhagens celulares de câncer de mama, portanto, sua hipoexpressão estaria envolvida no processo de metastização do câncer de mama (Wang, 2012)

A hiperexpressão de miR-210-3p no grupo de pacientes entre 40 e 60 anos comparado ao grupo com mais de 60 anos, pode refletir o pior prognóstico em pacientes mais jovens (Hong, 2012). O número pequeno de casos, apesar da significância estatística, impede definição de perfil diferenciado de expressão de miRNA de acordo com a idade.

5.3.2- Expressão de microRNAs e estado menopausal

As pacientes foram divididas em dois grupos em relação ao estado menopausal: doença diagnosticada na pré-menopausa ou na pós-menopausa. Foi verificado que o miR 222-3p era mais expresso no grupo pós-menopausa quando comparado ao grupo na pré-menopausa (delta Ct: -1,15 x delta Ct: -0,43, $p=0,035$).

Estudo com linhagens celulares e modelos animais observou que a expressão de miR-222-3p foi negativamente correlacionado com RE α . A hiperexpressão de miR-222-3p em células RL95-2 promoveram proliferação celular, potencialização da capacidade de invasão, além de induzir para mudança da fase G1 para S do ciclo celular. Além disso, um inibidor do miR-222-3p diminuiu a capacidade das células AN3CA de proliferar e invadir. *In vivo*, a hiporregulação de miR-222-3p nas células AN3CA inibem o crescimento tumoral em modelos de camundongo. Adicionalmente, miR-222-3p aumentou a resistência ao raloxifeno por meio da supressão da expressão RE α nas células de carcinoma de endométrio. Concluindo, miR-222-3p desempenha papel importante na regulação da expressão do RE α , e poderia ser alvo para restabelecer a expressão de RE α e responder a terapia antiestrogênica num subgrupo de carcinoma de endométrio (Liu, 2014).

5.3.3- Expressão de microRNAs e idade ao primeiro parto a termo

As pacientes foram divididas em < 25 anos (quatro), 25 a 35 anos (sete) e > 35 anos (duas). Tínhamos essa informação em apenas 13 casos. Foram encontradas diferenças significativas na expressão dos seguintes miRNAs: miR 10a-5p (mais expresso 25 a 35 anos x > 35 anos, $p=0,003$), miR 181a-5p (mais expresso até 25 anos x 25-35 anos, $p=0,043$), miR 181c-5p (mais expresso até 25 anos x 25-35 anos, $p=0,031$), miR-29c-3p (menos

expresso 25 a 35 anos x > 35 anos, $p=0,026$) e miR 31-5p (mais expresso até 25 anos x >35 anos, $p=0,026$).

Estudos têm demonstrado que o risco de desenvolver câncer de mama está relacionado com a exposição da mulher aos hormônios estrogênio e progesterona. Fatores reprodutivos que aumentam a duração e/ou os níveis de exposição aos hormônios produzidos pelo ovário, e que estimulam o crescimento celular, têm sido associados com um aumento no risco do câncer de mama. Esses fatores incluem a menarca precoce, menopausa tardia, idade avançada na primeira gravidez e o fato de não ter filhos.

Tanto a gravidez, quanto a amamentação, reduzem o número de ciclos menstruais, diminuindo a exposição cumulativa aos hormônios. Além disso, a gravidez e a amamentação têm efeitos diretos sobre a diferenciação celular. Quanto mais diferenciada, menor a chance de acumular mutações. Mulheres que tiveram a primeira gravidez antes dos 20 anos, o risco de desenvolver câncer de mama é cerca de metade das mulheres cuja primeira gravidez ocorreu após os 30 anos. Esta redução do risco parece ser limitada ao câncer de mama receptor de hormônio positivo.

MiR-181, geralmente hiperexpresso nos tumores humanos, é relacionado a processos celulares como invasão e apoptose estando relacionado à via de sinalização de fatores de crescimento, como ativina e TGFbeta, e, portanto, crítico ao processo de metastização (Nell *et al.*, 2013)

Alguns trabalhos mostram que a expressão aberrante de miR-29 pode contribuir para a redução da proteína N-Myc em tumores mamários. A hipoexpressão dessa proteína promove fenótipo mesenquimal, invasor e metastático de células cancerígenas (Rostas *et al.*, 2014).

O papel funcional do miR-31, progressivamente menos expresso nas pacientes que tiveram filhos mais tardiamente nesta casuística, é extremamente complexo. O miR-31 pode desempenhar tanto um papel supressor como oncogênico em diferentes tipos tumorais. O fenótipo causado por sua expressão aberrante é fortemente dependente de seus níveis de expressão endógenos. Por exemplo, no câncer de mama, a perda

da expressão do miR-31 é associada com alto risco de metástases (Laurila *et al.*, 2013).

5.3.4 Expressão de microRNAs e tabagismo

As pacientes foram avaliadas de acordo com o hábito tabagismo em: ausente, pregresso e presente. Pode-se associar expressão de miR-193b-3p, miR-199a-5p e miR-613 negativamente ao tabagismo. A associação é positiva em relação à expressão de miR-497-5p.

Parece que o miR-193b-3p está relacionado ao mecanismo de morte celular induzido pela metformina em tumores de mama triplo negativo. Um dos meios prováveis é a hiporregulação da proteína ácido graxo sintase (Wahdan-Alaswad *et al.*, 2014). Estudos em linhagens celulares de câncer de mama demonstraram que a expressão de miR-199-3p promove a proliferação e a sobrevivência destas células, diminuindo a atividade da caveolina-2 (Shatseva *et al.*, 2011). Mir-613 estava hipoexpresso numa casuística de carcinoma papilar de tireoide agressivo comparado a um subtipo de melhor prognóstico (Yang *et al.* 2013). Outro estudo verificou supressão da via Wnt pelo miR-613 (Anton *et al.*, 2011). A literatura mostra que a hipoexpressão de miR-497-5p leva à progressão do câncer de mama. Pacientes com alta expressão de miR-497-5p tiveram sobrevida livre de doença em 5 anos maior que aquelas com hipoexpressão (Wang *et al.*, 2013). MiR-497 pode atuar como supressor tumoral no câncer de mama. Com a hipoexpressão de miR-497 nas células, foram observadas inibição do crescimento celular, supressão da migração, e invasão celulares e parada do ciclo celular em G1, possivelmente por ter como alvo ciclina E1 (Luo *et al.*, 2013).

5.4- Expressão de microRNAs e parâmetros histológicos

5.4.1- Expressão de microRNAs e tamanho tumoral

As pacientes foram divididas em tumores de até 2 cm e tumores de 2,1 a 5 cm. Verificou-se que o miR-107 estava menos expresso no grupo até 2 cm ($p=0,005$), assim como o miR-155-5p ($p=0,048$). O miR-497-5p, no entanto, estava mais expresso no grupo de até 2 cm ($p=0,003$). Vimos que miR-497-5p encontra-se hipoexpresso no câncer de mama, atuando na sua progressão (Wang, 2013). Nossos dados relacionados ao tamanho tumoral parecem corroborar com esta informação da literatura. MiR-107 inibe a migração e a proliferação que pode, negativamente, regular a expressão de CDK8 (Li, 2014). MiR-155 está hiperexpresso no câncer de mama (Zeng, 2014) No entanto, os valores parecem ser inversamente relacionados à expressão de RE e RP (Lu, 2012).

5.4.2- Expressão de microRNAs e invasão linfática

Observamos, no grupo com invasão linfática, hiperexpressão de miR-107 ($p=0,035$) e de miR-212-3p ($p=0,043$), hipoexpressão de miR-223-3p ($p=0,012$) e de miR-497-5p ($p=0,028$).

Vimos que, por inibir a migração e a proliferação celular, a hipoexpressão de miR-107 é observada no câncer de mama. Na nossa casuística, essa hipoexpressão é mais pronunciada nos tumores sem invasão linfática. No câncer gástrico, o miR-212-3p pode agir na progressão, tendo como alvo o gene Myc (Xu, 2011). Em relação ao miR-223-3p, menos expresso no grupo com invasão linfática, já foi relatado como altamente expresso no microambiente tumoral.

A análise dos genes alvos de miR-223 revelou genes relacionados à morte e sobrevivência celular, e relacionados a vias de sinalização frequentemente alteradas no câncer. Entre esses genes, foi demonstrado

que os níveis proteicos de STAT5A, ITGA3 e NRAS são modulados pelo miR-223 (Pinatel *et al.*, 2014).

5.4.3- Expressão de microRNAs e invasão perineural

Foi observada menor expressão do miR-130b-3p no grupo com invasão perineural (2,31 x 1,76; p=0,032) quando comparado ao grupo sem invasão.

MiR-130b tem sua expressão aumentada no câncer colorretal (Zhao *et al.*, 2014) e diminuída no câncer de próstata (Chen *et al.*, 2014). Parece ser responsável, quando silenciado, pela resistência a drogas no tratamento do câncer de ovário (Zong *et al.*, 2014).

5.4.4- Expressão de microRNAs e componente intraductal

Entende-se o modelo básico de progressão ao carcinoma invasor da mama da seguinte forma: célula mamária normal – hiperplasia ductal típica – hiperplasia ductal atípica – carcinoma *in situ* da mama – carcinoma invasor. Provavelmente, os miRNAs estão desregulados nessa progressão. Avaliando a expressão de miRNA em tecido de CDIS comparado a tecido normal, um grupo encontrou desregulação na expressão de miR-10b, miR-125b, miR-132, miR-145, miR-154-3p, miR-382-5p e miR-409-3p (Li *et al.*, 2013). Nem sempre observamos o componente *in situ* na avaliação patológica do carcinoma invasor, isso pode representar diferenças nos mecanismos de carcinogênese. Na nossa casuística, foi observada hiperexpressão dos miR-210-3p (com CDIS x sem CDIS = 1,3 x 2,1; p=0,038) e miR-31-5p (com CDIS x sem CDIS = 1,11 x 2,58; p=0,047) no grupo com componente *in situ* comparado ao grupo sem componente *in situ*.

Também tem sua expressão desregulada no carcinoma pulmonar de pequenas células ao modular o ciclo celular se ligando à proteína hMLH1, no nível pós-transcricional (Zhong *et al.*, 2013).

5.4.5- Expressão de microRNAs e estadiamento

Em relação ao estadiamento, dividimos as pacientes em T1bN0, T1cN0 e T2N0. Houve diferença da expressão com p significativo na análise de miR130a-3p na comparação T1bN0 x T1cN0 ($-0,25 \times -1,3$; $p=0,015$) e T1cN0 x T2N0 ($-1,31 \times 0,64$; $p=0,012$). Houve também diferença significativa quando se comparou T1bN0 x T1cN0 na análise de expressão do miR155-5p ($3,62 \times 2,54$; $p=0,046$). As diferenças encontradas não foram muito expressivas, apesar de significativas, provavelmente, por se tratar de tumores iniciais sem comprometimento linfonodal.

5.4.6- Expressão de microRNAs e índices de KI-67

Houve menor expressão de miR-129-5p no grupo com Ki67 maior que 10% (delta Ct = 8,49) quando comparado ao grupo com Ki67 menor que 10% (delta Ct = 7,27) com significância ($p=0,044$). Quando avaliamos a expressão de miR-210-3p, observa-se menor expressão no grupo com índice menor que 10% (delta Ct = 2,04) quando comparado ao grupo com Ki67 > 10% (delta Ct = 1,25), com $p=0,047$.

