CARLOS MARINO CABRAL CALVANO FILHO

**Caracterização da expressão de microRNAs em
carcinoma de mama triplo 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: Dr. Marcos Desidério Ricci

**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

Calvano Filho, Carlos Marino Cabral

Caracterização da expressão de microRNAs em carcinoma de mama triplo negativo / Carlos Marino Cabral Calvano Filho. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Marcos Desidério Ricci.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Neoplasias de mama triplo negativas/patologia 3.Neoplasias de mama triplo negativas/diagnóstico 4.Neoplasias de mama triplo negativas/genética 5.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 6.Expressão gênica 7.Carcinoma ductal de mama/patologia 8.Carcinoma ductal de mama/genética 9.Prognóstico 10.Taxa de sobrevida 11.Genes supressores de tumor 12.Imuno-histoquímica 13.Marcadores biológicos de tumor/análise 14.Neoplasias da mama/patologia

USP/FM/DBD-151/14

*A Deus, meu alicerce.
Aos meus amados pais, Carlos e Adalgisa,
verdadeiros exemplos de vida, pelos ensinamentos,
pela dedicação e pelo companheirismo.
À minha amada irmã Daniele, pelo carinho,
pela clareza, pela objetividade e pela leveza.*

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pelo dom desta vida, pela saúde e pela família que me foi concedida.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao saudoso Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, por ter confiado em minha capacidade de trabalho.

Ao Dr. Marco Desidério Ricci, pela atenção, dedicação e paciência.

À Dra. Kátia Cândido Carvalho, por ter colaborado intensamente neste projeto.

Aos amigos do LIM-58, Natália Garcia, Thiago Hideki, Juciara Costa Silva, Rodrigo Rodrigues Marcondes e Marinalva de Almeida, pela disponibilidade e pelo profissionalismo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração desta Tese.

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível”.*

São Francisco de Assis

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta tese 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. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia 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 edição. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Revisão da literatura	3
1.1.1 Sobre os tumores triplo negativos.....	3
1.2 Definição de miRNA.....	15
1.3 Formação do miRNA	16
1.4 Funções do miRNA.....	18
1.4.1 miRNAs na regulação dos genes-alvo	18
1.5 Perfil de miRNAs no câncer	20
1.6 miRNAs como oncogenes e supressores tumorais	23
1.7 miRNAs e apoptose	24
1.7.1 miRNAs e as vias de apoptose	25
1.7.2 Regulação da apoptose por miRNAs por meio de sua ação sobre vias oncogênicas e supressoras tumorais	27
1.7.2.1 PDCD4.....	27
1.7.2.2 TPM1	28
1.7.2.3 PTEN	28
1.7.2.4 Tp53.....	29
1.7.2.5 HMGA2	29
1.7.2.6 O perfil de expressão dos miRNAs no câncer de mama	31
1.8 miRNAs e a resposta à terapia oncológica medicamentosa	33
1.8.1 Sobre as novas evidências de mecanismos de ação dos miRNAs.....	35
1.8.2 Sobre os miRNAs circulantes	36
1.8.3 Sobre a extração de miRNAs de tecidos parafinados.....	39
1.8.4 Fundamentos para a terapêutica com miRNAs	41

1.9 Sobre a terapia utilizando miRNAs	42
1.9.1 Restaurar os níveis de miRNA com pequenas moléculas.	42
1.9.2 Restaurar os níveis de miRNA com abordagens baseadas em oligonucleotídeos	43
1.9.3 Bloquear a função do miRNA com abordagens baseadas em oligonucleotídeos	44
1.9.4 Pequenas moléculas visando aos miRNAs.....	46
1.9.5 Bloqueio extracelulares em exossomos de miRNAs.....	47
1.9.6 Abordagens combinadas	47
1.9.7 Desafios e perspectivas	48
2 OBJETIVOS	50
2.1 Primário.....	50
2.2 Secundários	50
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	52
3.1 Casuística	52
3.2 Métodos	52
3.2.1 Preparo dos cortes de parafina para purificação de RNA.....	54
3.2.2 Protocolo de desparafinização.....	55
3.2.2.1 Princípios	55
3.2.2.2 Procedimentos	55
3.2.2.3 Quantificação e qualificação da amostra obtida.....	58
3.2.3 Fase de transcrição reversa (conversão em cDNA)	59
3.2.3.1 Princípios	59
3.2.4 Protocolo de conversão em cDNA	60
3.2.4.1 Procedimentos	60
3.2.5 Fase de PCR em tempo real.....	61
3.2.5.1 Protocolo para PCR	61
3.2.6 Método estatístico.....	63
4 RESULTADOS	67
5 DISCUSSÃO.....	96
5.1 miR-96-5p e miR-182-5p	96
5.1.1 miR-7-5p	98
5.1.2 miR-21-5p	99
5.1.3 MIR 93-5p	99

5.1.4 Mir 210-3p.....	100
5.1.5 Mir-155-5p.....	100
5.1.6 miR-18a-5p	101
5.1.7 miR 125b-5p	101
5.1.8 miR 205-5p	102
5.1.9 miR 204-5p	102
5.1.10 Let-7c-5p.....	103
5.2 Expressão de microRNAs e idade das pacientes	105
5.3 Expressão de microRNAs e <i>status</i> menopausal	106
5.4 Expressão de microRNAs e paridade	107
5.5 Expressão de microRNAs e amamentação	108
5.6 Expressão de microRNAs e idade ao primeiro parto a termo	109
5.7 Expressão de microRNAs e história familiar de câncer de mama e/ou ovário	109
5.8 Expressão de microRNAs e terapia hormonal	110
5.9 Expressão de microRNAs e tabagismo	110
5.10 Expressão de microRNAs e tamanho tumoral	110
5.11 Expressão de microRNAs e <i>status</i> linfonodal	111
5.12 Expressão de microRNAs e infiltrado inflamatório	111
5.13 Expressão de microRNAs e invasão linfática.....	112
5.14 Expressão de microRNAs e invasão perineural.....	113
5.15 Expressão de microRNAs e componente intraductal.....	113
5.16 Expressão de microRNAs e estadiamento.....	114
5.17 Expressão de microRNAs e índices de KI-67	115
5.18 Expressão de microRNAs e sobrevida	115
6 CONCLUSÃO	119
7 ANEXOS.....	121
Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética	121
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	122
8 REFERÊNCIAS	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGO2	Proteína Argonaute2
AID	<i>Activation Induced Cytidine Deaminase</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
cDNA	DNA Complementar
CK 5-6	Citoqueratina 5-6
DAB2	<i>Disabled Homolog 2</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
dsRBD	<i>Double-Stranded RNA-Binding Domain</i>
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
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
ITGB8	Integrin-Beta 8
Ki-67	Proteína Nuclear Associada à Proliferação Celular
LATS2	<i>Large Tumor Suppressor Homology 2</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
Ng	Nanograma
p53	Proteína Citoplasmática de Massa Molecular 53 kDa
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA Mensageiro
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
rpm	Rotações por Minuto
RT-PCR	<i>Real Time – Polimerase Chain Reaction</i>
snRNA	RNAs Nucleares
siRNAs	<i>Short Interfering RNAs</i>
snoRNA	RNAs Nucleolares
TPM-1	Tropomiosina 1
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TP53INP1	<i>Tumor Protein 53 Induced Nuclear Protein 1</i>
TRBP	<i>Trans-Activation Response RNA-Binding Protein</i>
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
µl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas evolutivas de diferenciação das células-tronco em células epiteliais maduras e o subtipo molecular originário do sequestro das células progenitoras nos diferentes estágios (Prat, Perou, 2009).	5
Figura 2 –	Imagem esquemática da sobreposição entre tumores triplo negativos, basal-símile e BRCA1 positivos (Pal SK, Mortimer J. Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions. <i>Maturitas</i> 2009; 63:269–74).	9
Figura 3 –	Comparação da sobrevida global por estágio entre pacientes com CMTN e pacientes com outros subtipos (Bauer <i>et al.</i> <i>Cancer</i> . 2007; 109:1721–1728).....	12
Figura 4 -	Processo de formação do miRNA maduro (Lynam-Lennon, 2009).....	17
Figura 5 -	Regulação gênica pelo miRNA (Lynam-Lennon, 2009).....	20
Figura 6 -	Modelo dos mecanismos moleculares dos miRNAs envolvidos na patogênese do câncer. Eles 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 <i>et al.</i> , 2007).	31
Figura 7 -	Técnica de conversão em cDNA	59
Figura 8 -	Casos bem-sucedidos da extração de RNA total à quantificação de miRNA	67
Figura 9 -	Clustergrama da magnitude da expressão gênica de miRNAs.....	73
Figura 10 -	Categorização supervisionada dos microRNAs estudados, dividindo as amostras em dois grupos: tecido tumoral (T) e tecido não tumoral (N).	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de dispersão: em vermelho, miRNAs hiperexpressos, em verde, os hipoexpressos ($p < 0.05$; $+4 < \text{fold regulation} < -4$).....	74
Gráfico 2 - Comparação dos <i>fold-change</i> de microRNAs com expressão relevante	75
Gráfico 3 - Distribuição dos casos por estágio da doença.....	77
Gráfico 4 - Distribuição dos casos de acordo com o tratamento cirúrgico realizado.....	77
Gráfico 5 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência livre de doença (SLD) para os diferentes níveis de miR-199a-5p.....	91
Gráfico 6 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência livre de doença (SLD) para os diferentes níveis de miR-223-3p	91
Gráfico 7 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica (SCE) para os diferentes níveis de miR-199a-5p.....	92
Gráfico 8 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica (SCE) para os diferentes níveis de miR-199b-3p.....	93
Gráfico 9 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica (SCE) para os diferentes níveis de miR-152-3p.....	93
Gráfico 10 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica para os diferentes níveis de miR-125b-1-3p.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Componentes da reação de transcrição reversa	60
Tabela 2 –	Componentes para reação PCR	62
Tabela 3 -	Condições de Ciclagem para PCR em Tempo Real	63
Tabela 4 -	Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido tumoral	68
Tabela 5 -	Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido normal	69
Tabela 6 -	Valores do <i>fold-change</i> , intervalo de confiança, <i>p-value</i> e <i>fold-regulation</i> nos miRNAs avaliados	70
Tabela 7 –	Dados da expressão de microRNAs avaliados por grupos de idade. Em vermelho, hiperexpressão, e, em azul, hipoeexpressão (considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$; $P < 0,05$).	79
Tabela 8 –	Dados da expressão de microRNAs avaliados por grupos de idade em Teste Post-Hoc.	80
Tabela 9 -	MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao <i>status</i> menopausal das pacientes. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoeexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$	81
Tabela 10 -	MicroRNAs com expressão aberrante em relação à paridade das pacientes. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoeexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$	82
Tabela 11 -	MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao antecedente de amamentação das pacientes. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoeexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$, e $p < 0,05$	82
Tabela 12 -	MicroRNAs com expressão aberrante em relação à idade no primeiro parto de gestação a termo. Em azul, houve hipoeexpressão, considerando <i>fold regulation</i> < -2 e $p < 0,05$	83

Tabela 13 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à história familiar para câncer de mama e/ou ovário. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando <i>fold regulation</i> >2 e $p < 0,05$.	83
Tabela 14 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à terapia hormonal. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.	84
Tabela 15 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao tamanho tumoral. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.	85
Tabela 16 - Dados da expressão de microRNAs avaliados por grupos de idade em Teste Post-Hoc.	86
Tabela 17 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao <i>status</i> linfonodal. Em vermelho, houve hiperexpressão considerando <i>fold regulation</i> >2 e $p < 0,05$.	87
Tabela 18 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à presença de infiltrado inflamatório. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.	87
Tabela 19 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação a presença de invasão linfática. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando <i>fold regulation</i> >2 e $p < 0,05$.	88
Tabela 20 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à presença de invasão perineural. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.	88
Tabela 21 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à presença de componente intraductal associado. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.	89
Tabela 22 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao estadiamento. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando <i>fold regulation</i> >2 e $p < 0,05$.	89
Tabela 23 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao índice de KI-67 imunoistoquímico. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando <i>fold regulation</i> >2 e $p < 0,05$.	90

Tabela 24 - Dados para análise de sobrevida livre de doença (Qui ² : Qui quadrado; P: significância).	90
Tabela 25 - Dados para análise de sobrevida câncer específica (Qui ² : Qui quadrado; P: significância).	92

RESUMO

Calvano Filho CMC. *Caracterização da expressão de micro RNAs em carcinoma de mama triplo negativo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: 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. A depender se os miRNAs têm como alvo genes supressores de tumor ou oncogenes, eles podem atuar como supressores tumorais ou oncogenes. A imunoistoquímica triplo negativa, no câncer de mama, é, comumente, utilizada como substituto clínico para identificação dos tumores basaloides, que se caracterizam pela expressão de genes epiteliais basais, sendo associados a menores taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global. O câncer de mama triplo negativo faz com que seja necessária a descoberta de marcadores moleculares que possam servir de alvos terapêuticos ou, pelo menos, que sirvam como marcadores preditivos da resposta aos quimioterápicos. **OBJETIVO:** avaliar a expressão de microRNAs, por PCR em tempo real, no carcinoma mamário ductal invasivo (CDI) triplo negativo. **MÉTODOS:** Foram avaliados materiais em parafina de tumor de 31 pacientes com as seguintes características: carcinoma invasivo de mama, receptores de estrogênio e de progesterona negativos e HER 2 negativo, 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. Foram avaliados dados clínicos, como idade, paridade, amamentação, *status* menopausal; variáveis histológicas, como tamanho do tumor, *status* linfonodal, invasão linfática; características imunoistoquímicas, como expressão de Ki-67, EFGR e CK 5/6. O seguimento das pacientes buscou verificar a ocorrência e o tempo de aparecimento de recidiva loco regional, metástase à distância e óbito. Para análise estatística foi utilizado o *software* miScript miRNA PCR Array Data Analysis, que utiliza o método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$. **RESULTADOS:** A análise comparativa dos 31 casos de CDI triplo negativo com os 18 casos de parênquima mamário normal definiu microRNAs hiperexpressos, sendo eles: miR-96-5p (fold-regulation(FR) = 9,68, $p = 0,000008$), miR-21-5p (FR = 4,47, $p = 0,00$), miR-7-5p (FR = 5,8, $p = 0,00137$), miR-182-5p (FR= 7,92, $p = 0,000001$), miR-210-3p (FR = 11,83, $p = 0,000048$), miR-18a-5p (FR = 9,51, $p = 0,000034$), miR-155-5p (FR= 4,40, $p = 0,00019$) e miR-93-5p (FR= 4,15, $p = 0,000023$). Aponta, ainda, microRNAs com hipoexpressão, a saber: miR-204-5p (FR = -10,26, $p = 0$),

miR-205-5p (FR= -4,07, p = 0,019822), miR-125b-5p (FR= -4,29, p=0) e let 7c-5p (FR= -4,91, p=0). CONCLUSÃO: a expressão de microRNAs no carcinoma ductal invasivo triplo negativo permite diferenciá-lo do tecido normal.