Os resultados de outros estudos indicam que a hiperexpressão de miR-129 pode inibir a migração e a motilidade das células de câncer de mama, e sua hipoexpressão pode participar na migração e metastização do câncer de mama (Wang, 2012). Nossa casuística aponta hipoexpressão de miR 129-5p nos tumores, sendo que esta hipoexpressão é mais acentuada nos tumores com índice de proliferação Ki67 > 10%.

5.4.7- Expressão de microRNAs e receptor de estrogênio

O papel do estrogênio na regulação da proliferação celular e carcinogênese mamária é bem conhecido. Estudos recentes têm associado diversos miRNAs com o receptor de estrogênio no câncer de mama. A investigação do papel regulatório dos miRNAs é crítica para o entendimento do efeito do estradiol no câncer de mama, assim como para o desenvolvimento de estratégias para quimioprevenção.

Tumores de mama tipo luminal expressam receptor de estrogênio alfa (REalfa), um membro da família de receptores nucleares de fatores de transcrição ativados por um ligante que controlam sua proliferação, sua sobrevivência e seu estado funcional. Para identificar os determinantes moleculares deste fenótipo, uma análise do genoma foi realizada em linhagens celulares MCF-7 e ZR-75.1, estimuladas por estrogênio. Todos os 1.270 genes encontrados que responderam ao 17beta-estradiol em ambas linhagens celulares foram agrupados em 33 grupos altamente concordantes, cada qual apresentando cinéticas características de modificação de RNA. Esse conjunto de genes responsivos a hormônio incluiu vários alvos diretos do REalfa e estão organizados em uma cascata gênica de regulação, decorrentes da ativação do receptor-ligante e alcançando grande número de alvos *downstream* via AP-2gamma, fator de ativação de transcrição B-cell, E2F1 e 2, tipo E74 fator 3, GTF2IRD1, piloso e potencializador de divisão homóloga 1, MYB, SMAD3, RARalfa, e RXRalfa fatores de transcrição. MicroRNAs são também componentes integrais desta rede de regulação gênica visto que miR-107, miR-424, miR-570, miR-618, e miR-760 são regulados pelo 17beta-estradiol juntamente com outros microRNAs que podem atingir um número significativo de transcritos pertencentes a um ou mais grupos gênicos responsivos a estrogênio (Cicatiello *et al.*, 2010).

Foi descrito um novo papel para miR-181a/b como reguladores negativos da resposta ao dano de DNA no câncer de mama, influenciando a expressão e atividade da quinase sensível ao estresse ATM (ataxia telangiectasia mutated). MiR-181a e miR-181b estavam hiperexpressos em

carcinomas de mama mais agressivos, relacionados inversamente com os níveis de ATM (Bisso *et al.*, 2013)

miR-181a hipoexpresso em níveis séricos, podendo, ainda, funcionar como biomarcador de tumores de mama LUMINAL A (McDermott *et al.*, 2014).

O processo de metastização do câncer de mama em estágio avançado é dirigido pela via de sinalização TGF- β desregulado. Ao identificar-se miRs hiperexpressos nas células de câncer de mama metastáticas, foi estabelecido o miR-181a como metastamiR TGF- β -regulado que aumentaria o potencial metastático dos cânceres de mama ao promover transição epitélio-mesenquimal, e sinalização de fenótipos de invasão e migração. A expressão de miR-181a era aumentada nos tumores de mama agressivos, especialmente o subtipo triplo negativo, e foi altamente preditiva de diminuição na sobrevida global em mulheres com câncer de mama (Taylor *et al.*, 2013)

O miR-181c hipoexpresso no neuroblastoma metastático comparado ao primário. Sua ação como supressor tumoral parece estar relacionada à proteína Smad7 (Li *et al.*, 2014).

MiR-181d pode agir como supressor tumoral, estando hipoexpresso no glioma, tendo como alvo K-ras e Bcl-2 (Wang *et al.*, 2012).

Em relação ao miR-212, a literatura mostra hipoexpressão no soro e em tecidos de pacientes com câncer de ovário epitelial (Wei *et al.*, 2014). No entanto, mostra hiperexpressão nas células e nos tecidos de pacientes com adenocarcinoma pancreático. A hiperexpressão de PTCH1 pode atenuar o efeito induzido pelo miR-212. Provavelmente, o MiR-212 favorece a metastização do câncer de pâncreas tendo como alvo PTCH1 (Ma *et al.*, 2014). Estudos recentes têm demonstrado que miRNAs podem regular a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP/ABCG2), um importante transportador de efluxo responsável pela distribuição celular de fármacos; seus efeitos sobre a expressão de ABCG2 ainda não foram estabelecidos (Li *et al.*, 2011). Os miRNAs miR-212 e miR-328 foram correlacionados inversamente com a expressão ABCG2. Foi confirmado que miR-212 tem

como alvo a região 3'-UTR da ABCG2. A hipoexpressão de miRNA e a hiperexpressão de ABCG2, possivelmente, contribuem para o mecanismo de distribuição e resposta no imatinib na terapêutica da leucemia mieloide crônica (Turrini *et al.*, 2012).

A expressão de miR-206 está diminuída nos tumores de mama em comparação ao tecido normal (Min *et al.*, 2014). Na nossa casuística, não foi encontrada diferença significativa na expressão de miR-206 entre tecido tumoral e normal. No entanto, na análise de subgrupos, miR-206 estava menos expresso nos tumores com RE até 90%. A desregulação de MiR-206 está implicada na carcinogênese mamária dependente de estrogênio (Munagala *et al.*, 2013). MiR-223 é hiperexpresso nas células de câncer de mama (Pinatel *et al.*, 2014). A hiperexpressão mais acentuada e significativa, na nossa casuística, ocorreu nos tumores RE > 90%. Vimos que miR-223 tem como alvo os genes envolvidos na sobrevivência e morte celular, bem como em vias de sinalização frequentemente alteradas no câncer de mama (Pinatel *et al.*, 2014).

5.4.8 Expressão de miRNA e receptor de progesterona

Dos miRNAs desregulados na análise comparativa de positividade do receptor de progesterona, encontrou-se, de forma geral, expressão mais acentuada quanto maior a positividade do RP.

Dados experimentais e clínicos apontam para o papel da progesterona e seu receptor nuclear no controle da carcinogênese mamária. Os receptores de progesterona mediam resposta aos progestagênios na mama normal e no câncer de mama. Um grupo de pesquisadores encontrou nove miRNAs hiperexpressos e sete hipoexpressos por progestagênios em células cancerígenas mamárias. Um dos miRNAs hipoexpresso, miR-16, identificado como supressor tumoral na leucemia, tem decréscimo nos seus níveis mediado pela via clássica de RP e por meio de interligação hierárquica entre Stat3 e fator de transcrição oncogênico c-Myc. Entre seus

genes-alvo, temos CCNE, responsável pela expressão do regulador do ciclo celular ciclina E. Stat3 e c-Myc participam na indução da expressão de ciclina E pelo progestagênio. Além disso, a hiperexpressão de miR-16 interrompe a habilidade do progestagênio de induzir a hiperexpressão da ciclina E, confirmando que ela é um novo alvo de miR-16 no câncer de mama. A hiperexpressão de miR-16 inibe o crescimento tumoral dependente de progesterona *in vitro* e *in vivo*, caracterizando-o como miR supressor tumoral na carcinogênese mamária (Rivas *et al.*, 2012). Da mesma forma, a partir de nossos dados, a identificação de genes-alvo pode auxiliar no entendimento da forma como a maior expressão de RP influenciaria a carcinogênese mamária mediada por miRNAs.

5.4.9- Expressão de microRNAs e grau histológico

As pacientes foram avaliadas também de acordo com o grau histológico e foi observado que miR-27a-3p estava hiperexpresso no grupo com grau histológico 1 comparando com grau histológico 3 ($p=0,046$).

O miR-27a promove angiogênese mediando a diferenciação endotelial de células tronco de câncer de mama, podendo ser novo alvo para terapia antiangiogênica (Tang *et al.*, 2014).

Evidências recentes indicam que o cluster miR-23a/24-2/27a pode exercer papel importante na tumorigênese mamária e funcionar como nova classe de oncogene. Foi observado que os níveis de expressão de miR-23a, miR-24-2 e miR-27a estavam aumentados no câncer de mama com metástases linfonodais comparado com aqueles de pacientes sem metástases ou com o tecido normal. Expressão forçada do cluster miR-23a/24-2/27a promoveu migração, invasão e metástases hepáticas, tendo Sprouty2 (SPRY2) como alvo com consequente ativação de p44/42 MAPK. Fator de crescimento epidérmico induziu a expressão do fator de transcrição c-MYC, que promoveu a expressão de miR-23a, miR-24-2 e miR-27a. Subsequentemente, houve diminuição da expressão de SPRY2 e ativação

p44/42 MAPK, promovendo migração e invasão do carcinoma mamário. Foi sugerida uma ligação entre fator de crescimento epidérmico e cluster miR-23a/24-2/27a via regulação de c-MYC (Li *et al.*, 2013). Além disso, a expressão elevada de miR-27a está associada com pior prognóstico (Tang *et al.* 2012).

5.4.10-Expressão de microRNAs e grau nuclear

Em relação aos microRNAs expressos diferencialmente de acordo com o grau nuclear foi demonstrado que miR-107 regula negativamente o supressor tumoral let-7. O miR-107 foi encontrado altamente expresso no tecido tumoral de pacientes com carcinoma mamário avançado, sua expressão sendo inversamente correlacionada com a expressão de let-7 nos tumores e nas linhagens celulares (Chen *et al.*, 2011). Expressão elevada de miR-126 e miR-10a em tecido tumoral foi relacionada a um intervalo livre de doença maior (Hoppe *et al.*, 2013). MiR-15a é hipoexpresso no tecido tumoral e inibe o ciclo celular, tendo como alvo CCNE (Luo *et al.*, 2013) e synuclein-γ (SNCG) (Li *et al.*, 2014). MiR-199b-5p parece regular Hes-1, envolvido na via de sinalização SHH (de Antonellis *et al.*, 2013). Foi verificado que miR-199b-5p inibia a expressão de HER2 em linhagens celulares de câncer de mama. Além disso, miR-199b-5p inibiu sinalização a jusante de HER2 por meio das vias ERK1/2 e AKT (Fang *et al.*, 2013).

5.4.11 Expressão de miRNA e multicentricidade

Verificamos menor expressão de miRNAs nos casos multicêntricos dos miR-429, miR-96-5p e miR-200a-3p, entre outros.

O câncer de mama multicêntrico e/ou multifocal pode ser definido pela presença de 2 ou mais focos de tumor dentro de diferentes quadrantes da mesma mama ou dentro do mesmo quadrante, respectivamente (Ustaalioglu

et al., 2010). Se tumores multicêntricos/multifocais são fatores de risco independentes para prognóstico de câncer de mama, é assunto ainda controverso (Weissenbacher *et al.*, 2010).

5.4.12-Expressão de microRNAs e bilateralidade

Verificou-se maior expressão de let-7a-5p ($p=0,040$) e menor expressão miR-98-5p ($p=0,043$) nos casos de tumor bilateral.

A presença de câncer de mama bilateral, especialmente numa idade jovem, é suspeita para síndrome genética. Por isso, de acordo com NCCN, essas pacientes merecem aconselhamento genético e teste para mutação BRCA1/2. Se uma paciente com 30 anos ou menos ter teste negativo para mutação BRCA1/2, o teste para TP53 deve ser considerado.

Foi demonstrado elevado nível de expressão do miR-21, miR-10b e miR-31 em carcinomas mamários bilaterais quando comparados a unilaterais. Este estudo sugere que tumores de mama bilaterais têm padrão distinto de eventos moleculares, em comparação com a doença unilateral (Iyevleva *et al.*, 2012)

Vimos que características clínicas ou histológicas diferenciadas imprimiram diferentes perfis de expressão de miRNA. Sendo assim, pode-se sugerir influências da desregulação de miRNAs nos diferentes cursos clínicos da mesma doença.

Após a definição destes perfis, potenciais genes-alvo envolvidos no processo de carcinogênese poderão, em pesquisas futuras, ser identificados por modelos de predição em bioinformática. A partir da identificação destes alvos, estudos funcionais do papel dos miRNAs na etiologia do câncer de mama poderão ser desenvolvidos. Embasados nestes dados, novos preditores prognósticos e terapias-alvo específicas podem surgir.

6- CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

A avaliação da expressão de microRNAs, por PCR em tempo real, no carcinoma mamário ductal invasivo luminal A comparado com tecido mamário normal, definiu hiperexpressão do miR-96-5p, miR-182-5p, miR-21-5p, miR-210-3p e miR-7-5p. Apontou, ainda, hipoexpressão do miR-204-5p, miR-125b-5p, let-7c-5p e let-7e-5p.

Não foi possível avaliar o impacto da expressão de miRNA nas taxas de recidiva locorregional e de metástase a distância, bem como na sobrevida livre de doença e sobrevida geral devido ao pequeno número de recidivas.

Não foi verificada diferença significativa em relação a amamentação, paridade ou história familiar de câncer de mama ou ovário e expressão de miRNA.

Foi observada maior expressão de miR-129-5p e miR-210-3p nas pacientes mais jovens

O miR 222-3p foi mais expresso no grupo pós-menopausa quando comparado ao grupo na pré-menopausa.

Em relação a idade no primeiro parto, foram encontradas diferenças significativas na expressão de miR 10a-5p, miR 181a-5p, miR 181b-5p, miR 181c-5p, miR-29c-3p e miR 31-5p.

Pode-se associar expressão de miR-193b-3p, miR-199a-5p e miR-613 negativamente ao tabagismo. A associação é positiva em relação à expressão de miR-497-5p.

O tamanho tumoral também influenciou a expressão de miRNA. Verificou-se que miR-107 estava menos expresso no grupo até 2 cm assim como miR-155-5p. O miR-497-5p, no entanto, estava mais expresso no grupo de até 2 cm

Observamos, no grupo com invasão linfática, hiperexpressão de miR-107 e miR212-3p e hipoexpressão de miR-223-3p e miR-497-5p.

Foi observada menor expressão do miR-130b-3p no grupo com invasão perineural quando comparado ao grupo sem invasão.

Os tumores que apresentavam componente in situ associado ao carcinoma invasor apresentavam maior expressão de miR-210-3p.

Houve menor expressão de miR130a-3p no grupo T1bN0 comparado com T1cN0 assim como T1cN0 comparado com T2N0. Houve, também, menor expressão no grupo T1bN0 comparado com T1cN0 na análise de expressão do miR155-5p.

Observou-se maior expressão miR-210-3p no grupo com índice de proliferação >10% e menor expressão miR-129-5p no grupo com índice de proliferação >10%.

Em relação ao percentual de positividade do receptor de estrogênio, encontrou-se hiperexpressão no grupo até 90% dos seguintes miRNAs: miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181c-5p, miR-181d-5p, miR-212-3p, miR-328-3p, com $p < 0,05$. Houve hipoexpressão de miR-206 e miR-223-3p, com $p < 0,05$ no grupo com receptor de estrogênio até 90%.

Foi observada hiperexpressão do miR-17-5p e miR-20b-5p no grupo com receptor de progesterona até 40% comparando-se com aqueles com percentual entre 40 e 80%. Verificou-se hiperexpressão no grupo até 40% comparando-se com grupo > 95% de miR-17-5p, let-7e-5p, let-7g-5p, miR-141-3p, miR-182-5p, miR-193b-3p, miR-20b-5p e miR-96-5p. Foi observada hiperexpressão no grupo entre 40 e 80% comparado com grupo >95%, em relação ao miR-182-5p, let-7b-5p, miR-96-5p, miR-181c-5p e miR-181d-5p.

O miR-27a-3p estava hiperexpresso no grupo com grau histológico 1 comparado com grau histológico 3

Observou-se hipoexpressão do miR-107 no grupo com grau nuclear 1 comparado com grau nuclear 2, assim como de miR-10b-5p, miR-15a-5p e miR-199b-3p. Houve hiperexpressão do miR-10a-5p no grupo com grau nuclear 2 comparado ao grau nuclear 3.

Foi detectada maior expressão de let-7a-5p e menor expressão miR-98-5p nos casos de tumores bilaterais.

Em relação a multicentricidade detectou-se menor expressão de miRNAs nos casos multicêntricos: miR-429, miR-96-5p, miR-200a-3p.

7- ANEXOS

Anexo A – Solicitação para Execução do Estudo.

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

São Paulo, 29 de junho de 2011

Registro: NP 147/2011

Ref. Solicitação de execução de estudo: "Caracterização da População Celular de Câncer de Mama a partir de expressão de microRNA: tumores receptores positivos e HER2 negativo"

Pesquisador responsável: Prof.Dr. Edmund Chada Baracat / Dr. Daniele Carvalho Calvano Mendes

Prezado Pesquisador

CONSIDERAÇÕES

Trata-se de um estudo retrospectivo com finalidade para obtenção de mestrado. O estudo possui Bolsa Auxílio da FAPESP. Possui previsão de análise de 30 prontuários. O objetivo principal do estudo é verificar o padrão de expressão de microRNAs em tumores de pacientes com diagnósticos de câncer de mama de características biológicas semelhantes (receptor de estrogênio positivo, receptor de progesterona positivo, HER2 negativo).

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Antes do início dos procedimentos relacionados ao estudo:

- Iniciar as atividades do estudo somente após aprovação/ciência do Comitê de Ética em Pesquisa para execução no ICESP segundo a Res. 196/96;
- Fornecer cópia da Carta de Aprovação e Relatório Semestral com ciência do CEP ao NGP- ICESP;
- Enviar Publicação dos resultados do estudo;

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff
Diretor Clínico

Pesquisa Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octávio Frias de Oliveira"
Av. Dr. Arnaldo, 251, 12º Andar, Sala 5, Cerqueira César, São Paulo – SP, 01246-000 Brasil
Telefone: 55 11 3983-2691, Fax: 55 11 3893-3504
www.icesp.org.br

Anexo B – Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0041/11

Título: "CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR DE CÂNCER DE MAMA A PARTIR DA EXPRESSÃO GENÉTICA DE MICRORNA: TUMORES RECEPTORES HORMONAIS POSITIVOS HER 2 NEGATIVO"

Pesquisador Responsável: Edmund Chada Baracat

Pesquisador Executante: Daniele Carvalho Calvano

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 04/11/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 13/10/2011 - Declaração de que o estudo não usará Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 04 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8- REFERÊNCIAS

8- REFERÊNCIAS

Anton R, Chatterjee SS, Simundza J, Cowin P, Dasgupta R. A systematic screen for micro-RNAs regulating the canonical Wnt pathway. *PLoS One*. 2011;6(10).

Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27(15):2128-36.

Aure MR, Leivonen SK, Fleischer T, Zhu Q, Overgaard J, Alsner J, Tramm T, Louhimo R, Alnæs GI, Perälä M, Busato F, Touleimat N, Tost J, Børresen-Dale AL, Hautaniemi S, Troyanskaya OG, Lingjærde OC, Sahlberg KK, Kristensen VN. Individual and combined effects of DNA methylation and copy number alterations on miRNA expression in breast tumors. *Genome Biol*. 2013 Nov 20;14(11):R126.

Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. [Erratum in *RNA*. 2005;11(1):114.]. *RNA*. 2004;10(11):1813-9.

Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res*. 2004;14(12):2486-94.

Bastien RR, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MT, Prat A, Munárriz B, Rowe L, Miller P, Ruiz-Borrego M, Anderson D, Lyons B, Álvarez I, Dowell T, Wall D, Seguí MÁ, Barley L, Boucher KM, Alba E, Pappas L, Davis CA, Aranda I, Fauron C, Stijleman IJ, Palacios J, Antón A, Carrasco E, Caballero R, Ellis MJ, Nielsen TO, Perou CM, Astill M, Bernard PS, Martín M. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics*. 2012;5:44.

Bell DW. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J Pathol*. 2010;220(2):231-43.

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*. 2006;125(6):1111-24.

Bisso A, Faleschini M, Zampa F, Capaci V, De Santa J, Santarpia L, Piazza S, Cappelletti V, Daidone M, Agami R, Del Sal G. Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer. *Cell Cycle*. 2013 Jun 1;12(11):1679-87.

Björner S1, Fitzpatrick PA2, Li Y3, Allred C4, Howell A5, Ringberg A6, Olsson H7, Miller CJ3, Axelson H8, Landberg G1. Epithelial and stromal microRNA signatures of columnar cell hyperplasia linking Let-7c to precancerous and cancerous breast cancer cell proliferation. *PLoS One*. 2014 Aug 14;9(8):e105099.

Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214.

Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, Macdougald OA, Cho KR, Fearon ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumorsuppressor genes. *Curr Biol*. 2007;17(15):1298-307.

Boyd J, Risinger JI, Wiseman RW, Merrick BA, Selkirk JK, Barrett JC. Regulation of microfilament organization and anchorage-independent growth by tropomyosin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(25):11534-8.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-66.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15524-9.

Cava C1, Bertoli G1, Ripamonti M1, Mauri G2, Zoppis I2, Della Rosa PA1, Gilardi MC1, Castiglioni I1. Integration of mRNA expression profile, copy number alterations, and microRNA expression levels in breast cancer to improve grade definition. *PLoS One*. 2014 May 27;9(5):e97681.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65(14):6029-33.

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26(5):745-52.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179.

Chen L, Li Y, Fu Y, Peng J, Mo MH, Stamatakis M, Teal CB, Brem RF, Stojadinovic A, Grinkemeyer M, McCaffrey TA, Man YG, Fu SW. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue. *PLoS One.* 2013;8(1):e54213.

Chen PS, Su JL, Cha ST, Tarn WY, Wang MY, Hsu HC, Lin MT, Chu CY, Hua KT, Chen CN, Kuo TC, Chang KJ, Hsiao M, Chang YW, Chen JS, Yang PC, Kuo ML. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *J Clin Invest.* 2011 Sep;121(9):3442-55.