Descritores: MicroRNAs; Neoplasias de mama triplo negativas/patologia; Neoplasias de mama triplo negativas/diagnóstico; Neoplasias de mama triplo negativas/genética; 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

Calvano Filho CMC. *Characterization of the expression of microRNAs in triple negative breast carcinoma* [Dissertation]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: 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. The triple negative immunohistochemistry in breast cancer is commonly used as a substitute for clinical identification of basaloid tumors, which are characterized by the expression of basal epithelial genes and are associated with lower rates of disease-free survival and overall survival. The triple negative breast cancer makes necessary the discovery of molecular markers that may serve as therapeutic targets or at least as predictive markers of response to chemotherapy. **OBJECTIVE:** evaluate the expression of microRNAs by RT-PCR in triple negative breast invasive ductal carcinoma (IDC). **METHODS:** Paraffin embedded tumor material from 31 patients with the following characteristics were evaluated: invasive breast carcinoma, negative estrogen and progesterone receptor, negative HER 2, 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, EFGR and CK 5/6 were evaluated. The follow-up of patients aimed to verify the occurrence and time of appearance of loco regional recurrence, distant metastasis and death. For statistical analysis the miScript miRNA PCR Array Data Analysis software, which uses the method of relative quantification $\Delta\Delta C_t$, was used. **RESULTS:** A comparative analysis of 31 cases of triple negative IDC with 18 cases of normal breast parenchyma defined microRNAs overexpressed, as follows: miR-96-5p (fold-regulation (FR) = 9.68, $p = 0.000008$), miR -21-5p (FR = 4.47, $p = 0.00$), 5p, miR-7 (FR = 5.8, $p = 0.00137$), miR-182-5p (FR = 7.92, $p = 0.000001$), miR-210-3p (FR = 11.83, $p = 0.000048$), miR-18a-5p (FR = 9.51, $p = 0.000034$), miR-155-5p (FR = 4.40, $p = 0.00019$) and miR-93-5p (FR = 4.15, $p = 0.000023$). Furthermore, microRNAs with reduced expression, as follows: miR-204-5p (FR = -10.26, $p = 0$), miR-205-5p (FR = -4.07, $p = 0.019822$), miR -125b-5p (FR = -4.29, $p = 0$) and Let-7c 5p (FR = -4.91, $p = 0$). **CONCLUSION:** the expression of

microRNAs in triple negative invasive ductal carcinoma allows to differentiate it from normal tissue

Descriptors: MicroRNAs; Triple negative breast neoplasms/pathology; Triple negative breast neoplasms/diagnosis; Triple negative breast neoplasms/genetics; 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

O número de casos novos de câncer de mama esperados no Brasil, para o ano de 2014, segundo dados do Ministério da Saúde, é de 57.120 com risco estimado de 56,09 casos/100.000 mulheres. Suas taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas em 2012 na Europa Ocidental (96/100 mil) e as menores taxas na África Central e na Ásia Oriental (27/100 mil) (Estimativa-Ministério da Saúde do Brasil, 2014).

Sabe-se que os fatores prognósticos habituais não são capazes de representar a heterogeneidade intrínseca dos diversos tumores malignos mamários. Tal fato pode ser evidenciado nas diferentes evoluções observadas em casos aparentemente similares do ponto de vista clínico-patológico.

Esta diversidade foi confirmada por análises moleculares realizadas por meio de estudos da expressão genética que mostraram que cada tumor mamário tem sua própria identidade molecular. Considerando estes perfis de expressão ou assinaturas genéticas, os tumores podem ser subclassificados em luminal A, luminal B, mama normal símile, HER-2/ErbB2 e basaloide.

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); e
- ✓ Células mioepiteliais (que formam uma segunda camada em torno das células luminais em contato direto com a membrana basal).

Os tumores triplo negativos são aqueles com expressão negativa dos receptores de hormônios esteroidais (estrogênio e progesterona) e que não

apresentam amplificação ou superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal HER-2/ErbB2. A imunoistoquímica triplo negativa é comumente utilizada como substituto clínico para identificação dos tumores basaloides, que se caracterizam pela expressão de genes epiteliais basais, sendo associados a menores taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Essa classe de tumores mamários é particularmente interessante porque os genes que são responsáveis pela sua maior agressividade fenotípica ainda não foram bem entendidos. São necessários estudos que venham a fornecer dados para o melhor entendimento do comportamento fenotípico e desenvolvimento de terapias específicas para essa classe de tumores. A avaliação de moléculas de MicroRNA pode nos fornecer algumas destas novas informações.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Sobre os tumores triplo negativos

Os cânceres de mama são heterogêneos entre si pois são constituídos por grupamentos de células malignas diferentes do ponto de vista imunoistológico. Genes específicos, que estas células expressarão, vão determinar a ocorrência de biomarcadores e receptores de membrana específicos, que podem ser identificados e permitirão, assim, a classificação do câncer em subtipos (Carrie *et al.*, 2012)

Baseado na expressão desses biomarcadores, o câncer de mama pode ser classificado em três subtipos principais, que refletem opções terapêuticas disponíveis: receptores hormonais positivos, HER-2 positivo com ou sem receptores hormonais positivos e os triplo negativos (receptores hormonais e HER-2 negativos). O grupo triplo negativo, até o momento, não apresenta terapia medicamentosa alvo disponível na prática clínica, recebendo tratamento medicamentoso com quimioterapia citotóxica quando indicada.

Para entendermos essa diversidade de expressão imunoistoquímica dos cânceres mamários, devemos conhecer a histologia do tecido mamário normal.

O tecido mamário normal é constituído por epitélio estratificado situado sobre a membrana basal. Há duas populações celulares neste epitélio: células epiteliais e mioepiteliais. Eles podem ser diferenciados por imunoistoquímica (IHQ) por meio de anticorpos anticitoqueratinas (CK) e miosina (Bosch A *et al.*, 2010). As células epiteliais são positivas para citoqueratinas de baixo peso molecular (CK7, CK8, CK18, CK19) (Anders, Carey, 2008) e as células mioepiteliais são positivas para citoqueratinas de alto peso molecular (CK5/6, CK14, CK17) (Gluz *et al.*, 2009).

As células epiteliais e mioepiteliais maduras originam-se de uma célula-tronco.

As células-tronco dão origem a uma célula progenitora bipotente que pode se diferenciar em uma progenitora luminal ou uma progenitora mioepitelial. A progenitora mioepitelial transforma-se em célula mioepitelial diferenciada. A progenitora luminal diferencia-se em uma progenitora luminal tardia e, então, em uma célula epitelial madura.

Perou *et al.* demonstraram que os carcinomas da mama podiam ser classificados em subgrupos moleculares distintos, tendo por base o perfil da expressão gênica obtido por cDNA microarray. A maior diferença entre os perfis de expressão gênica foi encontrada entre os tumores com receptores hormonais (RH) positivos e os com receptores hormonais (RH) negativos. Os tumores RH positivos formaram o “grupo luminal” (luminal A e B). Os tumores RH negativos foram subdivididos em três subgrupos moleculares: os HER-2 positivos, os tumores “basal-like” e os tumores “normal-like” (triplo negativos e semelhantes ao tecido normal) (Perou *et al.*, 2000).

Sorlie *et al.* estabeleceram uma nova classificação do câncer de mama baseado em suas características moleculares. Ele utilizou um “conjunto de genes intrínsecos”, que continha 456 clones de cDNA, em 78 tumores, dos quais 51 haviam sido tratados com doxorrubicina em neoadjuvância. Os subgrupos luminal A e B mostraram alta expressão de receptores de

estrogênio. Os grupos basal-like, HER-2 like e normal like mostraram baixa expressão de receptores de estrogênio (Søerlie *et al.*, 2001). Estudos subsequentes conseguiram reproduzir esses subgrupos. Especialmente o basal-like e o HER-2 like (Gluz *et al.*, 2009).

Perou inferiu que os cinco subtipos moleculares de câncer de mama resultavam do sequestro de células progenitoras em diferentes estágios do desenvolvimento em células epiteliais maduras. Sendo assim, ele concluiu que o câncer de mama Claudin-low surge a partir da célula-tronco, o basal like surge a partir das células bipotentes e das células progenitoras luminais, o grupo HER-2-like surge a partir da célula progenitora luminal tardia e os subtipos luminal A e B, surgem das células luminais diferenciadas (Figura 1) (Perou, 2010).

Figura 1 - Etapas evolutivas de diferenciação das células-tronco em células epiteliais maduras e o subtipo molecular originário do sequestro das células progenitoras nos diferentes estágios (Prat, Perou, 2009).

O câncer de mama triplo negativo é caracterizado pela falta de expressão, ou mínima expressão, do receptor de estrogênio (RE), do

receptor de progesterona (RP) e ausência de superexpressão do HER-2. De acordo com a orientação da Sociedade Americana de Oncologia Clínica, a negatividade imunoistoquímica dos receptores hormonais é definida quando menos de 1% dos núcleos celulares apresentam-se reativos (Hammond *et al.*, 2010).

A não superexpressão do HER-2 é definida com imunoistoquímica < 2+ ou uma razão de hibridização “in situ” por fluorescência < 2.2 ou uma média de cópias de gene HER-2 menor que 6 sinais por núcleo (Wolff *et al.*, 2007).

O termo câncer de mama triplo negativo (CMTN) não reflete uma única doença, mas uma família de doenças em que cada membro apresenta uma assinatura molecular própria e uma distinta resposta terapêutica (Stagg, Allard, 2013).

Cerca de 80% dos CMTN são classificados como basal-símile. Como não há expressão dos receptores hormonais nem de HER-2, as terapias hormonais e moleculares existentes para outros subtipos de tumores não encontram uso neste. Sendo assim, até o presente, as opções terapêuticas para os CMTN restringem-se a quimioterapias citotóxicas sistêmicas convencionais.

O CMTN representa 15-20% de todos os cânceres da mama e, geralmente, é do subtipo ductal invasor. Entretanto, tais tumores possuem múltiplos subtipos que são assim classificados pelos padrões imunoistoquímicos e por suas mutações gênicas específicas Identificadas (<http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/breastcancer-what-is-breast-cancer>).

Um subtipo, denominado subtipo basal-símile, contém características imunoistológicas semelhantes nas membranas celulares e receptores que são semelhantes às células epidérmicas basais epiteliais.

Recentemente, foi identificado um subtipo de CMTN não basal denominado “claudin-low”. Esse subtipo minoritário é caracterizado como triplo negativo associado a uma baixa expressão das proteínas de junção claudin 3, 4, 7 e da E-caderina (Herschkowitz *et al.*, 2007). Estes tumores expressam características mesenquimais, com níveis baixos de genes

luminais, e alta expressão de marcadores de células endoteliais e linfócitos. Os tumores são enriquecidos com marcadores de transição epitelial-mesenquimal e se assemelham a células-tronco epiteliais mamárias. Nas análises de sobrevida, os tumores ditos “claudin-low” apresentam um resultado intermediário quando comparados a tumores luminais e basais, além de resposta intermediária à quimioterapia (Prat *et al.*, 2010).

Além da presença destes biomarcadores, os testes genéticos também podem classificar os tumores de acordo com a presença ou não de mutações nos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2. Até 20% das pacientes com CMTN apresentam mutações de BRCA, principalmente de BRCA 1 (Kandel *et al.*, 2010).

Os CMTN apresentam sobreposição considerável entre os subtipos basaloides e os tumores relacionados à mutação de BRCA1, ambos apresentando curso clínico agressivo. Entretanto, esta sobreposição não é completa.