Chen Q, Zhao X, Zhang H, Yuan H, Zhu M, Sun Q, Lai X, Wang Y, Huang J, Yan J, Yu J. MiR-130b suppresses prostate cancer metastasis through down-regulation of MMP2. *Mol Carcinog.* 2014 Aug 23.

Chinnaiyan AM, O'rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995;81(4):505-12.

Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *Eur J Cancer.* 2009;45(12):2197-206.

Cicatiello L1, Mutarelli M, Grober OM, Paris O, Ferraro L, Ravo M, Tarallo R, Luo S, Schroth GP, Seifert M, Zinser C, Chiusano ML, Traini A, De Bortoli M, Weisz A. Estrogen receptor alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs. *Am J Pathol.* 2010 May;176(5):2113-30.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(39):13944-9.

Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2004;164(1):35-42.

Cummings J, Ward TH, Ranson M, Dive C. Apoptosis pathway-targeted drugs—from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1705(1):53-66.

de Antonellis P1, Liguori L, Falanga A, Carotenuto M, Ferrucci V, Andolfo I, Marinaro F, Scognamiglio I, Virgilio A, De Rosa G, Galeone A, Galdiero S, Zollo M. MicroRNA 199b-5p delivery through stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) in tumorigenic cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2013 Apr;386(4):287-302.

de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(1):49-58.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22(53):8543-67.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.

Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(6):698-707.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-69.

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Inca; 2011.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*. 2007;27(11):3970-81.

Fang C1, Zhao Y, Guo B.. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2013 Jul;114(7):1457-63.

Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V., Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad*. 2005;102(50):18081-6.

Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008;283(2):1026-33.

Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, Farace MG. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2007;282(32):23716-24.

Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, Zanca C, Romano G, Taccioli C, Liu CG, Croce CM, Condorelli G. MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 2008; 27(27):3845-55.

Giles KM, Brown RA, Epis MR, Kalinowski FC, Leedman PJ. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(2):706-10.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing [see comment]. *Cell*. 2005;123(4):631-40.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):235-40.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106(1):23-34.

Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2009;284(35):23204-16.

Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005;65(21):9628-32.

He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007a;447(7148):1130-4.

He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. MicroRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*. 2007b;7(11):819-22.

Hock J, Weinmann L, Ender C, Rüdel S, Kremmer E, Raabe M, Urlaub H, Meister G. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA–protein complexes in human cells. *EMBO Rep*. 2007;8(11):1052-60.

Hong L, Yang J, Han Y, Lu Q, Cao J, Syed L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Gene*. 2012 Oct 10;507(2):135-8.

Hoppe R1, Achinger-Kawecka J, Winter S, Fritz P, Lo WY, Schroth W, Brauch H. Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. *Eur J Cancer*. 2013 Nov;49(17):3598-608.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(47):16961-6.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297(5589):2056-60.

Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, Chen HI, Chang YF, Panneerdoss S, Zoghi B, Buddavarapu KC, Broaddus R, Hornsby P, Tomlinson G, Dome J, Vadlamudi RK, Pertsemliadis A, Chen Y, Rao MK. Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PLoS One*. 2012;7(12):e52397.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(16):7065–70.

Ilyevleva AG1, Kuligina ESh, Mitiushkina NV, Togo AV, Miki Y, Imyanitov EN. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Feb;131(3):1049-59.

Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(17):5394-403.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.

Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25(46):6188-96.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15(20):2654-9.

Khoshnaw SM, Green AR, Powe DG, Ellis IO. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. *J Clin Pathol.* 2009;62(5):422-8.

Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinak S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 2007;129(6):1141-51.

Kong WQ, Bai R, Liu T, Cai CL, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-182 targets cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 1 (CREB1) and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma. *FEBS J.* 2012;279:1252-60.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, Macmenamin P, Da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial micro-RNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37(5):495-500.

Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Waddell N, Mariasegaram M, Simpson PT, Lakhani SR, Gabrielli B, Vlassov A, Cloonan N, Grimmond SM. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA.* 2013;19(2):230-42.

Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.* 2002;30(4):363-4.

Lankat-Buttgereit B, Goke R. Programmed cell death protein 4 (pdc4): a novel target for antineoplastic therapy? *Biol Cell.* 2003;95(8):515-9.

Laurila EM1, Kallioniemi As. The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013 Dec;52(12):1103-13.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [see comment]. *Cell.* 1993;75(5):843-54.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002;21(17):4663-70.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.

Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*. 2007;7:36.

Li J, Zhang Y, Zhang W, Jia S, Tian R, Kang Y, Ma Y, Li D. Genetic heterogeneity of breast cancer metastasis may be related to miR-21 regulation of TIMP-3 in translation. *Int J Surg Oncol*. 2013.

Li P1, Xie XB, Chen Q, Pang GL, Luo W, Tu JC, Zheng F, Liu SM, Han L, Zhang JK, Luo XY, Zhou X. MiRNA-15a mediates cell cycle arrest and potentiates apoptosis in breast cancer cells by targeting synuclein- γ . *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(16):6949-54.

Li S, Meng H, Zhou F, Zhai L, Zhang L, Gu F, Fan Y, Lang R, Fu L, Gu L, Qi L. MicroRNA-132 is frequently down-regulated in ductal carcinoma in situ (DCIS) of breast and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Pathol Res Pract*. 2013 Mar;209(3):179-83.

Li X1, Liu X, Xu W, Zhou P, Gao P, Jiang S, Lobie PE, Zhu T. c-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting Sprouty2. *J Biol Chem*. 2013 Jun 21;288(25):18121-33.

Li X1, Pan YZ, Seigel GM, Hu ZH, Huang M, Yu AM. Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2011 Mar 15;81(6):783-92.

Li XY, Luo QF, Wei CK, Li DF, Li J, Fang L. MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Jan 15;7(1):32-40. eCollection 2014.

Li Y, Wang H, Li J, Yue W. MiR-181c modulates the proliferation, migration, and invasion of neuroblastoma cells by targeting Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014 Jan;46(1):48-55.

Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003;299(5612):1540.

Lin H, Dai T, Xiong H, Zhao X, Chen X, Yu C, Li J, Wang X, Song L. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a. *PLoS One*. 2010;5(12):e5797.

Lin S-L, Chang D, Ying S-Y. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene*. 2005;356:32-8.

Liu B, Che Q, Qiu H, Bao W, Chen X, Lu W, Li B, Wan X. Elevated MiR-222-3p promotes proliferation and invasion of endometrial carcinoma via targeting ER α . *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1).

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305(5689):1437-41.

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 2002;297(5589):2053-6.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers [see comment]. *Nature*. 2005;435(7043):834-8.

Lu Z, Ye Y, Jiao D, Qiao J, Cui S, Liu Z. miR-155 and miR-31 are differentially expressed in breast cancer patients and are correlated with the estrogen receptor and progesterone receptor status. *Oncol Lett*. 2012 Nov;4(5):1027-32.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.

Luo Q, Li X, Gao Y, Long Y, Chen L, Huang Y, Fang L. MiRNA-497 regulates cell growth and invasion by targeting cyclin E1 in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2013 Oct 10;13(1):95.

Luo Q1, Li X, Li J, Kong X, Zhang J, Chen L, Huang Y, Fang L. MiR-15a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer. *Int J Oncol*. 2013 Oct;43(4):1212-8.

Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev*. 2009;84(1):55-71

Ma C, Nong K, Wu B, Dong B, Bai Y, Zhu H, Wang W, Huang X, Yuan Z, Ai K. miR-212 promotes pancreatic cancer cell growth and invasion by targeting the hedgehog signaling pathway receptor patched-1. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014 Jun 25;33:54.

Mahamodhossen YA, Liu W, Rong-Rong Z. Triple-negative breast cancer: new perspectives for novel therapies. *Med Oncol*. 2013;30(3):653.

Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*. 2006;5:24.

McDermott AM, Miller N, Wall D, Martyn LM, Ball G, Sweeney KJ, Kerin MJ. Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1):e87032.

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.

Mestdagh P, Feys T, Bernard N, Guenther S, Chen C, Speleman F, Vandesompele J. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(21):e143.

Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, Majumder S. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27(Kip1). *J Biol Chem*. 2008;283(44):29897-903.

Min W1, Wang B2, Li J2, Han J3, Zhao Y2, Su W2, Dai Z2, Wang X2, Ma Q2. The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer. *Med Sci Monit Basic Res*. 2014 Jul 21;20:97-104.

Miska EA, Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5):563-8.

Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, Beech J, Kulshrestha R, Abdelmohsen K, Weinstock DM, Gorospe M, Harris AL, Helleday T, Chowdhury D. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011;41(2):210-20.

Munagala R1, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. MicroRNA 'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention. *Cancer Lett*. 2013 Oct 10;339(2):175-84.

Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, Dina RE, Brosens JJ, Ghaem-Maghami S, Lam EW. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2010;70:367-77.

Neel JC, Lebrun JJ. Activin and TGF β regulate expression of the microRNA-181 family to promote cell migration and invasion in breast cancer cells. *Cell Signal*. 2013 Jul;25(7):1556-66.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74.

Niu J, Niu I, Shi Y, Tan G, Yang CH, Fan M, Pfeffer LM, Wu S. DNA damage induces NF- κ B- dependent microRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion. *J Biol Chem*. 2012;287(26):21783-95.

Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014 Apr;35(4):776-83.

Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1108-14.

Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999;216(2):671-80.

Ozgün A. MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer. *Onkologie*. 2013; 36(3):115-8.

Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park BW. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21(1):50-7.

Peña-Chilet M, Martínez MT, Pérez-Fidalgo JA, Peiró-Chova L, Oltra SS, Tormo E, Alonso-Yuste E, Martinez-Delgado B, Eroles P, Climent J, Burgués O, Ferrer-Lozano J, Bosch A, Lluch A, Ribas G. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Jul 21;14:529.

Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*. 2007;26(5):611-23.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573-6.

Pinatel EM, Orso F, Penna E, Cimino D, Elia AR, Circosta P, Dentelli P, Brizzi MF, Provero P, Taverna D. MiR-223 is a coordinator of breast cancer progression as revealed by bioinformatics predictions. *PLoS One*. 2014 Jan 6;9(1):e84859.

Piovan C, Palmieri D, Di Leva G, Braccioli L, Casalini P, Nuovo G, Tortoreto M, Sasso M, Plantamura I, Triulzi T, Taccioli C, Tagliabue E, Iorio MV, Croce CM. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol*. 2012;6(4):458-72.

Pollari S, Leivonen SK, Perala M, Fey V, Käkönen SM, Kallioniemi O. Identification of microRNAs inhibiting TGF- β -induced IL-11 production in bone metastatic breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e37361.

Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):203-9.

Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori*. 2008;94(3):370-83.

Rivas MA¹, Venturutti L, Huang YW, Schillaci R, Huang TH, Elizalde PV. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res*. 2012 May 14;14(3):R77.

Robins H, Press WH. Human microRNAs target a functionally distinct population of genes with AT-rich 3' UTRs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(43):15557-62.

Rostas JW 3rd, Pruitt HC, Metge BJ, Mitra A, Bailey SK, Bae S, Singh KP, Devine DJ, Dyess DL, Richards WO, Tucker JA, Shevde LA, Samant RS. MicroRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Mol Cancer*. 2014 Aug 29;13:200.

Sarver AL, French AJ, Borralho PM, Thayanithy V, Oberg AL, Silverstein KA, Morlan BW, Riska SM, Boardman LA, Cunningham JM, Subramanian S, Wang L, Smyrk TC, Rodrigues CM, Thibodeau SN, Steer CJ. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair *status* and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer*. 2009;9:401.

Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126(5):1166-76.

Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, Zakrzewski J, Blochin E, Rose A, Bogunovic D, Polsky D, Wei J, Lee P, Belitskaya-Levy I, Bhardwaj N, Osman I, Hernando E. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(6):1814-9.

Shatseva T, Lee DY, Deng Z, Yang BB. MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. *J Cell Sci*. 2011 Aug 15;124(Pt 16):2826-36.

Sörliea T, Perou CM, Tibshirani R, Turid A, Geislerg S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown, Botstein POD, Lönning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001;98(19):10869-74.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell*. 2005;123(6):1133-46.

Sun M, Hurst LD, Carmichael GG, Chen J. Evidence for a preferential targeting of 3'-UTRs by cis-encoded natural antisense transcripts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(17):5533-43.

Sun Y, Fang R, Li C, Li L, Li F, Ye X, Chen H. Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(2):501-7.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004;64(11):3753-62.

Tang W, Yu F, Yao H, Cui X, Jiao Y, Lin L, Chen J, Yin D, Song E, Liu Q. miR-27a regulates endothelial differentiation of breast cancer stem like cells. *Oncogene*. 2014 May 15;33(20):2629-38.

Tang W, Zhu J, Su S, Wu W, Liu Q, Su F, Yu F. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PLoS One*. 2012;7(12):e51702.

Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-52.

Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest*. 2013 Jan 2;123(1):150-63.

Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression [see comment]. *Nat Methods*. 2004;1(6):47-53.

Toyama T, Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, Takahashi S, Fujii Y, Yamashita H. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Apr;42(4):256-63.

Turrini E, Haenisch S, Laechelt S, Diewock T, Bruhn O, Cascorbi I. MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Mar;22(3):198-205.

Ustaalioglu BO1, Bilici A, Kefeli U, Şeker M, Oncel M, Gezen C, Gumus M, Demirelli F. The importance of multifocal/multicentric tumor on the disease-free survival of breast cancer patients: single center experience. *Am J Clin Oncol*. 2012 Dec;35(6):580-6.

Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684-91.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10(8):789-99.

Wahdan-Alaswad RS, Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Edgerton SM, Anderson SM, Thor AD, Richer JK. Metformin-Induced killing of triple-negative breast cancer cells is mediated by reduction in fatty acid synthase via miRNA-193b. *Horm Cancer*. 2014 Sep 12

Wang QY, Tang J, Zhou CX, Zhao Q. [The down-regulation of miR-129 in breast cancer and its effect on breast cancer migration and motility]. *Sheng Li Xue Bao*. 2012 Aug 25;64(4):403-11.

Wang S, Li H, Wang J, Wang D. Expression of microRNA-497 and its prognostic significance in human breast cancer. *Diagn Pathol*. 2013 Oct 21;8:172.

Wang XF, Shi ZM, Wang XR, Cao L, Wang YY, Zhang JX, Yin Y, Luo H, Kang CS, Liu N, Jiang T, You YP. MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Apr;138(4):573-84.

Wang Y1, Hu X, Greshock J, Shen L, Yang X, Shao Z, Liang S, Tanyi JL, Sood AK, Zhang L. Genomic DNA copy-number alterations of the let-7 family in human cancers. *PLoS One*. 2012;7(9):e44399.

Weeraratne SD, Amani V, Teider N, Pierre-Francois J, Winter D, Kye MJ, Sengupta S, Archer T, Remke M, Bai AH, Warren P, Pfister SM, Steen JA, Pomeroy SL, Cho YJ. Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):539-52.

Wei LQ, Liang HT, Qin DC, Jin HF, Zhao Y, She MC. MiR-212 exerts suppressive effect on SKOV3 ovarian cancer cells through targeting HBEGF. *Tumour Biol*. 2014 Sep 9. [Epub ahead of print]

Weissenbacher TM1, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D, Rack B, Schindlbeck C, Friese K, Dian D. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(1):27-34.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyansky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007;318(5853):1108-13.

Yang Z, Yuan Z, Fan Y, Deng X, Zheng Q. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. *Mol Med Rep*. 2013 Nov;8(5):1353-8.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-16.

Zeng H, Fang C, Nam S, Cai Q, Long X. The clinicopathological significance of microRNA-155 in breast cancer: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:724209.

Zhang J, Du YY, Lin YF, Chen YT, Yang L, Wang HJ, Ma D. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(1):136-40.

Zhang L, Ding L, Cheung TH, Dong MQ, Chen J, Sewell AK, Liu X, Yates JR 3rd, Han M. Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins, miRNAs, and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2. *Mol Cell*. 2007;28(4):598-613.

Zhao Y, Miao G, Li Y, Isaji T, Gu J, Li J, Qi R MicroRNA- 130b suppresses migration and invasion of colorectal cancer cells through downregulation of integrin β 1 [corrected]. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87938.

Zhong Z, Dong Z, Yang L, Chen X, Gong Z. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. *Tumour Biol*. 2013 Jun;34(3):1959-65.

Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y, Xiong W, Li G, Lu J, Fodstad O, Riker AI, Tan M. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J Biol Chem*. 2010; 285(28):21496-507.

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282(19):14328-36.

Zong C, Wang J, Shi TM. MicroRNA 130b enhances drug resistance in human ovarian cancer cells. *Tumour Biol*. 2014 Aug 26.

9- APÊNDICE

9- APÊNDICE

Tumor Biol.
DOI 10.1007/s13277-014-2025-7

RESEARCH ARTICLE

Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p

Carlos Marino Cabral Calvano Filho · Daniele Carvalho Calvano-Mendes ·
Kátia Cândido Carvalho · Gustavo Arantes Maciel · Marcos Desidério Ricci ·
Ana Paula Torres · José Roberto Filassi · Edmund Chada Baracat

Received: 9 December 2013 / Accepted: 28 April 2014
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2014

Abstract New concepts in epigenetics, microRNAs, and gene expression analysis have significantly enhanced knowledge of cancer pathogenesis over the last decade. MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding RNAs that regulate gene expression by base pairing with target messenger RNAs (mRNAs), resulting in the repression of translation or the degradation of mRNA. To compare the carcinogenic process in tumors with different prognoses, we used real-time RT-PCR to evaluate the miRNA expression profiles of 24 triple-negative breast invasive ductal carcinoma, 20 luminal A breast invasive ductal carcinoma, and 13 normal breast parenchyma controls. We extracted total RNA from tissues fixed in formol and embedded in paraffin (FFPE). Results revealed the upregulation of miR-96-5p (9.35-fold; $p=0.000115$), miR-182-5p (7.75-fold; $p=0.000033$), miR-7-5p (6.71-fold; $p=0.015626$), and miR-21-5p (6.10-fold; $p=0.000000$) in tumors group. In addition, the expression of miR-125b-5p (4.49-fold; $p=0.000000$) and miR-205-5p (4.36-fold; $p=0.006098$) was downregulated. When the expression profiles of triple-negative and luminal A tumors were compared, there was enhanced expression of miR-17-5p (4.27-fold; $p=0.000664$),

miR-18a-5p (9.68-fold; $p=0.000545$), and miR-20a-5 (4.07-fold; $p=0.001487$) in the triple-negative tumors compared with luminal A. These data suggest that there is a similar regulation of certain miRNAs in triple-negative and luminal A tumors. However, it is possible that differences in the expression of miR-17-92 cluster will explain the phenotypic differences between these molecular tumor subtypes.

Keywords MicroRNA · Breast cancer · FFPE tissue · Triple-negative · Luminal A · Cluster miR-17-92

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs, consisting of 19–30 nucleotides, which regulate gene expression during translation [1, 2]. Mature miRNAs are produced by the cleavage of primary miRNAs (pri-miRNAs) into precursor miRNAs (pre-miRNAs), which is mediated by the enzymes DROSHA and DGCR8. Pre-miRNAs are cleaved by Dicer and TRBP, resulting in the production of double-chain molecules that are incorporated into the protein complex called RNA-induced silencing complex (RISC). The interaction between miRNA/RISC and its target mRNA regulates gene expression.

The degree of complementarity between the 3'-untranslated region of the target mRNA and a seed region in the 5'-end of the miRNA determines the mechanism by which the miRNA regulates its target. If the miRNA sequence is highly complementary to the target mRNA, regulation occurs via RNA interference, where the RISC complex cleaves the target mRNA [3]. If complementarity is insufficient, regulation occurs via the suppression of translation [4, 5]. The process of miRNA regulation is extremely dynamic, and its complexity is increased by the fact that perfect complementarity with the target is not required. This suggests that a single miRNA can

C. M. C. Calvano Filho · D. C. Calvano-Mendes · K. C. Carvalho ·
G. A. Maciel · E. C. Baracat
Laboratório de Ginecologia Molecular e Estrutural—LIM 58,
Disciplina de Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de
São Paulo, Rua Dr Arnaldo, 255, Sala 2031, São Paulo-SP, Brazil

C. M. C. Calvano Filho · D. C. Calvano-Mendes (✉) ·
M. D. Ricci · J. R. Filassi · E. C. Baracat
Setor de Mastologia, Disciplina de Ginecologia, Instituto do Câncer
do Estado de São Paulo—ICESP, Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo, Rua Dr Arnaldo, 455, São Paulo-SP,
Brazil
e-mail: dccalvano@hotmail.com

A. P. Torres
Fundação Oncocentro de São Paulo, Rua Oscar Freire, 2396, São
Paulo-SP, Brazil

18b were also higher in estrogen receptor-negative compared with estrogen receptor-positive tumors. Therefore, data suggest that miRNAs inhibit the estrogen receptor alpha in breast cancer [40, 41]. Consistent with this, an additional study reported elevated expression of miR-18a/b in basaloid tumors [42]. On the other hand, Castellano et al. reported that pre-miR-18a was significantly upregulated in ER-positive compared to ER-negative breast cancers [43].

The reproducibility of measuring miRNA expression techniques using archived FFPE tissues has been demonstrated, and it supports the use of miRNAs as biomarkers in breast cancer. The combined analysis of the expression of a relatively small number of miRNAs allows tumor tissue to be distinguished from normal breast parenchyma. Some miRNAs play roles in breast carcinogenesis by regulating more than one molecular subtype. Additional miRNAs seem to affect carcinogenesis by silencing genes such as the estrogen receptor, possibly interfering in the different tumor phenotypes such as luminal A and triple-negative tumors. Identifying the different mechanisms by which miRNAs regulate gene expression should represent an important step in characterizing the carcinogenesis of a variety of tumors, and thus lead to more specific and effective treatments.

Acknowledgments This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP, São Paulo-SP, Brazil.