Um grupo de pesquisadores da Universidade Vanderbilt, Nashville, dividiu os CMTN em 06 subtipos diferentes, baseados na ontologia e expressão gênica, sendo eles: dois subgrupos basal-símile (BL1 e BL2), um mesenquimal(M), um mesenquimal tronco-símile(ML), um imunomodulador e um receptor de androgênio luminal (Chen *et al.*, 2012).

Lehmann *et al.* (2011) compilaram um conjunto de 587 perfis de expressão gênica de tumores triplo negativos de 21 estudos publicados. A análise de agrupamento dos genes mais diferencialmente expressos identificou sete subgrupos: basal-símile 1, basal-símile 2, imunomodulador, mesenquimal, mesenquimal tronco-símile, receptor androgênico luminal e um agrupamento instável que não pode ser classificado (Lehmann *et al.*, 2011).

Os subgrupos basal-símile 1 e 2 eram altamente proliferativos e apresentavam uma maior expressão de genes de resposta aos danos de DNA e ciclo celular. Os subgrupos mesenquimal e mesenquimal tronco-símile mostravam genes EMT (transição epitélio mesenquimal), enquanto

que o subtipo imunomodulador mostrava a presença de características imunológicas de sinalização celular.

O subtipo receptor androgênico luminal era receptor estrogênico negativo, porém mostrava-se relacionado a vias hormonais e expressava receptores de androgênio, sugerindo um papel na terapia antiandrogênica nestes casos.

Em um estudo recente sobre neoadjuvância, a expressão do receptor de andrógeno em CMTN foi associada com prognóstico favorável (Loibl *et al.*, 2011) e a relevância biológica do receptor androgênico no câncer de mama e seu papel potencial na terapia é debatida (McNamara *et al.*, 2013).

Um conjunto de 50 genes (Pam 50) foi desenvolvido para classificar os subtipos de câncer de mama de uma forma concordante com a classificação feita por maiores conjuntos de genes intrínsecos usados, originalmente, para subtipagem (Parker *et al.*, 2009).

Os carcinomas luminais e basal-símile apresentam biologia tumoral substancialmente diversa e, por isso, podem ser considerados como doenças distintas. A diversidade etiológica entre esses subtipos tumorais faz com que a estratificação desses seja utilizada para que sejam identificadas características comuns na tumorigênese que possam, eventualmente, ser utilizadas na seleção de terapias futuras.

A maioria dos tumores basal-símile é triplo negativa, porém não todas e outros perfis moleculares demonstraram heterogeneidade extensa tanto dos tumores triplo negativos quanto dos basaloides (Figura 2).

Figura 2 – Imagem esquemática da sobreposição entre tumores triplo negativos, basal-símile e BRCA1 positivos (Pal SK, Mortimer J. Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions. *Maturitas* 2009; 63:269–74).

Na microscopia, o CMTN está associado a alto índice proliferativo, bordas infiltrantes frequentemente com infiltrado linfocítico estromal na borda tumoral e regiões necróticas centrais (Livasy *et al.*, 2006). A análise imunoistoquímica mostra que o CMTN está associado à alta expressão do marcador de proliferação KI 67 (Hugh *et al.*, 2009), assim como vários marcadores de crescimento das células cancerosas, incluindo p53 e p53 mutado (Sörlie *et al.*, 2001; Foulkes *et al.*, 2004; Rakha *et al.*; Cleator *et al.*, 2007), ciclina E (Foulkes *et al.*, 2004; Cleator *et al.*, 2007), receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Livasy *et al.*, 2006; Cleator *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2004), vimentina (Livasy *et al.*, 2006; Cleator *et al.*, 2007), P-caderina (Rakha *et al.*, 2007) e mutações de BRCA1 (Sörlie *et al.*, 2003; Haffty *et al.*, 2006).

Os tumores basaloides recebem esta denominação por expressarem genes típicos das células epiteliais basais, como as citoqueratinas 5, 6 ou 17. Tais tumores são altamente proliferativos e frequentemente com mutação no gene TP53. São associados à mutação do gene BRCA1, pois a maioria dos portadores desta mutação desenvolvem tumores mamários basal-símile (Sörlie *et al.*, 2003).

O subtipo basaloide é melhor identificado por perfis de expressão de microarranjo de DNA, mas este método não está prontamente disponível na prática clínica (Reis-Filho, Tutt, 2008). Desta forma, os perfis imunoistoquímicos foram propostos como substitutos para caracterizar o subtipo basal like. O perfil que sugere sobreposição completa com os CMTN é definido por negatividade aos receptores hormonais e ao HER2, CK5/6 positividade e/ou positividade do EGFR (Nielsen *et al.*, 2004).

Por outro lado, estudos que usam análise de microarranjos indicam que 15 a 54% dos cânceres de mama basaloide expressam, pelo menos, 1 marcador não CMTN (Sotiriou C *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Calza *et al.*, 2006). Além disso, os CMTN incluem o subtipo normal-like, que não expressa marcadores de fenótipo basal (CK5/6 e EGFR) (Sörlie *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004).

O subtipo basal-símile identificado por expressão gênica, frequentemente, é triplo negativo, mas não sempre.

No estudo METABRIC, dos 252 tumores TN, 86,1% eram basaloide, 7,1% HER-2 enriquecido, 4,8% normal-like e 2,0% luminal A, demonstrando a heterogeneidade dos CMTN em relação aos subtipos do PAM50. Outros pesquisadores descrevem de 72 a 79% de tumores triplo negativos basal-like (Prat *et al.*, 2011).

Por outro lado, tumores basal-símile por expressão gênica (n: 321) são, frequentemente, triplo negativos (67,6%), entretanto 15,3% são ER+/HER-2 -, 11,8% são ER-/HER-2+ e 2,5% são ER+/HER-2+. Essa inconsistência entre os subtipos por expressão gênica e os marcadores padrões motivam diversos estudos a refinar a classificação imunoistoquímica utilizando marcadores adicionais. A expressão de citoqueratina 5/6 ou do EGFR, por exemplo, mostrou ser capaz de identificar os tumores classificados como basal like pela expressão gênica (Nielsen *et al.*, 2004; Carey *et al.*, 2006; Blows *et al.*, 2010; Broeks *et al.*, 2011).

Aproximadamente 90% dos CMTNs quando classificados morfolologicamente, são carcinomas ductais (Gluz *et al.*, 2009), com o restante podendo ser classificado como lobular invasivo, metaplásico,

medular, mioepitelial, apócrino, adenoide cístico, neuroendócrino e carcinoma secretório (Yamamoto, Iwase, 2010).

A ausência de fibrose central e a presença de infiltrado linfocitário moderado são considerados como fatores de risco independentes em pacientes com CMTN a fim de prever um intervalo longo de sobrevida livre de doença.

A presença de infiltrado linfocítico intenso está associada à alta expressão de genes regulados por interferon e genes de imunoglobulinas, e poderia levar a um intervalo livre de metástases mais longo, devido a uma melhor resposta imunológica (Kreike *et al.*, 2007).

No estudo METABRIC, as pacientes HER+/HER-2 enriquecido tiveram pior prognóstico (embora nenhuma tenha recebido terapia-alvo HER-2). Os tumores basal símile e os CMTN têm alta mortalidade nos primeiros anos após o diagnóstico e, depois, atingem um platô. Tal fato sugere que as pacientes que sobrevivem à fase inicial de alto risco têm maior probabilidade de cura. Por outro lado, na doença luminal, a mortalidade é constante ao longo do tempo (até 15 anos após o diagnóstico).

CMTN são tumores com fenótipo bastante agressivo e padrões de recidiva distintos (Anders, Carey, 2008). O tamanho dos tumores não se correlaciona com o *status* linfonodal, com a ocorrência de metástase a distância e com a sobrevida global das pacientes. CMTN tem alta taxa de recorrência local e uma taxa reduzida de invasão linfática (Billar *et al.*, 2010). Desta forma, o sistema de estadiamento de outros tumores mamários não se aplica aos tumores TN (Billar *et al.*, 2010) e não se correlaciona com a evolução da doença (Park *et al.*, 2011). O maior risco de recorrência é nos primeiros 3 a 5 anos após o tratamento inicial (Foulkes *et al.*, 2010). Após 5 anos, o risco de recorrência diminui comparando-se com os não triplo negativos. Após 10 anos, os CMTNs demonstram bom prognóstico, o risco de recidiva é significativamente menor comparado aos tumores RE positivos. (Foulkes *et al.*, 2010).

Os CMTN apresentam um curso clínico mais agressivo que os não triplo negativos. Em um estudo de base populacional do Registro de Câncer

da Califórnia, que incluiu 51.074 mulheres com câncer de mama primário (Bauer *et al.*, 2007), os CMTNs estiveram presentes em estádios mais avançados e estavam associados a um tempo reduzido de sobrevida em cinco anos, quando comparado com os fenótipos não triplo negativos (77 vs 93%). Avaliando-se o estágio no momento do diagnóstico, o CMTN mostrou associação consistente com pior sobrevida em comparação com os não triplo negativos (Bauer *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3 – Comparação da sobrevida global por estágio entre pacientes com CMTN e pacientes com outros subtipos (Bauer *et al.* Cancer. 2007; 109:1721–1728)

Em estudo com 1.134 pacientes com câncer de mama invasivo, o Odds ratio (OR) ajustado por idade para doença avançada ao diagnóstico era significativamente maior em pacientes com CMTN do que em pacientes Luminal A (OR 2.2;95%IC, 1.0-4.9) (Onitilo *et al.*, 2009).

A maioria dos CMTN tem alto grau histológico com frequência de Grau histológico 3 variando entre 66 a 91% entre as diversas coortes (Rakha *et al.*; Dent *et al.*; Tischkowitz *et al.*, 2007; Hugh *et al.*; Onitilo *et al.*, 2009).

Após a ocorrência de metástase, estes tumores apresentam taxa de sobrevida menor (Billar *et al.*, 2010). Embora os CMTNs metastáticos apresentem uma taxa de resposta à quimioterapia inicialmente alta,

comparada a outros subtipos, eles mostram uma menor taxa de sobrevida global após o tratamento. Talvez isto ocorra por uma instabilidade genômica inerente, que poderia facilitar uma resposta adaptativa mais rápida aos efeitos citotóxicos da quimioterapia (Peddi *et al.*, 2012).

O CMTN está associado a alto risco de recorrência a distância quando comparado a outros subtipos, cursando com rápida progressão entre a recorrência a distância e o óbito (Dent *et al.*, 2007; 2009). Ressalta-se, ainda, que as pacientes com CMTN têm menor probabilidade de apresentarem recorrência local antes de recorrência a distância do que as pacientes que apresentam outros subtipos (Dent *et al.*, 2007).

Pacientes com CMTN são quatro vezes mais propensas a apresentarem metástases viscerais nos primeiros 5 anos do diagnóstico quando comparadas a pacientes com outros subtipos (hazard ratio [HR], 4.0; 95% CI, 2.7–5.9; $P < 0.0001$) (Dent *et al.*, 2009).

As metástases cerebrais e pulmonares são mais frequentes nos casos triplo negativos do que nos não triplo negativos (30% *versus* 10% para as cerebrais; 40% *versus* 20% para as pulmonares). Em contrapartida, as metástases hepáticas e ósseas são menos frequentes nos triplo negativos (20% *versus* 30% para as hepáticas; 10% *versus* 40% para as ósseas) (Foulkes *et al.*, 2008).

As opções terapêuticas são limitadas para as pacientes com doença metastática, pois muitas receberam terapia adjuvante com antracíclicos, taxanos ou ciclofosfamida para tratamento do tumor primário.

A perda de atividade das vias BRCA-1, RB e TP53 é responsável pela alta instabilidade genômica observada nos tumores basal-símile (Perou, 2010).

A combinação entre aberrações no número de cópias e a expressão gênica foi utilizada em um estudo para classificação e categorização do câncer de mama que avaliou 2.000 casos com a principal descoberta de 10 grupos (Curtis C *et al.*, 2012). A maioria dos CMTNs foram classificados no grupo 10, que representou o subgrupo basal principal nesta nova classificação.

Aproximadamente, 25% dos CMTNs foram atribuídos ao grupo 4, que inclui tumores RE + e RE -. Este subgrupo tem boa evolução, uma baixa instabilidade genômica, receptor rearranjado de célula T e infiltração linfocítica extensa (Dawson *et al.*, 2013).

O fator de iniciação eucariótica 4E (eIF4E) é uma molécula que regula a translação de mRNA por meio da ligação com 59 regiões longas não traduzidas. Níveis elevados de 4E vão determinar hiperexpressão de ciclina D1, de fator de crescimento fibroblástico, de VEGF e de aumento de densidade microvascular. Uma elevação maior que 7 vezes de expressão do eIF4E é um preditor independente de recorrência nos cânceres estágio I e II, mesmo nos pacientes linfonodo negativo (Flowers, *et al.*, 2009).

A invasão capilar em CMTN é facilitada pela molécula CD 34, que está hiperexpressa em comparação aos não triplo negativos (Yaman *et al.*, 2012). Embora a densidade microvascular esteja aumentada na correlação com os tumores não triplo negativos, a densidade linfática não está (Mohammed *et al.*, 2011). As proteínas actina, 14-3-3, vimentina, proteína de choque térmico 70 (*Heat-Shock Protein*-HSP) e moesina estão hiper-reguladas nos tumores metastáticos, enquanto a HSP-90 e tubulina estão ausentes ou hiporreguladas (Sun *et al.*, 2008).