Conflicts of interest None

References

- Khoshnaw SM, Green AR, Powe DG, Ellis IO. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2009;62:422–8.
- Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev*. 2009;84:55–71.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297:2056–60.
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DJ, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:16961–6.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1108–14.
- Chen L, Li Y, Fu Y, Peng J, Mo MH, Stamatakis M, et al. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue. *PLoS One*. 2013;8:e54213.
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684–91.
- Sortica T, Perou CM, Tibshirani R, Turid A, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869–74.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367–74.
- Gutilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2009;284:23204–16.
- Lin H, Dai T, Xiong H, Zhao X, Chen X, Yu C, et al. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by down-regulating transcriptional factor FOXO3a. *PLoS One*. 2010;5:e15797.
- Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Waddell N, et al. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA*. 2013;19:230–42.
- Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:1814–9.
- Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2010;70:367–77.
- Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *Eur J Cancer*. 2009;45:2197–206.
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126:1166–76.
- Salver AL, French AJ, Borralho PM, Thayaniy V, Oberg AL, Silverstein KA, et al. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer*. 2009;9:401.
- Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, et al. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011;41:210–20.
- Sun Y, Fang R, Li C, Li L, Li F, Ye X, et al. Hsa-miR-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:501–7.
- Kong WQ, Bai R, Liu T, Cai CL, Liu M, Li X, et al. MicroRNA-182 targets cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 1 (CREB1) and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma. *FEBS J*. 2012;279:1252–60.
- Liu Z, Liu J, Segura MF, Shao C, Lee P, Gong Y, et al. Mir-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol*. 2012;228(2):204–15.
- Weeraratne SD, Amani V, Teider N, Pierre-Francois J, Winter D, Kye MJ, et al. Pleiotropic effects of miR-183–96–182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2012;123:539–52.
- Giles KM, Brown RA, Epis MR, Kalinowski FC, Leedman PJ. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430:706–10.
- Ozgun A. MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer. *Onkologie*. 2013;36:115–8.
- Li J, Zhang Y, Zhang W, Jia S, Tian R, Kang Y, et al. Genetic heterogeneity of breast cancer metastasis may be related to miR-21 regulation of TIMP-3 in translation. *Int J Surg Oncol*. 2013;2013:875078.
- Niu J, Shi Y, Tan G, Yang CH, Fan M, Pfeffer LM, et al. DNA damage induces NF- κ B-dependent microRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion. *J Biol Chem*. 2012;287:21783–95.
- Hong L, Yang J, Han Y, Lu Q, Cao J, Syed L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Gene*. 2012;507:135–8.

Fig. 3 Differences in the expressions of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p in the luminal A and triple-negative tumors. Luminal A invasive breast ductal carcinoma (control group), Triple-negative invasive breast ductal carcinoma (group 1). Fold change is the normalized gene expression ($2^{(-\Delta\Delta C_t)}$) in the test sample divided by the normalized

gene expression ($2^{(-\Delta C_t)}$) in the control sample. Error bars represent standard deviation. The differences stated are all significant ($p < 0.05$; Table 4). Graphic was created using Web Based Data Analysis at <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

all upregulated >4-fold in the triple-negative group compared with the luminal A group. Therefore, we hypothesize that the miRNAs with the highest level of expression in triple-negative tumors were associated with a more aggressive profile, whereas those with the lowest expression conferred a better prognosis. Recent evidence suggested that the miR-17-92 cluster, which includes miR-17-5p, miR-18a-5p, and miR-20a-5p, plays an important role in breast tumorigenesis. We observed that miR-17-5p was overexpressed in triple-negative tumors compared with luminal A tumors, which have a more favorable prognosis. Previous studies suggested that miR-17-5p is very highly expressed in the aggressive breast cancer cell line MDA-MB-231, but not in the less invasive MCF-7 cell line. However, the increased expression of miR-17-5p in MCF-7 cells conferred invasive and migratory properties via the HBP1/ β -catenin pathway. In contrast, decreasing the endogenous expression of miR-17-5p in MDA-MB-231 cells suppressed their migratory and invasive capacities. This suggests that miR-17-5p may play an important role in cancer cell invasion and migration by suppressing HBP1 and consequently Wnt/ β -catenin [33]. These findings are consistent with observations in prostate cancer, which suggested that miR-17-5p increases tumor growth and invasion by enhancing tumor cell proliferation (assessed by measuring colony formation), survival, and invasion [34].

Another study reports that miR-17-92 cluster suppress a specificity protein (Sp) repressor (ZBTB4), and this facilitates upregulation of Sp transcription factors and Sp-regulated genes, thus exhibiting tumor promoter-like activity. These experimental results using MDAMB-231 and MCF-7 human breast cancer cells confirm that miRNAs derived from these clusters, containing miR-17-5p, miR-20a, miR-106a, miR-

106b, and miR-93, negatively regulate ZBTB4 expression. These results confirm that ZBTB4 functions as a novel tumor suppressor gene with prognostic significance for breast cancer survival, and the oncogenic miR-17-92/ZBTB4/Sp axis may be a potential therapeutic target [35].

Instead, two papers report that miR-17/20 inhibit invasion, proliferation, and metastasis in breast cancer cell levels. Zuoren et al demonstrated that the levels of the miR-17-5p/miR-20a miRNA cluster were inversely correlated to cyclin D1 abundance in human breast tumors and cell lines. MiR-17/20 suppressed breast cancer cell proliferation and tumor colony formation by negatively regulating cyclin D1 translation [36]. Zuoren et al reported that miR-17/20 abundance is reduced in highly invasive breast cancer cell lines and node-positive breast cancer specimens [37]. Additional miRNAs in this cluster were also overexpressed in triple-negative compared with luminal A tumors. These miRNAs, such as miR18a-5p, which are transcribed together in many mammalian tissues, contribute to organogenesis. Members of this cluster may also function as oncogenes and tumor suppressor genes [38].

For example, in our study, miR-18a-5p was overexpressed in tumors compared with normal breast tissue (FR=4.68; $p=0.049733$) and in triple-negative compared with luminal A tumors (FR=9.68; $p=0.000545$), suggesting that it may function as an oncogene. However, previous studies reported that miR-18a was overexpressed in estrogen receptor-negative breast tissues, suggesting that it may have a tumor suppressor role [39].

An additional study identified five miRNAs as regulators of estrogen receptor alpha: miR-18a, miR-18b, miR-193b, miR-206, and miR-302c. The levels of miR-18a and miR-

Table 3 Differences in miRNA expression

	All tumor vs normal (fold regulation)	Luminal A vs normal	Triple-negative vs normal
miR-96-5p	9.35 ($p=0.000115$)	7.74 ($p=0.001547$)	9.90 ($p=0.000024$)
miR-182-5p	7.75 ($p=0.000033$)	5.86 ($p=0.001876$)	8.83 ($p=0.000001$)
miR-7-5p	6.71 ($p=0.015626$)	4.45 ($p=0.017109$)	8.53 ($p=0.007748$)
miR-210	6.70, ($p=0.006774$)	2.99 ($p=0.000788$)	11.85 ($p=0.000316$)
miR-21-5p	6.10 ($p=0.000000$)	6.04 ($p=0.000001$)	5.55 ($p=0.000000$)
miR-18a-5p	4.68 ($p=0.049733$)	1.28 ($p=0.720325$)	12.48 ($p=0.003952$)
miR-125b-5p	4.49 ($p=0.000000$)	-4.28 ($p=0.000000$)	-5.18 ($p=0.000000$)
miR-205-5p	4.36 ($p=0.006098$)	-5.11 ($p=0.000043$)	-4.22 ($p=0.007613$)

damage-induced apoptosis, thus increasing its metastatic potential by suppressing the expression of PTEN and PDCD4.

In our study, miRNAs miR-7-5p and miR-21-5p were upregulated >4-fold in luminal A and triple-negative tumor tissues when compared individually with normal breast tissue, suggesting that their increased expression is common to both molecular subtypes of breast cancer.

The increased expression of miR-210 in breast tumors was associated with poor prognosis [27]. Our study also demonstrated increased miR-210 expression (FR = 6.70; $p=0.006774$) in tumors compared with normal tissue. However, when we compared triple-negative and luminal A tumor tissues, miR-210 expression was higher in triple-negative tumors (FR = 3.93; $p=0.0003$). Our data confirmed Toyama's finding that miR-210 overexpression is an independent prognostic factor for triple-negative tumors, even in the absence of lymph node metastases [28]. Functional analyses in cell lines

revealed that miR-210 is involved in cellular proliferation, migration, and invasion [29].

Analysis also revealed that miR-18a-5p expression is increased 4.68-fold in invasive carcinomas compared with normal breast parenchyma. However, subgroup analysis suggested that the overexpression of miR-18a-5p in tumor compared with normal tissue was due to the magnitude of expression change in the triple-negative group. The magnitude of overexpression when triple negative and luminal A were compared was also significantly higher in the triple-negative group.

Previously, Zhou et al. [30] demonstrated that the modulated expression of miR-125b in breast tumor cells confers resistance to the cytotoxic and apoptotic effects of taxol. This occurred via the suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. In our study, the pattern of reduced expression of miR-125b-5p observed in breast tumor tissues (FR = -4.49; $p=0.000000$) was maintained when the triple-negative and luminal A groups were assessed separately, suggesting that these two molecular subtypes share a common pathway of carcinogenesis.

MiR-205, which was also downregulated in tumor samples in our study (FR = 4.36; $p=0.006098$), is considered to be a tumor suppressor miRNA. These effects are exerted partially through the regulation of E2F1, which is involved in cell cycle progression, and LAMC1, a component of the extracellular matrix that plays roles in cellular adhesion, proliferation, and migration. P53 can transactivate miR-205 directly, and stimulates the re-expression of miR-205 both in vitro and in vivo [31]. The reduced expression of miR-205 was demonstrated in triple-negative breast cancer cell lines compared with normal cells by the same authors [31]. Therefore, miR-205 was considered a potential therapeutic target in triple-negative breast tumors [32].

Triple-negative IBDC versus luminal A IBDC breast tumors

When we compared the profiles of miRNAs expression in triple-negative and luminal A tumor subtypes, miR-18a-5p (FR = 9.68; $p=0.000545$), miR-17-5p (FR = 4.27; $p=0.000664$), and miR-20a-5p (FR = 4.07; $p=0.001487$) were

Table 4 Significant differences in miRNA expression between triple-negative and luminal A invasive breast ductal carcinoma

miRNA	Fold change	95 % CI	p value	Fold regulation
miR-107	2.5867	(1.47, 3.70)	0.000186	2.5867
miR-10a-5p	0.2962	(0.15, 0.45)	0.003252	-3.3757
miR-10b-5p	0.3946	(0.24, 0.55)	0.000997	-2.534
miR-130b-3p	2.8424	(1.92, 3.77)	0.000001	2.8424
miR-155-5p	2.5976	(1.43, 3.77)	0.001607	2.5976
miR-17-5p	4.2655	(2.43, 6.10)	0.000664	4.2655
miR-186-5p	2.334	(1.64, 3.03)	0.000035	2.334
miR-18a-5p	9.6798	(5.06, 14.30)	0.000545	9.6798
miR-19a-3p	3.8073	(1.99, 5.62)	0.000844	3.8073
miR-19b-3p	3.3684	(1.85, 4.89)	0.001394	3.3684
miR-20a-5p	4.0663	(2.30, 5.83)	0.001487	4.0663
miR-20b-5p	3.727	(1.98, 5.47)	0.005743	3.727
miR-210	3.9302	(1.91, 5.95)	0.0003	3.9302
miR-223-3p	2.4601	(1.42, 3.50)	0.004343	2.4601
miR-25-3p	2.3703	(1.66, 3.08)	0.000037	2.3703
miR-93-5p	2.7526	(1.88, 3.62)	0.00001	2.7526

CI confidence interval

Fig. 1 Invasive breast ductal carcinoma (IBDC) tumors (*group 1*) compared with normal breast parenchyma (*control group*). Dispersion graph showing the miRNAs with increased expression (*red*) and decreased expression (*green*). Graphic was created using Web Based Data Analysis at <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

27a, miR-96, and miR-182. In addition, the authors suggested that FOXO1, as a miRNA target, might contribute to the maintenance of an oncogenic state in breast cancer cells [10].