Por estimular a motilidade celular e aumentar a capacidade de invasão, a lactoferrina-endotelina-1 foi associada ao fenótipo invasor nos CMTN (Ha *et al.*, 2011).

A GLUT1 e a BCRP (*breast cancer resistance protein*) são marcadores expressos em células endoteliais que estão envolvidos na formação da barreira hematoencefálica. Estas proteínas mostraram uma correlação negativa no CMTN e positiva nos não triplo negativos (Yonemori *et al.*, 2010).

A hiper-regulação dos marcadores VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e interleucina 8(IL-8), a hiperexpressão do AEG-1(astrocyte elevated gene-1) (Li *et al.*, 2011), do D2-40 (Yaman *et al.*, 2012), STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), da proteína Mx1 de ligação ao GTP induzida por interferon, CD74 (Greenwood *et al.*, 2012) e

a negatividade do bcl-2 (Tawfik *et al.*, 2012) estão associados à positividade linfonodal nos CMTNs. A hiperexpressão de KI-67 também está associada à invasão linfonodal (Peng, 2012).

O GLI1 (*glioma associated oncogene homolog 1*) faz parte da família de genes Hedgehog, que está envolvida nas vias de transdução de sinal. Quando superexpresso, o GLI1 mostrou associação com alta taxa de metástases linfonodais. Sendo assim, é factível pensar que uma inibição dos genes Hedgehog poderia beneficiar o prognóstico dos CMTN (Tao *et al.*, 2011).

As pesquisas em andamento sobre os tumores triplo negativos da mama buscam a identificação de um marcador que possa ser utilizado como alvo para um tratamento de maior especificidade, como ocorre com os receptores hormonais e o HER-2. Os compostos de platina, os inibidores da PARP, os inibidores do receptor do fator de crescimento epidermal e os agentes angiogênicos têm sido objeto de estudo e análise nesta busca por terapias-alvo.

O câncer de mama triplo negativo faz com que seja necessária a descoberta de marcadores moleculares que possam servir de alvos terapêuticos ou, pelo menos, que sirvam como marcadores preditivos da resposta aos quimioterápicos para que possamos atingir uma melhora prognóstica significativa e, assim, beneficiar as pacientes diagnosticadas com este subtipo tumoral desafiador.

1.2 Definição de miRNA

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 por meio do pareamento de bases com o mRNA-alvo (RNA mensageiro), resultando na supressão da tradução ou na clivagem do mRNA (Khoshnaw *et al.*, 2009).

Eles 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, funcionam na regulação da expressão gênica. (Lynam-Lennon *et al.*, 2009). O mecanismo de ação das pequenas moléculas de RNA de interferência foi descrito por Andrew Fire and Craig Mello, que demonstraram a promoção da supressão da atividade gênica pelo RNA de dupla fita. As pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNAs) reconhecem e inibem os mRNA correspondentes, silenciando, assim, o gene apropriado (Fire *et al.*, 1998).

1.3 Formação do miRNA

A produção dos miRNAs maduros inicia-se no núcleo celular (figura 4). Nesta etapa, os miRNAs primários (pri-miRNAs), que possuem várias centenas até mil nucleotídeos de comprimento, são transcritos pela RNA polimerase II. Os pri-miRNAs são processados em RNAs precursores mais curtos (70-85 nucleotídeos), chamados pré-miRNAs. Esta fase é mediada pela DROSHA, uma enzima endonuclease RNase III, e pelo seu cofator DGCR8 (proteína do domínio de ligação de RNA dupla fita – dsRBD). (Khoshnaw *et al.*; Lynam-Lennon *et al.*, 2009)

Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma pela exportina 5 (um receptor de transporte nuclear) e pela proteína nuclear Ran-GTP. São, então, clivados pela Dicer, outra enzima RNase III, e pela TRBP (uma proteína dsRBD) produzindo uma cadeia dupla de, aproximadamente, 22 nucleotídeos (Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Lynam-Lennon *et al.*, 2009). Esta molécula de cadeia dupla contém o filamento de miRNA maduro e um fragmento denominado miRNA*, que é derivado do braço complementar oposto do pré-miRNA (Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

A molécula miRNA:miRNA* é incorporada a um grande complexo de proteínas efetoras chamado RISC (complexo de silenciamento induzido do RNA) (Lynam-Lennon *et al.*, 2009). O RISC ativa-se após a separação da molécula miRNA: miRNA*. O filamento miRNA* é degradado, enquanto a molécula de miRNA guia o RISC ao mRNA-alvo.

O filamento que contém a ligação de hidrogênio menos estável na sua extremidade 5 é o miRNA maduro e está integrado ao complexo de silenciamento induzido de RNA (RISC), enquanto o outro filamento é degradado (Khoshnaw *et al.*, 2009). Essa interação do miRNA/RISC e o seu mRNA-alvo é que resulta na regulação gênica (Gregory *et al.*, 2005; Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

Figura 4 - Processo de formação do miRNA maduro (Lynam-Lennon, 2009).

1.4 Funções do miRNA

Processos regulatórios importantes, como proliferação, diferenciação e apoptose celular são influenciados por miRNAs. Acredita-se que os microRNAs tenham a propriedade de impedir a divisão celular e conduzir a diferenciação terminal. O *downregulation* de alguns miRNAs poderia desempenhar um papel no desenvolvimento ou progressão do câncer (Khoshnaw *et al.*, 2009).

A função regulatória dos miRNAs envolve a participação de várias proteínas. Algumas dessas proteínas são componentes essenciais do RISC, que medeia o pareamento de bases entre miRNAs e mRNAs. A subunidade principal do RISC é a proteína Argonaute2 (Ago2), que é uma endonuclease catalítica do RISC humano (Peters *et al.*, 2007; Khoshnaw *et al.*, 2009).

1.4.1 miRNAs na regulação dos genes-alvo

Diversos mecanismos regulatórios vêm sendo descritos para explicar a maneira pela qual os miRNAs controlam a tradução dos mRNAs e regulam sua concentração:

- O RISC pode combinar-se com o 3'-UTR do mRNA. Para isto, é necessária apenas uma complementaridade imperfeita para produzir a repressão translacional (Wightman *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1999; Ambros *et al.*, 2000; Pillai *et al.*, 2005; Esquela-Kerscher *et al.*, 2006);
- O RISC pode também ligar-se ao sítio aberto de leitura do mRNA-alvo, o que requer a complementaridade perfeita ou quase perfeita, resultando na clivagem e degradação do mRNA-alvo por meio da ação da endonuclease AGO2 (Llave *et al.*, 2002; Palatnik *et al.*; Tang *et al.*, 2003; Yekta *et al.*, 2004);
- os miRNAs podem inibir o início da tradução por meio da ligação das proteínas AGO à extremidade m7G do mRNA, prevenindo,

assim, de que se liguem ao fator de iniciação da tradução eIF4E (Kiriakidou *et al.*, 2007).

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 5). 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, Zamore, 2002).

Caso a complementaridade seja insuficiente, que é, geralmente, o caso em mamíferos, a regulação é alcançada pela repressão da tradução. Entretanto, o mecanismo exato ainda não está estabelecido. 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 ao nível da 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 estudos 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 degradação de mRNAs, também desempenham um papel na regulação do miRNA. Os miRNAs são responsáveis por guiar os mRNAs e as proteínas associadas do RISC para estas estruturas de armazenamento, um processo que tem sido demonstrado como sendo uma consequência mais do que a causa da repressão translacional causada pelo miRNA. Assim, os P-bodies atuam como unidades de armazenamento para mRNAs reprimidos, protegendo os mRNAs reprimidos do maquinário de translação (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. 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 5 - Regulação gênica pelo miRNA (Lynam-Lennon, 2009).

1.5 Perfil de miRNAs no câncer

A relação entre miRNAs e câncer foi evidenciada por Calin *et al.* (2002), que descreveram dois genes de miRNA, miR-16 e miR-15, que estão localizados em uma região do cromossomo 13 que está deletada em mais de 65% de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC). A ligação com o câncer foi reforçada com a descoberta de que o posicionamento genômico do miRNA parece ser não aleatório, que um número significativo de genes de miRNA estão localizados em locais frágeis (regiões instáveis que têm sido associadas com a promoção da instabilidade do DNA em células cancerosas) (Calin *et al.*, 2004)

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 *downregulation* de miR-10b, miR-125b e

miR-145, e *upregulation* 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 estágio 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 na 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.* (2007) analisaram 93 tumores da mama humanos e obtiveram dados que permitiram a classificação do tecido tumoral em subtipos (luminal A, Luminal B, basal-like e HER2) com base na expressão diversa de miRNA. Estes dados corroboraram as descobertas anteriores de Mattie *et al.* (2006), que relataram uma correlação entre a desregulação de miRNA e tumores ER+ e ER- em biópsias de câncer de mama. 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 um possível papel para os miRNAs no diagnóstico de cânceres e subtipos de câncer.

Um possível papel para os miRNAs em metástase de câncer de mama também foi demonstrado. Seis miRNAs apresentaram-se downregulados em células metastáticas do câncer da mama. *Upregulation* 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).

Um dos miRNAs oncogênicos mais bem caracterizados é o miR 21, que foi encontrado hiperexpresso em todos os tipos de câncer até agora analisados (Volinia *et al.*, 2010).

O conceito de miRNAs como uma força oncogênica motriz foi demonstrada, por exemplo, ao verificar-se que a sobre-expressão de miR

155, por si só, é suficiente para causar a leucemia linfoblástica ou linfoma de alto grau em camundongos transgênicos (Costinean *et al.*, 2006).

Estudos funcionais em modelos animais demonstraram que o miR 9, miR 10b, miR 103, miR 107, miR 373 e miR 520c são condutores ou promotores de metástases, enquanto que o miR 31, miR 34a, miR 126, miR-200, miR 206 e miR 335 suprimem metástases por meio de diversos mecanismos (Pencheva, Tavazoie, 2013).

O miR 126 mostrou-se capaz de afetar a propriedade que células de câncer de mama têm em recrutar células endoteliais no microambiente do tumor para dentro do nicho metastático, inibindo, assim, a colonização metastática (Png *et al.*, 2012).

Um estudo recente mostrou que o miR 22 aumenta a população de células estaminais mamárias e promove metástase de câncer da mama em camundongos transgênicos, induzindo o silenciamento do miR 200, que tem uma função antimetastática, por meio de ação direta da metilcitosina dioxigenase (da família da TET-Ten Eleven Translocation), uma enzima que é responsável pela desmetilação do promotor do miR 200 (Song *et al.*, 2013).

Quando o miR 221 é sobre-expresso em câncer hepático, ele exerce uma função oncogênica por meio de regulação negativa da expressão do supressor tumoral homólogo da tensina e fosfatase (PTEN) (Pineau *et al.*, 2010), porém, na leucemia eritroblástica, atua como um supressor de tumor, reduzindo a expressão do oncogene KIT (Felli *et al.*, 2005).

Um paradigma que surgiu é a existência de circuitos de retroalimentação do fator de transcrição do miRNA compostos por vários miRNAs e genes codificadores de proteínas, que podem estar envolvidos na patogênese do câncer. Um exemplo é o circuito de miRNA-TP53 na CLL que é composto de cinco miRNAs (miR-15a miR 16-1, miR 34a, miR 34b e miR 34c) e quatro genes de codificação, incluindo o fator de transcrição do gene TP53, a proteína ZAP70 associada ao ζ 70 kDa e os oncogenes antiapoptóticos BCL2 e MCL1. Os níveis de expressão dos genes membros

deste circuito demonstraram ser preditores da sobrevida de pacientes com leucemia linfocítica crônica (Fabbri *et al.*, 2011).

É possível, portanto, a existência de uma assinatura de miRNA específica para o câncer da mama, que 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 ErbB2 e receptores hormonais do tumor, portanto, a classificação do subtipo pelo perfil miRNA pode ser importante na determinação do tratamento mais eficaz.

1.6 miRNAs como oncogenes e supressores tumorais

A depender se os miRNAs têm como alvo genes supressores de tumor ou oncogenes, eles podem atuar como supressores tumorais ou oncogenes. A hiperexpressão de miRNAs oncogênicos, por amplificação do *locus* de codificação do miRNA, pode suprimir o gene supressor tumoral alvo, enquanto a hipoexpressão do miRNA supressor tumoral, por deleção ou metilação do *locus* do miRNA, pode resultar em *upregulation* do oncogene-alvo (Khoshnaw *et al.*, 2009).

Entretanto, 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. O indício de participação no processo tumorigênico, seja de forma oncogênica seja supressora, é reforçado quando coexistem, pelo menos, quatro evidências: (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 (Kent *et al.*, 2006).

Os miRNAs oncogênicos (p. ex.: miR-21 e miR-155) estão hiperexpressos em tecido tumoral (Iorio *et al.*, 2005; 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); 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).

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 que os regulados positivamente foram classificados como oncogenes (Kent *et al.*, 2006; Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

1.7 miRNAs e apoptose

A apoptose é um processo irreversível, essencial para o desenvolvimento normal e homeostase, que regula, de uma 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.