Although miR-7-5p was overexpressed in invasive ductal breast carcinoma samples in our study (Fold Regulation (FR); $p=0.015626$), a previous report suggested that it could suppress cellular migration and the invasive potential of melanoma, acting at least, in part, by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 2 (IRS-2) and, consequently, the Akt (protein kinase B) signaling pathway [23].

Another miRNA that was overexpressed in our study was miR-21-5p (FR=6.10; $p=0.000000$), which was identified previously as a probable regulator of oncogenic pathways. Its expression in 15 cases of breast carcinoma was positively related to an aggressive phenotype, characterized by a more advanced stage [24]. Li et al. [25] suggested that miR-21 targets TIMP3 gene translation, assessed by measuring its mRNA and protein expression by real-time PCR and Western blotting, respectively [25]. Niu et al. [26] suggested that the induction of miR-21 allows cancer cells to escape DNA

Fig. 2 Classification of invasive breast ductal carcinoma (IBDC) tumor tissue and normal breast parenchyma based on miRNA expression. *I* downregulated miRNAs, *II* upregulated miRNAs. Graphic was created

using Web Based Data Analysis at <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

Table 1 Invasive breast ductal carcinoma tumor tissues versus normal breast parenchyma: upregulated miRNAs

miRNA	Fold change ^a	95 % CI	<i>p</i> value	Fold regulation ^b
miR-107	3.20	(1.70, 4.70)	0.001783	3.20
miR-141-3p	3.73	(2.31, 5.15)	0.000065	3.73
miR-155-5p	2.90	(1.84, 3.96)	0.019220	2.90
miR-15a-5p	2.46	(1.51, 3.41)	0.001079	2.46
miR-15b-5p	2.96	(2.06, 3.86)	0.000012	2.96
miR-16-5p	2.22	(1.45, 2.99)	0.000011	2.22
miR-181a-5p	2.62	(1.72, 3.52)	0.001527	2.62
miR-181b-5p	2.17	(1.47, 2.87)	0.003376	2.17
miR-181c-5p	2.30	(1.48, 3.12)	0.003908	2.30
miR-182-5p	7.75	(4.77, 10.73)	0.000033	7.75
miR-18a-5p	4.68	(1.88, 7.48)	0.049733	4.68
miR-193b-3p	2.56	(1.67, 3.45)	0.002069	2.56
miR-200a-3p	3.44	(1.99, 4.89)	0.000443	3.44
miR-21-5p	6.10	(4.10, 8.10)	0.000000	6.10
miR-210	6.70	(4.01, 9.39)	0.006774	6.70
miR-22-3p	2.57	(1.44, 3.70)	0.000509	2.57
miR-340-5p	2.08	(1.27, 2.89)	0.000512	2.08
miR-429	3.74	(2.08, 5.40)	0.002842	3.74
miR-7-5p	6.71	(2.99, 10.43)	0.015626	6.71
miR-93-5p	3.34	(2.01, 4.67)	0.001164	3.34
miR-96-5p	9.35	(5.32, 13.38)	0.000115	9.35
miR-98-5p	2.68	(1.55, 3.81)	0.001834	2.68

Fold-change values >1 indicate a positive or upregulation, and the fold regulation is equal to the fold change. Fold-change values <1 indicate a negative or downregulation, and the fold regulation is the negative inverse of the fold change

CI confidence interval

^a Fold change ($2^{(-\Delta\Delta C_0)}$) is the normalized gene expression ($2^{(-\Delta C_0)}$) in the test sample divided by the normalized gene expression ($2^{(-\Delta C_0)}$) in the control sample

^b Fold regulation represents fold-change results in a biologically meaningful way

components of the BRCA1-dependent DNA repair pathway and the cell cycle G2 checkpoint. In the context of breast cancer, studies have demonstrated that the primary role of miR-182-5p is to mediate the cellular response to DNA damage [12].

Table 2 Invasive breast ductal carcinoma tumor tissue versus normal breast tissue: miRNAs with reduced expression

miRNA	Fold change	95 % CI	<i>p</i> value	Fold regulation
Let-7c	0.29	(0.19, 0.39)	0.000000	-3.49
miR-100-5p	0.48	(0.31, 0.65)	0.027048	-2.08
miR-10b-5p	0.47	(0.28, 0.66)	0.012267	-2.15
miR-125b-5p	0.22	(0.16, 0.28)	0.000000	-4.49
miR-125b-1-3p	0.46	(0.31, 0.61)	0.004441	-2.16
miR-145-5p	0.30	(0.19, 0.41)	0.000000	-3.35
miR-205-5p	0.23	(0.11, 0.35)	0.006098	-4.36
miR-328	0.36	(0.27, 0.45)	0.000000	-2.75

CI confidence interval

MiR-182 is tumorigenic in melanoma [13] and in endometrial cancer [14], and it is overexpressed in lung [15], prostate [16], and colon cancers [17]. Although its expression is altered in a variety of human cancers, only some of its targets have been identified, including FOXO3, MITF [13], FOXO1 [10], BRCA1 [18], CTTN [19], RGS17 [19], and more recently CREB1 [20] and MTSS1 [21]. MiR-182-5p, together with other miRNAs from its cluster, exerts effects on apoptosis, senescence, proliferation, and migration/motility in medulloblastoma [22].

MiR-96 and miR-182 regulate the FOXO1 pathway. Their transcripts orchestrate the regulation of genes involved in the apoptotic response, cell cycle checkpoints, and cellular metabolism. FOXO1 is a tumor suppressor gene whose expression is dysregulated in some cancers such as prostate and endometrial cancers. However, the molecular mechanisms of this dysregulation are not fully understood. Gutilla observed the increased expression of FOXO1 mRNA in breast cancer samples compared with normal breast tissue and identified that FOXO1 could be regulated by the overexpression of miR-

Nanodrop. As we would need 250 ng of total RNA to start the cDNA conversion and 14 µL of a solution of total RNA were available in each case, we estipulate a cutoff of at least 17.86 ng/µL for us to be able to proceed to the next reactions.

These samples of total RNA were subjected to cDNA conversion and finally the RT-PCR. Internal controls in the reverse transcription reaction and PCR excluded another case in luminal A group and two other cases in the triple-negative group. So, that miRNA quantification was successful in 20 luminal A tumors, 24 triple-negative tumors, and 13 normal parenchyma samples. All samples were analyzed statistically using the miScript miRNA PCR Array Data Analysis software, which is based on the relative quantification method $\Delta\Delta C_t$.

IBDC tumor tissue versus normal breast parenchyma

When the miRNA expression profiles of the 44 tumor samples (24 triple-negative cases and 20 luminal A cases) and the 13 samples of normal breast tissue were compared, increased expression of several miRNAs was found in tumor samples compared with normal breast tissue (Table 1). The most overexpressed miRNAs were miR-96-5p (9.35-fold; $p=0.000115$), miR-182-5p (7.75-fold; $p=0.000033$), miR-7-5p (6.71-fold; $p=0.015626$), miR-210 (6.7-fold; $p=0.006774$), miR-21-5p (6.10-fold; $p=0.000000$), and miR-18a-5p (4.68-fold; $p=0.049733$).

Table 2 shows the miRNAs with reduced expression in tumor tissue compared with normal breast parenchyma. The miRNAs with the strongest reduction in expression were miR-125b-5p (4.49-fold; $p=0.000000$) and miR-205-5p (4.36-fold; $p=0.006098$).

The combined assessment of the six most highly expressed and the two less expressed (a fold change >4) of the miRNAs (Fig. 1) that were statistically different ($p<0.05$) allowed the samples to be divided into two groups, as shown in the clustergram (Fig. 2).

To investigate which miRNAs maintained altered expression in both triple-negative and luminal A tumors, these two breast cancer subtypes were each compared with normal tissue individually. Analysis revealed that miR-96-5p, miR-182-5p, miR-7-5p, and miR-21-5p (fold regulation >4) remained overexpressed, and miR-125-5p and miR-205-5p retained reduced expression in both subgroups (Table 3). MiR-210 and miR-18a-5p were considered to be overexpressed when comparing tumor with normal tissues only because of the magnitude of the overexpression in the triple-negative group.

Triple-negative IBDC versus luminal A IBDC

When the miRNA expression in the two tumor subgroups was compared, there were three miRNAs with increased expression in triple-negative compared with the luminal A tumors

(Table 4): miR-18a-5p (9.68-fold; $p=0.000545$), miR-17-5p (4.27-fold; $p=0.000664$), and miR-20a-5p (4.07-fold; $p=0.001487$).

Figure 3 shows the three miRNAs that were the most differentially expressed between the luminal A IBDC and triple-negative IBDC molecular subtypes by the values of fold change. The differences observed in this figure were all significant (Table 4).

Discussion

IBDC tumor tissue versus normal breast parenchyma

Comparative analysis of 44 tumor tissue samples and 13 normal tissue samples showed that six miRNAs were the most overexpressed (>4 -fold): miR-96-5p (9.35-fold; $p=0.000115$), miR-182-5p (7.75-fold; $p=0.000033$), miR-7-5p (6.71-fold; $p=0.015626$), miR-210 (6.70-fold; $p=0.006774$), miR-21-5p (6.10-fold; $p=0.000000$), and miR-18a-5p (4.68-fold; $p=0.049733$). Of these, miR-182-5p and miR-96-5p originate from close precursors with less than 10 base pairs separating them and are thus part of the same cluster. In addition, two miRNAs were downregulated in tumor tissue compared with normal tissue: miR-125b-5p (4.49-fold; $p=0.000000$) and miR-205-5p (4.36-fold; $p=0.006098$). The increased expression of miR-96-5p observed in this study is consistent with previous reports in breast cancer cell lines [10] and in prostate cancer tumor samples.

Lin et al. [11] reported that the expression of miR-96 was increased in breast cancer tissues and cells compared with normal breast tissues and epithelial cells. Ectopic expression of miR-96 induced the proliferation and anchorage-independent growth of breast cancer cells, whereas the inhibition of miR-96 decreased these parameters [11]. The overexpression of miR-96 in breast cancer cells also modulated entry in to the transitional G1/S phase of the cell cycle, probably due to decreased expression of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27(Kip1) and p21(Cip1) and the increased expression of cyclin D1, a cell cycle regulator. Moreover, miR-96 decreased FOXO3a expression by binding directly to the 3'-non-translated region. Taken together, these data suggest that miR-96 plays an important role in promoting the proliferation of human breast cancer cells, and represent a novel mechanism of miRNA-mediated direct suppression of FOXO3a in cancer cells [11].