1.7.1 miRNAs e as vias de apoptose

O miR-15 e o miR-16 foram identificados como reguladores do fator antiapoptótico Bcl-2. O Bcl-2 pertence à família Bcl-2 de proteínas apoptóticas, que contêm os membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos, os quais atuam como reguladores cruciais da via intrínseca da apoptose (Cory e Adams *et al.*, 2002). Diversos estímulos intracelulares desencadeiam a via intrínseca da apoptose: os danos no DNA, as drogas citotóxicas, a privação de fator de crescimento e o estresse oxidativo (Degterev *et al.*, 2003).

No câncer de mama, no linfoma de Hodgkin e no linfoma de células B, a translocação cromossomal de Bcl-2 é uma alteração genética frequente. Por outro lado, em muitos casos (95% dos casos de leucemia linfocítica crônica-CLL), esta alteração genética não ocorre e o mecanismo de *upregulation* permanece desconhecido (Cimmuno *et al.*, 2005).

Vários programas de previsão de alvo identificaram o miR-15 e o miR-16 como reguladores putativos de Bcl-2 com base na complementaridade na 3'-UTR, indicando, ainda, que Bcl-2 é, de fato, um alvo. O fato de o miR-15 e o miR-16 serem potenciais reguladores de Bcl-2 poderia explicar o mecanismo de superexpressão de Bcl-2 observada em vários cânceres humanos. O fato de a regulação da expressão de Bcl-2, por miR-15 e miR-16, induzir a apoptose, *in vitro*, indica que a desregulação destes miRNAs é um evento de suma importância na evasão de apoptose e que pode estimular a tumorigênese (Krek *et al.*, 2005).

Os níveis endógenos de miR-15 e miR-16 correlacionam-se inversamente com os níveis da proteína Bcl-2. A subexpressão de miR-15 e miR-16 associada com super-expressão de Bcl-2 foi descrita em células de leucemia, enquanto o contrário ocorreu em células linfoides normais (CD5+). Uma redução nos níveis de Bcl-2 foi observada após a transfecção de aglomerado de miR-15-16 para o MEG-01, uma linhagem de células com elevados níveis de Bcl-2 que não expressam os genes miR-15 ou miR-16. Entretanto, os níveis de mRNA de Bcl-2 mostraram-se estáveis, indicando que a regulação ocorreu ao nível da tradução, afastando, assim, a

translocação cromossômica como o mecanismo de desregulação (Tsujimoto *et al.*, 1985).

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.* (Garofalo, 2008) identificaram o miR-221 e o miR-222 como reguladores de sensibilidade a TRAIL em NSCLC (*non small cell lung cancer*). As linhagens celulares resistentes (Calu-1) e sensíveis (H460) a TRAIL foram identificadas e as diferenças na sensibilidade a TRAIL não estavam relacionados com diferenças nos níveis de receptores endógenos, pois os níveis de receptores foram semelhantes em ambas as linhagens celulares. Nas células resistentes a TRAIL, a análise indicou expressão diferencial de sete miRNAs em comparação com as sensíveis. A sobre-expressão 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 da caspase-3 e caspase-8. Por outro lado, a inibição destes miRNAs em células resistentes resultou em um fenótipo sensível a TRAIL, o que indica um papel na determinação da sensibilidade celular a TRAIL. 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 downregulados nas células que apresentam resistência a 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 estes genes são alvos. O silenciamento de p27^{KIP1} aumenta a resistência celular a TRAIL, implicando um papel para esta proteína na manutenção da sensibilidade a TRAIL.

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

Ovcharenko *et al.* (2007) demonstraram uma ligação entre miRNAs e a regulação da apoptose induzida por TRAIL. Eles verificaram que 34 de 187 miRNAs sintéticos transfectados resultaram em um fenótipo diferenciado da caspase-3 em células MDA-MB-453 de câncer da mama. Segundo os autores, vários desses miRNAs participariam na regulação direta da via da TRAIL. O miR-182 e o miR-96 estariam envolvidos na regulação da FADD e caspase-3, enquanto o miR-145 e miR-216 foram identificados como reguladores putativos de DR4 e DR5. Eles também demonstraram que a sobre-expressão destes miRNAs resultou na redução da atividade de caspase-3 *in vitro*, sugerindo que os genes-alvo preditos são corretos. Estes achados indicam, por meio da regulação de várias proteínas envolvidas nesta via, que vários miRNAs estão envolvidos na modulação da sensibilidade da TRAIL.

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

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

1.7.2.1 PDCD4

A PDCD4 (*Programmed Cell Death 4*) é uma proteína supressora tumoral que, durante a apoptose, apresenta-se super-expressa. O miR-21 tem função reguladora sobre o PDCD4 (Lankat-Buttgereit, Goke, 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 a

sua subexpressão correlacionou-se com um prognóstico pobre de sobrevida nos cânceres de pulmão e colorretal. Asangani *et al.* (2008) demonstraram a regulação do miR-21 no carcinoma 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.

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 da mama.

1.7.2.2 TPM1

A tropomiosina 1 (TPM1) é um supressor tumoral que foi identificado 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 J *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.

1.7.2.3 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). Meng

et al. (2007) demonstraram que o miR-21 está upregulado em tumores de HCC e em linhagens celulares. 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 causa apenas mudanças sutis na expressão da PTEN (Frankel *et al.*, 2008), sugerindo que as metas funcionais 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.

1.7.2.4 Tp53

O miR-34 é um importante componente da via supressora de tumor p53 (Bommer *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007b; He *et al.*, 2007a). A p53 mantém a homeostase dos tecidos ao promover a parada do ciclo celular e apoptose em resposta a sinais de estresse, muitos dos quais estão associados com o desenvolvimento e 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).

1.7.2.5 HMGA2

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

HMGA2 está, frequentemente, sujeito 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 ocorrer 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 um 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 um 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 6). 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 nos traz informações para que entendamos melhor os mecanismos de resistência à terapia e podem ser potenciais alvos de intervenção (Lynam-Lennon *et al.*, 2009).

Figura 6 - Modelo dos mecanismos moleculares dos miRNAs envolvidos na patogênese do câncer. Eles 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).

1.7.2.6 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 *status* 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).

A sobre-expressão de miR-21, um miRNA oncogênico, está associada ao aumento do potencial invasivo e da ocorrência de metástases (Zhu *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2008). O miR-21 funciona, em parte, suprimindo o gene supressor de tumor tropomiosina 1 (TPM1) (Zhu *et al.*, 2007) e, em parte,

por meio de supressão da Morte Celular Programada 4 (PDCD4) e MASPIN, que estão relacionadas à invasão tumoral e metástase. (Zhu *et al.*, 2008)

Nassirpour *et al.* demonstraram que a supressão do miR-221 inibe a migração e invasão em células de câncer de mama triplo negativo por alteração da expressão de E-caderina, e concluíram que o miR-221 funciona como um oncogene e é essencial na regulação da gênese tumoral no câncer de mama triplo negativo tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Nassirpour *et al.*, 2013).

O miR-17-5p funciona como supressor tumoral putativo, que está expresso em baixas concentrações no câncer de mama e mostrou-se capaz de suprimir a proteína AIB1 (amplificada no câncer de mama 1) (Hossain A *et al.*, 2006). O gene AIB1 atua como um oncogene e está amplificado no câncer de ovário, mama e pâncreas (Anzick *et al.*, 1997; Ghadimi *et al.*, 1999).

O miR-206 está mais fortemente expresso em tumores mamários com receptor estrogênico negativo que em tumores receptor estrogênico positivo (Iorio *et al.*, 2005).

Tavazoie *et al.* (2008) descreveram que o miR-335 foi um dos genes mais reprimidos em células metastáticas de mama. Eles demonstraram que a restauração da função do miR-335 por meio de transdução retroviral suprime o potencial de metástase das células LM2 (células MDA-MB-231 derivadas de câncer de mama humano, que são altamente metastáticas para o pulmão).

Zhang *et al.* (2008) demonstraram que o miR-126 inibe a progressão do ciclo celular de G1/G0 à fase S. Eles também mostraram que o miR-126 alveja o IRS-1 (receptor de insulina de substrato-1) ao nível da tradução. O miR-126 está downregulado em células de câncer de mama.

Blenkiron *et al.* (2007) realizaram uma análise integrada de expressão de miRNA, expressão de mRNA e alterações genômicas em câncer de mama e descobriram que muitos miRNAs foram diferencialmente expressos entre os subtipos moleculares basal-like, luminal A, luminal B, HER2 + e tecido normal. Eles reconheceram 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, a modificações transcricional e pós-transcricional, e às alterações na expressão de enzimas envolvidas na biogênese do miRNA. Foi demonstrada uma associação significativa entre o perfil de expressão de miRNA e fatores clínicos, como *status* do receptor de estrogênio e grau tumoral.

Radojicic *et al.* (2011) analisaram a expressão de microRNAs em tumores de mama triplo negativos e observaram que o miR-21, o miR-210 e o miR-221 estavam significativamente sobre-expressos, enquanto o miR-10b, miR-145, miR-205 e miR-122a estavam significativamente subexpressos nestes tumores primários. A expressão do miR-222 e miR-296 não mostrou diferença significativa entre o tumor e o tecido normal. Houve tendência não significativa de alta expressão do miR-21, miR-210, miR-221 e miR-222 estar associada com piores sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Svoboda *et al.* (2012) demonstraram correlação negativa entre a expressão de miR34-b, e as sobrevidas livre de doença e global no câncer de mama triplo negativo.

1.8 miRNAs e a resposta à terapia oncológica medicamentosa

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 os miRNAs desempenhem papéis importantes na modulação da resistência e da sensibilidade para os tratamentos de câncer mais comuns (Cummings *et al.*, 2004).

A exposição de linhagens celulares de câncer de mama com resistência inata ou adquirida a drogas anti-HER-2 fez com que houvesse restauração da eficácia ao uso de lapatinibe, neratinibe e afatinibe. (Corcoran *et al.*, 2014).

Meng *et al.* (2006) demonstraram envolvimento de miRNAs na resistência ao agente quimioterapêutico gemcitabina em colangiocarcinoma. O miR-21 e o miR-200b, que estão sobre-expressos em colangiocarcinoma, atuam como moduladores da sensibilidade à gemcitabina em colangiócitos Mz-Cha-1, promovendo a inibição da sensibilização destas células à apoptose induzida por gemcitabina.

Curiosamente, o tratamento com gemcitabina induziu suprarregulação de ambos os miRNAs *in vivo*, sugerindo um papel funcional importante na promoção da sobrevivência e da resistência à citotoxicidade com gemcitabina.

O miR-15b e o miR-16 mostraram papel na modulação da sensibilidade de cinco em sete drogas anticâncer gástrico testadas (Xia *et al.*, 2008). O miR-15b e o miR-16 fazem parte de um painel de 10 miRNAs que são hipoexpressos em células multirresistentes (SGC7901/VCR) aos medicamentos anticâncer gástrico. A sobre-expressão de miR-15b e miR-16 confere um fenótipo de multissensibilidade a drogas, enquanto a sua inibição aumenta a resistência à vincristina, adriamicina, etoposida e cisplatina. A sobre-expressão de ambos os miRNAs também foi associada ao aumento da apoptose induzida pela vincristina em células de câncer gástrico. Existe uma forte evidência que aponta para um papel do miR-15 e miR-16 na regulação da expressão de Bcl-2.

Ye *et al.* demonstraram que a hiperexpressão do miR-375 restaurou a sensibilidade ao trastuzumab de células de câncer de mama HER-2 positivas (Ye *et al.*, 2014).

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, e validação de funções dos miRNAs.

1.8.1 Sobre as novas evidências de mecanismos de ação dos miRNAs

RNAs não codificantes (ncRNAs) compreendem várias classes de transcritos de RNA que não são transcritas em proteínas, mas que regulam a transcrição, a estabilidade ou a tradução de genes codificadores de proteínas no genoma de mamíferos. Dentre os mais estudados ncRNAs, estão os microRNAs.

Em linhas gerais, tem-se por entendimento que os miRNAs funcionam como reguladores negativos da expressão gênica. Entretanto, foram descritos novos e inesperados mecanismos de ação, a saber: há evidência de que os miRNAs também podem aumentar a tradução de um mRNA-alvo por meio do recrutamento de complexos de proteínas para os elementos AU-rich de um mRNA (Vasudevan *et al.*, 2007), ou eles podem, indiretamente, aumentar a produção de proteínas-alvo, desreprimindo a tradução de mRNA, por meio de interação com as proteínas que bloqueiam a tradução do gene-alvo (Eiring *et al.*, 2010).

Apesar destes fatos, ainda é necessário definir se essa ativação da tradução da proteína representa um fenômeno geral ou apenas uma exceção ao mecanismo de regulação tradicional do miRNA.

Há, também, evidências que indicam que os miRNAs podem causar síntese global de proteínas por meio de aumento da biogênese ribossomal (Orom *et al.*, 2008), ou trocar a regulação de repressão para ativação da tradução do gene-alvo, em condições de parada do ciclo celular (Vasudevan *et al.*, 2007).

Além de funcionar dentro das células, os miRNAs são abundantes na corrente sanguínea, e podem atuar em células vizinhas e em locais mais distantes no interior do corpo de uma forma semelhante a um hormônio, o que indica que eles podem mediar, tanto a curto e a longo alcance, a comunicação célula-célula (Mitchell *et al.*, 2008; Fabbri *et al.*, 2012).

miRNAs, em conjunto com as proteínas de ligação a RNA (por exemplo, a nucleofosmina 1 e a Argonaute 2), podem ser “embalados” e transportados extracelularmente por exossomas ou microvesículas (Bartel, 2009).