Our observation of the 7.75-fold upregulation of miR-182-5p is consistent with the results obtained by Krishnan et al. [12], who reported the increased expression of miR-182-5p in several human breast cancer samples and highlighted its potential oncogenic role. In this study, Krishnan et al. identified more than 1,000 miR-182-5p target genes, including oncogenes and tumor suppressor genes, such as various

regulate several target genes, which makes it more challenging to identify target genes; as such, the functions of many miRNAs remain unclear [2].

Depending on whether their targets are tumor suppressor genes or oncogenes, miRNAs can act as tumor suppressors or oncogenes [1]. The reproducibility of miRNA expression techniques using archived tissues fixed in formal and embedded in paraffin (FFPE) was validated, which may encourage the use of miRNAs as breast cancer biomarkers. The dysregulation of miRNA expression in breast tumorigenesis could be an early event, because differential expression was reported in tumor precursors such as atypical ductal hyperplasia (ADH) and in situ ductal carcinoma (ISDC) [6]. This differential expression allows tumor tissue to be distinguished from normal breast parenchyma by simply performing the combined analysis of a number of miRNAs.

Confirming that a target mRNA is regulated by a miRNA (by assessing the corresponding changes in the protein expression) is as important as defining the expression profile of miRNAs. Therefore, after identifying differentially expressed miRNAs, it is important to understand their functional role in carcinogenesis.

Tumors with the triple-negative immunophenotype account for up to 15 % of breast tumors; however, there are no effective targeted therapies that result in any real gain in either disease-free or overall survival. Tumors with high levels of expression of the estrogen receptor have a well-established target therapy: tamoxifen and/or aromatase inhibitors. Luminal A subtype tumors are associated with a more favorable outcome, with a low rate of local and remote relapse [7]. Nevertheless, measuring prognostic factors does not always explain the different progression of tumors that are apparently clinically and pathologically similar. To try and elucidate the mechanisms behind the occurrence of distinct breast cancer phenotypes, studies have focused on factors such as DNA methylation, histone acetylation, RNA interference, and gene regulation by miRNAs. Therefore, identifying the miRNAs involved in the appearance of triple-negative and luminal A tumors may provide novel tools for the development of specific therapies targeted at these distinct clinical entities.

Samples and methods

The aim of the study was to investigate the expression pattern of miRNAs in the tumors of patients diagnosed with breast ductal carcinoma compared with normal breast parenchyma from the same patients. Therefore, 49 patients diagnosed with invasive breast ductal carcinoma (IBDC), confirmed by immunohistochemistry as luminal A molecular subtype [8, 9], and 56 patients diagnosed with triple-negative IBDC [8, 9] were enrolled. All patients underwent surgical treatment at the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of the

University of São Paulo between January 2007 and July 2012. The luminal A subgroup included patients with tumors measuring up to 5 cm, with negative axillary lymph nodes and the following immunohistochemical profile: estrogen receptor positive, progesterone receptor positive, HER2 negative, and a proliferation index (Ki67) <15 %. Patients were included in the triple-negative subgroup based on an immunohistochemical profile of estrogen receptor negative, progesterone receptor negative, and HER2 negative, regardless of the clinical stage. Patients who underwent neoadjuvant chemotherapy were excluded. Samples of normal breast parenchyma were obtained from the same patients as a control. The research ethics committee CAPPesq approved this research in June 2010.

All specimens were FFPE tissues that were dissected for the purification of normal and tumor tissue. The Qiagen miRNeasy FFPE Kit was used to extract RNA extraction from FFPE tissues. For cDNA synthesis and relative miRNA quantification, the Qiagen miScript II RT Kit, Qiagen miScript SYBR Green PCR Kit, and Qiagen miScript miRNA PCR Arrays were used. The Human Breast Cancer miRNA PCR Array (Qiagen) was used to identify specific miRNA sequences. The 96-well plate was distributed as follows: 84 miRNA primers, 2 miRNA extraction controls, 6 housekeeping snRNAs (SNORD-61, SNORD-68, SNORD-72, SNORD-95, SNORD-96A, and RNU6-2), 2 reverse transcription reaction controls, and 2 PCR positive controls. This allowed us to assess the expression of 84 miRNA sequences whose expression is potentially related to breast cancer diagnosis, stage, and prognosis, and that may regulate genes associated with breast cancer (Qiagen MIHS 109Z). Samples were analyzed by PCR using the ABI 7500 Real-Time PCR System. The controls in the plate allowed the analysis to be performed using the relative quantification method $\Delta\Delta C_t$ and to investigate reverse transcription and PCR fidelity.

Results

Patients were selected and harvested according to the above-mentioned criteria. Two groups of patients were used: luminal A IBDC group and triple-negative IBDC group. Initially, 46 patients were enrolled in the luminal A IBDC group and 56 patients in the triple-negative IBDC group. However, we have excluded 20 patients from luminal A IBDC group and 28 patients from triple-negative IBDC group because FFPE were not available. RNA was extracted from 26 luminal A tumors, 28 triple-negative tumors, and 40 normal breast parenchyma. Of the 26 paraffin blocks of the luminal A IBDC group, we have obtained adequate concentration of the total RNA in 21 cases. Of the 28 paraffin blocks of the triple-negative group, we have obtained adequate concentration of the total RNA in 26 cases. These adequate concentrations were measured by

18b were also higher in estrogen receptor-negative compared with estrogen receptor-positive tumors. Therefore, data suggest that miRNAs inhibit the estrogen receptor alpha in breast cancer [40, 41]. Consistent with this, an additional study reported elevated expression of miR-18a/b in basaloid tumors [42]. On the other hand, Castellano et al. reported that pre-miR-18a was significantly upregulated in ER-positive compared to ER-negative breast cancers [43].

The reproducibility of measuring miRNA expression techniques using archived FFPE tissues has been demonstrated, and it supports the use of miRNAs as biomarkers in breast cancer. The combined analysis of the expression of a relatively small number of miRNAs allows tumor tissue to be distinguished from normal breast parenchyma. Some miRNAs play roles in breast carcinogenesis by regulating more than one molecular subtype. Additional miRNAs seem to affect carcinogenesis by silencing genes such as the estrogen receptor, possibly interfering in the different tumor phenotypes such as luminal A and triple-negative tumors. Identifying the different mechanisms by which miRNAs regulate gene expression should represent an important step in characterizing the carcinogenesis of a variety of tumors, and thus lead to more specific and effective treatments.

Acknowledgments This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP, São Paulo-SP, Brazil.

Conflicts of interest None

References

- Khoshnaw SM, Green AR, Powe DG, Ellis IO. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2009;62:422–8.
- Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev*. 2009;84:55–71.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297:2056–60.
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DJ, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:16961–6.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1108–14.
- Chen L, Li Y, Fu Y, Peng J, Mo MH, Stamatakis M, et al. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue. *PLoS One*. 2013;8:e54213.
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684–91.
- Sortica T, Perou CM, Tibshirani R, Turid A, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869–74.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367–74.
- Gutilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2009;284:23204–16.
- Lin H, Dai T, Xiong H, Zhao X, Chen X, Yu C, et al. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by down-regulating transcriptional factor FOXO3a. *PLoS One*. 2010;5:e15797.
- Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Waddell N, et al. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA*. 2013;19:230–42.
- Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:1814–9.
- Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2010;70:367–77.
- Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *Eur J Cancer*. 2009;45:2197–206.
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126:1166–76.
- Salver AL, French AJ, Borralho PM, Thayaniy V, Oberg AL, Silverstein KA, et al. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer*. 2009;9:401.
- Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, et al. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011;41:210–20.
- Sun Y, Fang R, Li C, Li L, Li F, Ye X, et al. Hsa-miR-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:501–7.
- Kong WQ, Bai R, Liu T, Cai CL, Liu M, Li X, et al. MicroRNA-182 targets cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein 1 (CREB1) and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma. *FEBS J*. 2012;279:1252–60.
- Liu Z, Liu J, Segura MF, Shao C, Lee P, Gong Y, et al. Mir-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol*. 2012;228(2):204–15.
- Weeraratne SD, Amani V, Teider N, Pierre-Francois J, Winter D, Kye MJ, et al. Pleiotropic effects of miR-183–96–182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2012;123:539–52.
- Giles KM, Brown RA, Epis MR, Kalinowski FC, Leedman PJ. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430:706–10.
- Ozgun A. MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer. *Onkologie*. 2013;36:115–8.
- Li J, Zhang Y, Zhang W, Jia S, Tian R, Kang Y, et al. Genetic heterogeneity of breast cancer metastasis may be related to miR-21 regulation of TIMP-3 in translation. *Int J Surg Oncol*. 2013;2013:875078.
- Niu J, Shi Y, Tan G, Yang CH, Fan M, Pfeffer LM, et al. DNA damage induces NF- κ B-dependent microRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion. *J Biol Chem*. 2012;287:21783–95.
- Hong L, Yang J, Han Y, Lu Q, Cao J, Syed L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Gene*. 2012;507:135–8.

28. Toyama T, Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, et al. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:256–63.
29. Rothé F, Ignatiadis M, Chaboteaux C, Haibe-Kains B, Kheddoumi N, Majaj S, et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS One*. 2011;6:e20980.
30. Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y, et al. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J Biol Chem*. 2010;285:21496–507.
31. Piovan C, Palmieri D, Di Leva G, Braccioli L, Casalini P, Nuovo G, et al. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol Oncol*. 2012;6:458–72.
32. Mahamodhossen YA, Liu W, Rong-Rong Z. Triple-negative breast cancer: new perspectives for novel therapies. *Med Oncol*. 2013;30:653.
33. Li H, Bian C, Liao L, Li J, Zhao RC. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBPI. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126:565–75.
34. Yang X, Du WW, Li H, Liu F, Khorshidi A, Rutnam ZJ, et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:9688–704.
35. Kyoung Hyun K, Gayathri C, Syng-ook L, Daisuke Y, Sastre-Garau X, Pierre-Antoine D, et al. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene*. 2012;31(8):1034–44.
36. Zuoren Y, Chenguang W, Min W, Zhiping L, Mathew CC, Manran L, et al. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol*. 2008;182(3):509–17.
37. Zuoren Y, Nicole EW, Jie Z, Sanjay K, Min W, Yang L, et al. microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *PNAS*. 2010;107(18):8231–6.
38. Zhang ZW, An Y, Teng CB. The roles of miR-17-92 cluster in mammal development and tumorigenesis. *Yi Chuan*. 2009;31:1094–100.
39. Guo X, Yang C, Qian X, Lei T, Li Y, Shen H, et al. Estrogen receptor α regulates ATM expression through miRNAs in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4994–5002.
40. Leivonen SK, Mäkelä R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K, et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2009;28:3926–36.
41. Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, et al. Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor α in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:331–9.
42. Jonsdottir K, Janssen SR, Da Rosa FC, Gudlaugsson E, Skaland I, Baak JP, et al. Validation of expression patterns for nine miRNAs in 204 lymph-node negative breast cancers. *PLoS One*. 2012;7:e48692.
43. Leandro C, Georgios G, Jimmy J, Coombes RC, Walter L, Paul T, et al. The estrogen receptor-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *PNAS*. 2009;106(37):15732–7.