Da mesma forma, os miRNAs precursores, que estão dentro da célula doadora, podem ser exportados com estabilidade em conjunto com as proteínas de ligação ao RNA ou por ligação à lipoproteína de alta densidade (Vickers *et al.*, 2011).

A liberação passiva devido à lesão, inflamação crônica, apoptose ou necrose celular, ou a partir de células com meia-vida curta (como as plaquetas), é, provavelmente, uma outra forma de liberação.

MiRNAs circulantes, após entrarem na corrente sanguínea, são absorvidos pelas células receptoras via endocitose e, posteriormente, se ligam a proteínas intracelulares, tais como os receptores Toll-like (TLRs) (Fabbri *et al.*, 2012).

Supõe-se que os miRNAs se liguem a receptores de membrana específicos que estão presentes nas células receptoras, mas que ainda não foram identificados (Cortez *et al.*, 2011).

Cada passo do processo de geração e de mecanismo de ação do miRNA, tanto o intracelular quanto o endócrino, podem, potencialmente, ser alvos terapêuticos.

1.8.2 Sobre os miRNAs circulantes

Além da busca por um perfil de expressão molecular que melhor caracterize o subtipo triplo negativo, permitindo melhor entendimento prognóstico e possibilitando novas perspectivas terapêuticas, a pesquisa da expressão e função dos microRNAs pode ter outras aplicações, sobretudo no campo propedêutico.

O diagnóstico do câncer de mama baseia-se no exame histológico das biópsias teciduais, que são procedimentos invasivos.

Na tentativa de melhorar a eficácia diagnóstica dos casos de câncer de mama, tem-se buscado a identificação de um perfil de marcadores não invasivos que possam antecipar o diagnóstico e, assim, talvez, melhorar as taxas de mortalidade. Faz-se necessário estabelecer correlação fidedigna de

expressão entre microRNAs tumorais e os microRNAs circulantes, que estejam comumente desregulados, como etapa inicial desta busca.

miRNAs circulantes estão presentes em fluidos corporais isentos de células, tais como plasma, soro, urina, saliva, etc. (Madhavan *et al.*, 2013).

Acredita-se que miRNAs circulantes possam vir a distinguir entre amostras tumorais e controles não tumorais. Os estudos, geralmente, utilizam a análise dos miRNAs por RT-PCR. Entretanto, a comparação entre os diversos estudos não pode ser feita de uma maneira fidedigna, pois as pesquisas foram conduzidas sob condições experimentais diversas. Os microRNAs circulantes, por exemplo, podem ser extraídos do soro, do plasma, de células tumorais circulantes e do sangue total. Outro fator a ser levado em consideração na análise dos dados dos estudos é a possibilidade de os níveis de miRNAs retornarem aos níveis basais até em 02 semanas após a exérese do tumor (Roth C *et al.*, 2010).

Chan *et al.* analisaram tecido tumoral fresco, tecido normal adjacente e soro, extraído em pré-operatório, pareados de 32 pacientes com câncer de mama. As amostras tumorais tinham média de 70% de células tumorais. O critério para inclusão de tecido adjacente normal era a ausência de células tumorais e a presença de células epiteliais. Assim, após a confirmação histológica, 31 tumores e 23 tecidos normais foram utilizados para extração de miRNA e determinação de perfis por microarranjos. Trinta e duas amostras de soro pareadas de pacientes com câncer de mama e 22 amostras de controles saudáveis foram obtidas para determinação de perfis.

Curiosamente, havia apenas 7 miRNAs comuns que foram expressos significativamente em ambas as amostras de tumores de câncer de mama e de soros, e um miRNA que foi regulado negativamente em ambos os tipos de amostras.

Outros 13 miRNAs estavam desregulados em soros e em tumores, mas em direções opostas, ou seja exérese, hiper-regulado em um e hipo em outro. Assim, parece que os miRNAs circulantes não são altamente semelhantes aos das células de câncer da mama, tal fato sugere que alguns miRNAs são liberados seletivamente na circulação (Chan *et al.*, 2013).

Zhao *et al.* demonstraram que a concentração sérica de miR-10b encontra-se significativamente aumentada em pacientes com metástases ósseas, com uma área sob a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para presença de metástase óssea de 0.769, com 64,8% de sensibilidade e 69,5% de especificidade (Zhao *et al.*, 2012).

Si *et al.* demonstraram que níveis séricos reduzidos do miR-92a e níveis aumentados de miR-21 estavam associados ao tamanho tumoral e linfonodos positivos (Si *et al.*, 2013).

O miR-125b mostrou alto nível de expressão em pacientes não responsivos à quimioterapia (n=26, 46%; p=0.008). Além disso, os casos com alta expressão do miR-125b circulante apresentaram alta proliferação celular e baixa apoptose nos espécimes cirúrgicos correspondentes obtidos após a neoadjuvância (Wang *et al.*, 2012).

Sun *et al.* demonstraram que o miR-155 sérico apresentava índices significativamente aumentados nas pacientes com câncer de mama (n=103) quando comparadas com o grupo-controle saudável (n=55) (p< 0.001) com um *fold change* de 2.94. No mesmo estudo, o soro de um subgrupo de pacientes foi extraído após o tratamento clínico (cirurgia e 4 ciclos de quimioterapia) para avaliar os efeitos na concentração de níveis séricos de miRNAs.

Foi encontrada uma diminuição do nível sérico miR-155, enquanto que as concentrações de antígeno carboidrato 15-3 (CA15-3), antígeno carcinoembrionário (CEA) e antígeno específico de polipeptídeo tecidual (TPS) não mostraram esta tendência. Estes resultados mostraram que 79% dos pacientes com resposta terapêutica ou doença estável mostravam redução dos níveis séricos de mir-155, que poderia funcionar como um indicador de resposta terapêutica (Sun *et al.*, 2012).

No estudo de Li *et al.*, o miR-181a sérico mostrou-se mais sensível (55,28%) no diagnóstico do câncer de mama inicial (carcinoma ductal *in situ* e TNM I e II) do que os marcadores CA 15-3 e CEA (8,13 e 7,32%, respectivamente) (Guo, Zhang QY, 2012).

Os níveis séricos de miR-182 estavam significativamente aumentados nos casos de câncer de mama em comparação com os controles saudáveis ($p < 0,01$), estando também aumentado nos tecidos tumorais na comparação com os tecidos paratumorais. Os níveis séricos do miR-182 estão aumentados em tumores com receptores de estrogênio e de progesterona negativos em relação aos com receptores hormonais positivos (Wang *et al.*, 2013).

Recentemente, a análise dos miRNAs circulantes, que também são expressos aberrantemente no tecido mamário ou com papel funcional na tumorigênese, fez com que o miR-21 e miR-92a (Si *et al.*, 2013), o miR-10b, miR-125b, miR-155, miR-191, o miR-382 (Mar-Aguilar *et al.*, 2013) e miR-30a (Zeng *et al.*, 2013) fossem acrescentados à lista de miRNAs para a detecção precoce do câncer de mama primário (Madhavan *et al.*, 2013).

1.8.3 Sobre a extração de miRNAs de tecidos parafinados

O material arquivado mais comumente disponível para utilização na detecção retrospectiva de biomarcadores moleculares é o tecido FFPE. A fixação em formalina é um método normatizado que permite a preservação de proteínas celulares, fácil armazenamento a longo prazo e conservação da arquitetura do tecido em condições histológicas ótimas. Infelizmente, a reticulação (*cross linking*) de RNA com proteínas, a degradação enzimática, bem como a degradação química que ocorre durante o processo de fixação reduzem o rendimento, a qualidade e a integridade do RNA (Lewis *et al.*, 2001).

A taxa de modificação de RNA em tecido fixado é alta, mostrando adutos (ligações covalentes) em todas as bases de ácidos nucleicos. A formação de derivados metilol, bases de Schiff e derivados estáveis de metileno afeta negativamente o desempenho das amostras de RNA em aplicações *downstream* (a jusante) (Masuda *et al.*, 1999).

Já foi demonstrado que amostras de RNA derivadas de tecidos FFPE podem servir como templates eficazes para qRT-PCR (Klopfleisch *et al.*, 2011).

No entanto, apesar dos protocolos otimizados de extração de RNA, os valores absolutos de mRNA Cq eram, aproximadamente, cinco ciclos mais elevados em tecidos FFPE em comparação com tecidos frescos combinados, o que indica que apenas 3% da população de mRNA, a partir de tecidos FFPE, é acessível para a síntese de cDNA e subsequente análise de qRT-PCR (Godfrey *et al.*, 2000).

Apesar do mRNA não ser estável em tecido FFPE, os perfis de expressão de miRNA se correlacionam bem entre amostras frescas de tecido e o FFPE (Li *et al.*; Xi *et al.*, 2007; Doleshal *et al.*; Szafranska *et al.*, 2008; Glud *et al.*; Liu *et al.*, 2009).

A expressão dos miRNAs é preservada após a fixação de rotina em formalina (até 5 dias) e armazenamento a longo prazo (10 anos) (Xi *et al.*, 2007).

Os microRNAs são menos propensos à degradação e modificação devido a seu pequeno tamanho e estreita associação com grandes agregados proteicos (Liu *et al.*, 2009).

Além disso, os diferentes tipos de miRNA são similares e proporcionalmente degradados devido à uniformidade estrutural desses (Klopfleisch *et al.*, 2011).

No entanto, a detecção de miRNAs que apresentam baixa expressão (não especificada) pode sofrer perda gradual em blocos de tecido FFPE que estão armazenados por 7 anos ou mais, podendo chegar a uma redução de 22% na taxa de detecção quando os blocos estão armazenados por 11 anos (Szafranska *et al.*, 2008).

No entanto, o maior grau de degradação do RNA nos blocos de tecidos mais velhos, provavelmente, reduz a eficiência de qRT-PCR na análise de miRNA, resultando em uma maior variabilidade técnica (Dijkstra *et al.*, 2012).

1.8.4 Fundamentos para a terapêutica com miRNAs

A complexa interação de miRNAs e genes codificadores de proteínas no câncer indica que os tratamentos que visam apenas a genes codificadores de proteínas podem não ser suficientes para controlar a progressão do câncer.

Como o câncer é uma doença multigênica, a principal vantagem da terapêutica miRNA (que é definida como estratégias para restaurar ou inibir a função miRNA) é que miRNAs alvejam vários genes codificadores ou genes não codificantes que podem estar envolvidos em caminhos específicos ou redundantes no processo de desenvolvimento do câncer. Em outras palavras, a capacidade de miRNAs para alvejar genes que estão implicados na mesma via e/ou em vias que interagem fornece o fundamento para a utilização de um pequeno número de miRNAs para atingir um amplo silenciamento de vias pró-tumorais

Foi demonstrado que o miR 124 tem por alvo diversos genes codificadores, tais como o p38 MAPK, o STAT3 e o AKT2 na via de sinalização EGFR Uhlmann, S. *et al.* Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol. Syst. Biol.* 8, 570 (2012). Pelo fato de a ativação constitutiva da via de sinalização de EGFR ter sido associada a vários tipos de câncer, incluindo do pulmão, do cólon e da mama (Wheeler *et al.*, 2010), pode-se supor que a reposição do miR 124 por um similar ou um vetor codificado pode regular negativamente a expressão simultânea destes três genes e, assim, reverter a progressão do câncer pela inativação da via de sinalização do EGFR.

O grupo miR-15a/miR-16-1, que tem como alvo as proteínas antiapoptóticas MCL1 e BCL 2, está suprimido na CLL (leucemia linfocítica crônica) (Calin *et al.*, 2008). Portanto, uma terapia de miRNA personalizada com agentes que imitem ou aumentem a expressão de miR 15a e miR 16 1, ou uma terapia com vetor codificado miR 15a e miR 16 1, poderia vir a ser útil para doentes com CLL, que apresentam expressão reduzida do grupo miR-15a miR 16 1, e superexpressão de BCL 2 e MCL1 em suas células malignas.

Mutações em miRNAs, embora relatadas (Calin *et al.*, 2005), são raras devido ao pequeno tamanho desses. O desenvolvimento de resistência aos agentes terapêuticos de miRNA, provavelmente, exigiriam múltiplas mutações em vários genes. MiRNAs circulantes poderiam ser usados como biomarcadores para identificar os pacientes para os quais essa abordagem antimiRNA seria adequada.

Deve-se ter em mente, ao buscarmos terapias baseadas no conceito funcional do miRNA, que a atividade do miRNA pode depender do ambiente celular e o mesmo miRNA pode ter diferentes alvos no mesmo organismo (mas em diferentes tipos de células), e, conseqüentemente, efeitos opostos. Assim, a modulação de um miRNA específico com terapêutica miRNA pode ter efeitos benéficos em um tipo de célula, mas efeitos nocivos em outro.

As principais causas da redução da expressão de miRNAs supressores em cânceres humanos são a deleção genética dos locos de miRNA ou o silenciamento epigenético via hipermetilação da ilha de CpG no promotor dos genes de miRNA (Croce, 2009). Abordagens moleculares para reverter o silenciamento epigenético ou melhorar a biogênese de miRNAs vêm sendo estudadas e os níveis de miRNAs silenciados ou excluídos podem ser restaurados pela administração direta de formulações de miRNA puro, acoplado a um transportador ou disponibilizado por meio de um vetor viral.

Os miRNAs podem ser alvos terapêuticos ainda nas células que os produzem ou podem ter a sua função endócrina modulada.

1.9 Sobre a terapia utilizando miRNAs

1.9.1 Restaurar os níveis de miRNA com pequenas moléculas

O silenciamento epigenético de miRNAs pode ser revertido por agentes de hipometilação, como decitabine ou 5-azacitidina. Ambos os agentes foram aprovados para o tratamento de síndromes mielodisplásicas (Galm *et al.*, 2006) e mostraram-se capazes de reinduzir a expressão de diversos mRNA, bem como ncRNAs, incluindo miRNAs (Lujambio *et al.*, 2007).

Outro exemplo é a enoxacina, uma fluoroquinolona que é utilizada como antibacteriano e que aumentou a produção de um subconjunto de miRNAs por ligação à proteína TARBP2 (Melo *et al.*, 2011). O tratamento de células RKO e HCT116 (de câncer de cólon) com enoxacina causou uma regulação positiva global da expressão de miRNA *in vitro*. O tratamento com enoxacina aumentou a expressão de 24 miRNAs maduros em camundongos e reduziu o crescimento do tumor em modelos de camundongos (Melo *et al.*, 2011).

Estes exemplos destacam o papel fundamental dos padrões de expressão alterados de miRNAs no câncer e demonstram a eficácia de restaurar o espectro distorcido dos que estão reprimidos em células malignas.

1.9.2 Restaurar os níveis de miRNA com abordagens baseadas em oligonucleotídeos

Uma abordagem mais orientada para aumentar os níveis de determinados miRNAs é a restauração da expressão e função de um ou de um número limitado de miRNAs, geralmente localizados em um aglomerado, tais como o miR 15a e miR 16-1 em 13q14.3, com miRNA mimetizado ou com miRNAs codificados em vetores de expressão.

Moléculas mimetizadas de miRNA são oligonucleotídeos sintéticos de miRNA com fita dupla que, quando transfectados em células, são processados em uma forma com fita única e regulam genes codificadores de proteínas de forma miRNA-like. No entanto, um sistema de entrega eficaz é necessário para melhorar a estabilidade e a absorção – e, assim, a eficácia do miRNA mimetizado (Bader *et al.*, 2011). Uma estratégia, visando a melhorar a eficácia deste sistema de entrega, seria acoplar o miRNA a nanopartículas revestidas com anticorpos específicos do tumor (Tivnan *et al.*, 2012).

Os vetores de expressão miRNA são desenvolvidos com promotores que permitem a expressão do miRNA em forma de tecido ou tumor específicos.

A expressão de miR-26a, por exemplo, está reduzida no HCC primário humano e sua reexpressão em células malignas hepáticas leva à atividade antitumoral (Ji *et al.*, 2009). A administração sistêmica de miR 26a em um modelo de camundongo, com HCC, utilizando um adenovírus associado (AAV) mostrou-se capaz de inibir a proliferação de células cancerosas, induzir a apoptose específica do tumor e frear a progressão da doença com toxicidade mínima (Kota *et al.*, 2009).

1.9.3 Bloquear a função do miRNA com abordagens baseadas em oligonucleotídeos

As estratégias atuais para inibição de miRNAs são baseadas, principalmente, em oligonucleotídeos antisense e miRNA sponges.

Os oligonucleotídeos antisense (ASOs), também conhecidos como antiMIR, incluem ácidos nucleicos bloqueados (LNA antiMIR), minúsculos LNA antiMir (tiny) e os antagomirs. Oligonucleotídeos antisense trabalham como inibidores competitivos de microRNAs, presumivelmente por emparelhar-se ao filamento guia de microRNA maduro após o complexo de silenciamento induzido de RNA (RISC) remover o filamento miRNA* que é degradado (Davis *et al.*, 2006).

Os LNA antimiRs são ASOs nos quais vários nucleotídeos são substituídos por análogos bicíclicos de RNA dispostos em uma conformação “locked” (moléculas LNA). Estas moléculas possuem a mais alta afinidade ao miRNA-alvo, uma vez que a modificação “locked” do anel de ribose cria uma conformação ideal para a ligação Watson-Crick ao miRNA-alvo (Lennox, Behlke, 2011).

A alta expressão do miR-380-5p foi associada a mau prognóstico no neuroblastoma com amplificação MYCN. A entrega *in vivo* de LNA-antimiR-380-5p reduziu com eficiência o tamanho tumoral em camundongos com

neuroblastoma, provavelmente revertendo a supressão de p53 pelo miR-380-5p. (Swarbrick *et al.*, 2010).

O agente cujo desenvolvimento está mais avançado é um antiviral, Miravirsen (Santaris Pharma), que é um LNA antimiR contra o miR-122. Essa medicação foi, recentemente, avaliada em estudo fase I e fase IIa para o tratamento do vírus da hepatite C (HCV) (Janssen *et al.*; Lieberman, Sarnow, 2013). O miR-122 se liga a dois sítios-alvo na região 5' não codificante do genoma do HCV, levando a uma *upregulation* dos níveis de RNA viral (Jopling *et al.*, 2005).

Em outro estudo, um *tiny* LNA antimiR contra o miR-155 inibiu a macroglobulinemia de Waldenström e a proliferação celular *in vitro* da CLL. Houve, também, redução significativa do número de células leucêmicas em camundongos (Zhang *et al.*, 2012).

A alta eficácia dos LNA antimiRs, a resistência deles à degradação e a boa absorção em muitos tecidos eliminam a necessidade de formulações sofisticadas, que são necessárias para a maioria de tratamentos com oligonucleotídeos. Além disso, toxicidades agudas ou subcrônicas não foram observadas, e os níveis plasmáticos de transaminases e bilirrubinas não mostraram alterações em primatas tratados com LNA antimiRs (Elmen *et al.*, 2008).

Antagomirs são RNAs sintéticos conjugados ao colesterol com uma ligação 2'-O-metil e modificação fosforotioato. Eles funcionam como antimiRs sendo complementares à sequência completa do miRNA-alvo e, assim, bloqueiam a função do miRNA (Krutzfeldt *et al.*, 2005). A modificação com o colesterol é introduzida para aumentar a captação celular do composto, enquanto as modificações 2'-O-metil e a fosforotioato servem, respectivamente, para melhorar a afinidade de ligação e prevenir a degradação por nucleases. Em estudo que investigou a função do miR-10b em metástases, utilizando camundongos, o silenciamento do miR-10b, usando antagomiR, não reduziu o crescimento do tumor primário, mas houve grande redução na formação de metástases pulmonares (Ma *et al.*, 2010).

A toxicidade do antagomir limitou-se à discreta redução na contagem de leucócitos, um aumento entre 8-9% no tamanho do fígado e baço, aumento das bilirrubinas séricas (dentro da faixa de normalidade) e aumento sutil das transaminases (Ma *et al.*, 2010).

miRNAs *sponges* são RNAs desenhados para conter múltiplos sítios de ligação complementares a um heptâmero na região da semente do miRNA de interesse. O método foi desenvolvido com o objetivo de criar uma perda contínua da função de miRNA em linhagens celulares e organismos transgênicos. Os miRNAs *sponges* contêm sítios de ligação complementares ao miRNA de interesse e são produzidos a partir de transgenes no interior de células. Esses sítios de ligação, por serem específicos à região da semente do miRNA, permitem o bloqueio de toda a família de miRNAs associada a esta região

A eficácia de miRNAs *sponges* depende das concentrações dessas, que são codificadas em vetores virais que são conduzidos por um promotor (p. ex.: o promotor de citomegalovírus), o qual pode ser transportado de forma estável para permitir entrega a longo prazo de miRNA (Ebert *et al.*, 2007).

Os desafios associados com o tratamento antiMIR incluem respostas inesperadas em tecidos não alvo, uma vez que um sistema específico que atue somente nas células tumorais ainda não foi desenvolvido. Para avaliar a eficácia de um antimir, faz-se necessário não só obter o perfil de expressão do miRNA nas células tumorais, mas, também, determinar a extensão da repressão funcional do alvo.

1.9.4 Pequenas moléculas visando aos miRNAs

Embora a maior parte das pesquisas no campo da terapêutica envolvendo miRNAs se concentre em abordagens baseadas em oligonucleotídeos, há vários relatos de esforços para identificar drogas, com pequenas moléculas, que tenham como alvo os miRNAs específicos (SMIRS) e modulem suas atividades.

As vantagens dos SMIRS é que eles são compostos químicos e, portanto, o desenvolvimento de drogas convencionais pode ser aplicado. As limitações são sua baixa especificidade, possíveis efeitos colaterais indesejados e sua concepção mais complicada em comparação com a terapêutica à base de oligonucleotídeos.

1.9.5 Bloqueio extracelulares em exossomos de miRNAs

Tal como descrito anteriormente, descobriu-se, recentemente, que os miRNAs (tais como o miR 21, miR 29a e miR 16) podem ser liberados por células cancerosas dentro de exossomas. Quando fagocitados por macrófagos no microambiente do tumor, os miRNAs posicionam-se junto ao TLR8 no endossoma das células receptoras e ativam o TLR8 específico de RNA de cadeia simples nos seres humanos (ou o seu homólogo murino TLR7). Isto leva a um aumento da secreção de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) pelas células do sistema imune, o que pode aumentar a proliferação e o potencial metastático das células cancerosas (Fabbri *et al.*, 2012).

Este novo mecanismo de ação e seu potencial papel central na disseminação do câncer abriga importantes implicações translacionais (Fabbri *et al.*, 2012), pois cria-se uma nova possibilidade de modular a função dos microRNAs.

1.9.6 Abordagens combinadas

O uso de coquetéis de vários agentes de miRNA', juntamente com agentes quimioterápicos ou agentes direcionados molecularmente, pode resultar em importantes efeitos sinérgicos, beneficiando pacientes.

A expressão ectópica de miR 30c, que é um bom marcador prognóstico para câncer de mama humano, foi capaz de sensibilizar as células cancerígenas à doxorrubicina em um modelo de xenotransplante de tumores

de mama humanos triplo-negativo em camundongos. Esta sensibilização foi alcançado pela regulação negativa da twinfilin 1 (TWF1) e IL11, dois genes codificadores de proteínas que regulam a sensibilidade a drogas (Bockhorn *et al.*, 2013). Da mesma forma, a combinação de 5-fluorouracil com um vetor adenoviral que expressa o supressor de tumor miR-145 demonstrou exercer um efeito antiproliferativo mais potente, tanto *in vitro* quanto em modelos *in vivo* de câncer de mama, do que o tratamento com 5-fluorouracil sozinho (Kim *et al.*, 2011).

1.9.7 Desafios e perspectivas

O desenvolvimento de estratégias de miRNA e lncRNA-alvo enfrenta diversos obstáculos. Um deles é o sucesso da entrega do agente terapêutico para os tecidos-alvo que pode ser influenciado negativamente, por exemplo, no momento da sua liberação a partir do sangue para o tecido-alvo, por meio do endotélio capilar, quando os complexos são maiores do que 5 nm de diâmetro (Whitehead *et al.*, 2009).

Além disso, estas formulações de circulação sistêmica podem ser influenciadas negativamente pelo sistema imunológico do hospedeiro, pois os macrófagos e monócitos podem remover tais moléculas de espaços extracelulares (Broderick, Zamore, 2011).

A recente descoberta de que a eliminação do grupo oncogênico miR-17/miR 92 provoca defeitos congênitos de desenvolvimento humano torna necessário que se considerem os efeitos, não relacionados ao câncer, de miRNAs na concepção de terapias (de Pontual *et al.*, 2011).

O MRX34, desenvolvido pela *Mirna Therapeutics*, uma droga formulada em lipossomas do supressor de tumor miR 34, produziu regressão completa do tumor em dois modelos de linhagem de camundongos com câncer hepático, sem nenhuma atividade imunoestimulante observada ou toxicidade para os tecidos normais. Estes resultados originaram um ensaio clínico de Fase I (ClinicalTrials.gov; identificador: NCT01829971) (Ling *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

- Avaliar a expressão de microRNAs, por PCR em tempo real, no carcinoma mamário ductal invasivo triplo negativo.

2.2 Secundários

- Avaliar, por meio de imunoistoquímica, a expressão de KI-67, EFGR, CK 5-6;
- Relacionar a expressão de miRNAs com a sobrevida livre de doença e a sobrevida câncer específica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Estudo descritivo de características histológicas, imunoistoquímicas e moleculares de tumores malignos de mama triplo negativos. 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 a partir de 2002.

Foram avaliados material em parafina de tumor de 31 pacientes com as seguintes características: carcinoma invasivo de mama, receptores de estrogênio e de progesterona negativos e HER 2 negativo, bem como tecido mamário histologicamente normal.

Foram excluídos os casos em que não foi possível avaliar seguimento após cirurgia ou nas pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante.

3.2 Métodos

Os espécimes utilizados, fixados em formol e emblocados em parafina, foram dissecados para purificação do tecido tumoral sob orientação da patologista Dra. Ana Paula Torres e, posteriormente, Dr. Fernando Nalesso Aguiar, sob técnica padronizada. Nenhuma das etapas, exceto o estudo imunoistoquímico, foi realizada nas dependências do Hospital das Clínicas, apenas obtivemos os blocos parafinados de tumores das pacientes selecionadas. O processo de quantificação e análise da expressão de miRNA foi realizado no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM 58) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação da bióloga Dra. Kátia Cândido Carvalho.

Para identificar sequências de miRNA nos tumores ductais invasivos triplo negativos, utilizou-se o *Human Cancer miRNA PCR Array*. Este define a expressão de 84 sequências de miRNA cujos níveis, em resultados publicados, relacionam-se bem com diagnóstico, estadiamento e prognóstico de vários cânceres ou tumores. Esse *array* permitiu aos pesquisadores analisar os mais relevantes miRNA relacionados à tumorigênese mamária. O material foi analisado em equipamento de PCR em Tempo Real modelo ABI 7500 Real Time PCR System, instrumento permanente do LIM-58 da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O padrão de expressão de miRNAs foi avaliado.

O *Human Breast Cancer miScript miRNA PCR Array* permite definir o perfil de expressão de 84 miRNAs com expressão presumível ou conhecidamente alterada durante a iniciação ou progressão do câncer de mama. Esse *array* inclui miRNAs com funções conhecidas no câncer de mama, assim como miRNAs potencialmente envolvidos, tanto via estudos de *microarray* quanto a estudos por bioinformática de prováveis reguladores de genes relacionados a câncer de mama. Controles presentes no *array* permitem a análise usando método de quantificação relativa $\Delta\Delta CT$, averiguação da qualidade da transcrição reversa e do PCR.

Para tanto, foram utilizados *kits* para extração de RNA de amostras fixadas e parafinadas – miRNeasy FFPE; kit miScript II RT para síntese de cDNA, kit miScript SYBR Green PCR e miScript miRNA PCR Arrays para análise de 84 sequências de miRNA de câncer humano. 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, dois controles positivos de PCR. Todos reagentes e placas são comercializados no Brasil exclusivamente pela Importação Indústria e Comércio Ambriex S.A.

Foram avaliados dados clínicos, como idade, paridade, amamentação, *status* menopausal; variáveis histológicas, como tamanho do tumor, *status* linfonodal, invasão linfática; características imunoistoquímicas, como expressão de Ki-67, EFGR e CK 5/6. O seguimento das pacientes buscou

verificar a ocorrência e o tempo de aparecimento de recidiva loco regional, metástase à distância e óbito.

Tais variáveis foram relacionadas à expressão dos miRNAs na tentativa de identificar ferramentas prognósticas moleculares.

Os custos da pesquisa, incluindo aqueles do laboratório, foram financiados por instituição fomentadora externa.

Seguem, abaixo, os protocolos utilizados nas etapas de obtenção dos cortes de tecido, desparafinização, extração de RNA, conversão em c-DNA e PCR em tempo real.

3.2.1 Preparo dos cortes de parafina para purificação de RNA

- A lâmina, correspondente ao bloco de tecido a ser utilizada foi, previamente, marcada pelo patologista para orientar qual parte do material embocado, em parafina, correspondia ao tecido objeto de análise;
- Foram obtidos cortes de tecido parafinado, cada um não ultrapassando 20 µm. Seções mais espessas podem 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 mm² podem ser combinados em uma preparação. Mais que 4 seções podem ser preparadas se a soma não ultrapassar 40 µm;
- O excesso de material pode sobrecarregar o RNeasy MinElute spin column, e isso pode significar rendimento e qualidade de RNA comprometidos.

3.2.2 Protocolo de desparafinização

3.2.2.1 Princípios

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

Após, amostras são 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* (ligações cruzadas formando reticulados) dos ácidos nucleicos, melhorando o rendimento e a qualidade do RNA, assim como a sua performance em ensaios enzimáticos *downstream* (a jusante).

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

A amostra é 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* (água livre de RNase).

3.2.2.2 Procedimentos

- 1 Usando uma lâmina de bisturi, apara-se o excesso de parafina do bloco e projeta-se a área da qual deverão ser retirados os cortes parafinados de tecido para análise;
- 2 Corta-se, com auxílio do micrótomo, seções de 5–20 µm de espessura. Caso a superfície da amostra tenha sido exposta ao ar, descartam-se as primeiras 2 ou 3 seções;
- 3 Imediatamente, colocamos os cortes em tubos para microcentrifugação (eppendorf) de 1,5 ml e fechamos a tampa;

- 4 Adicionam-se 160 µl de solução de desparafinização. Vortexamos vigorosamente por 10 segundos e centrifugamos, brevemente, para levar a amostra para o fundo do tubo;
- 5 Incuba-se o tubo, contendo as amostras e soluções, a 56°C por 3 min, depois, permite-se resfriamento até temperatura ambiente (15 a 25°C);
- 6 Adiciona-se 150 µl de TAMPÃO PKD, e mistura-se vortexando;
- 7 Centrifuga-se por 1 min a 11,000 x g (10,000 rpm);
- 8 Adiciona-se 10 µl de proteinase K para a fase mais funda (clara) formada no tubo. Mistura-se, gentilmente, pipetando para baixo ou para cima;
- 9 Incuba-se a 56°C por 15 min, depois a 80°C por mais 15 min. Foram utilizados dois *heating blocks* (blocos de aquecimento), o primeiro a 56°C e o segundo a 80°C;
IMPORTANTE: foi assegurado que o *heating block* atingisse 80°C antes de iniciar a incubação por 15 min. A incubação a 80°C é crítica para ótima performance de RNA nas aplicações *downstream*, como 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 *CT values* em aplicações como RT PCR.
- 10 Transfere-se a fase clara, mais funda, para um novo tubo de microcentrifugação de 2 mL;
- 11 Incuba-se no gelo por 3 minutos. Após a incubação em gelo, centrifuga-se por 15 minutos a 20,000 x g (13,500 rpm);
- 12 Transferimos, então, o supernadante para um novo tubo de microcentrifuga, tomando cuidado para não perturbar o *pellet* (detritos depositados no fundo do tubo). O *pellet* contém debris de tecido insolúveis, incluindo DNA *cross linked*;

- 13 Adiciona-se tampão DNase Booster equivalente a um décimo do total volume da amostra (aproximadamente, 16 µl) e 10 µl da solução DNase I stock. Mistura-se invertendo o tubo e centrifuga-se, brevemente, para coletar o líquido residual das paredes do tubo. A DNase I é, especialmente, sensível à denaturação física. Portanto, teve-se o cuidado de misturar apenas gentilmente, invertendo o tubo. Não vortexamos. Incubamos à temperatura ambiente por 15 minutos. Adiciona-se 320 µl do TAMPÃO RBC para ajustar as condições de ligação e mistura-se o lisado completamente;
- 14 Adiciona-se 1120 µl de etanol (100%) à amostra e mistura-se, pipetando (SEM CENTRIFUGAR). Procedemos, imediatamente, ao passo 15. Nesta etapa, precipitados podem ser visíveis após adição do etanol. Isso não afeta o procedimento;
- 15 Transferimos 700 µl da amostra, incluindo qualquer precipitado que tenha se formado ao *RNeasy MinElute spin column* localizado num tubo de 2 mL. Fecha-se a tampa gentilmente e centrifuga-se por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descartar o *flow-through* (eluído). Repete-se o passo 15 até toda a amostra ter passado pelo *RNeasy MinElute spin column*. Reutiliza-se o tubo da coleção no passo 16;
- 16 Adiciona-se 500 µl do TAMPÃO RPE ao *RNeasy MinElute spin column*. Fecha-se, gentilmente, a tampa por 15 s a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descartar o *flow-through* (eluído);
- 17 Adiciona-se, então, 500 µl do TAMPÃO RPE ao *RNeasy MinElute spin column*. Fechar a tampa gentilmente e centrifugar por 2 min a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) para lavar a membrana da *spin column*. Nesta etapa, descarta-se o tubo da coleção com o *flow-through*;
Nota: Após a centrifugação, cuidadosamente, remove-se a *RNeasy MinElute spin column* do tubo da coleção para que não haja contato com o *flow-through*. Caso contrário, o carreamento do etanol pode ocorrer;

- 18 Colocar o RNeasy MinElute spin column em um novo tubo da coleção de 2 mL (fornecido no kit). Com a tampa do tubo aberta, centrifuga-se na velocidade máxima por 5 minutos. Descarta-se o tubo coletor com o *flow-through*;
Nota: É importante secar a membrana do spin column, uma vez que etanol residual pode interferir nas reações de *downstream*. Centrifugação com as tampas abertas assegura que não haja etanol residual;
- 19 Colocamos o RNeasy MinElute spin column em um novo tubo de coleção de 1,5mL (fornecido). Adicionamos de 14–30 µl de *RNase-free water* diretamente na membrana da spin column. Fecha-se a tampa cuidadosamente e centrifuga-se por um minuto na velocidade máxima para eluir o RNA. Eluição com volumes menores de *RNase-free water* leva a maiores concentrações de RNA total, mas diminui o rendimento de RNA. O volume morto do RNeasy MinElute spin column é de 2 µl: eluição com 14 µl *RNase-free water* resulta em eluato de 12 µl.

3.2.2.3 Quantificação e qualificação da amostra obtida

01 µl do eluato de RNA obtido é, 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 entre 150 a 250 ng/µl são ideais). As razões devem ter valores próximos 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 fluxograma abaixo resume a técnica de conversão em cDNA:

Figura 7 - Técnica de conversão em cDNA

O cDNA preparado em uma reação de transcrição 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.

3.2.4 Protocolo de conversão em cDNA

3.2.4.1 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 I

5. Adicionar solução de RNA em cada tubo contendo a 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.

Se você desejar armazenar as reações de transcriptase reversa antes do PCR em tempo real, transfira o cDNA não diluído para um freezer a – 20°C, ou acondicione o cDNA diluído em alíquotas de 110 µl e, depois, transfira para um freezer a - 20°C.

3.2.5 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.

O volume padrão de reação do miScript miRNA PCR Array é 10 µl por poço para uma placa de 96 poços. Utilizamos, nesta pesquisa, a placa de 96 poços.

3.2.5.1 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 a seguir (Tabela 2);

Tabela 2 – Componentes para reação PCR.

COMPONENTE	VOLUME
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375 µl
10x miScript Universal Primer	275 µl
RNase-free water	1000 µl
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, fechar 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 ciclador de acordo com a tabela abaixo (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.

3.2.6 Método estatístico

Para caracterizar 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 utiliza o método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$. A análise estatística é feita por meio do *WEB based Data Analysis* no endereço eletrônico <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>.

Como é feito o cálculo $\Delta\Delta Ct$?

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 $\Delta C(t)$ tumor e Média $\Delta C(t)$ 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.

Nas análises que consideraram as características clínico-epidemiológicas das pacientes, o *software* SPSS para Windows versão 21 foi utilizado para as avaliações estatísticas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos grupos em todas as análises. Para a associação de dois grupos com distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student, e, para os grupos que não possuíam distribuição normal, o teste Mann-Whitney. Para a comparação entre mais de dois grupos sem distribuição normal, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, e, para aqueles que possuíam distribuição normal, o teste ANOVA. Para os testes ANOVA com associação significativa, o teste Post-Hoc de Tukey foi utilizado. O grau de significância adotado para as avaliações foi de $p < 0,05$.

As análises de sobrevida foram feitas no *software* SPSS para Windows versão 21. As curvas de sobrevida foram confeccionadas pelo método de Kaplan-Meier e o grau de significância foi estabelecido pelo teste de log-rank.

Foi estabelecido um “N” de 30 casos, seguindo tendência da literatura, para determinação da expressão de microRNAs por não ser possível, até o momento, determinar uma frequência de expressão para todos os microRNAs em estudo, fator necessário para o cálculo amostral.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram selecionados, no Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP e do ICESP, 41 blocos parafinados de tecido tumoral e 39 blocos de tecido normal. Dos 41 blocos de tecido tumoral, foram extraídas 33 amostras de RNA total. Dos 39 blocos parafinados de tecido normal, foram extraídas 26 amostras de RNA total.

As 33 amostras de RNA de tecido tumoral foram convertidas em cDNA e submetidas a PCR em tempo real. O controle de qualidade das reações de 31 casos foi considerado adequado.

As 26 amostras de RNA de tecido normal foram convertidas em cDNA, processou-se o PCR em tempo real, sendo que, em 18 casos, a reação foi satisfatória.

Desta forma, obtiveram-se avaliações da expressão de miRNAs em 31 amostras de tumores triplo negativos e em 18 amostras de tecido mamário normal (Figura 8). Denominamos as amostras de tecido normal como grupo-controle (2) e os tumores como grupo-estudo (1).

Figura 8 - Casos bem-sucedidos da extração de RNA total à quantificação de miRNA.

As amostras de tecido tumoral, 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 4.

Tabela 4 - Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido tumoral

Amostra	Concentração (Ng/ MI)	260/280	260/230
TN 18430T	119.6	1.96	1.72
TN 2911T	481.3	1.98	1.69
TN 3303T	172.0	1.91	1.76
TN 1085T	105.0	2.01	1.87
TN 6514T	174.0	1.96	2.01
TN 11241	228.0	1.98	2.01
TN 6732T	36.8	1.96	1.96
TN 9073T	80.9	1.90	1.77
TN 17002T'	288.4	1.99	1.71
TN 25872T	342.3	2.04	1.71
TN 13438	130.3	2.09	2.24
TN 4849T	158.1	1.99	1.87
TN 15303T	229.3	1.95	1.88
TN 15184T	221.8	2.06	2.09
TN 12655T	44.0	1.82	1.71
TN 10863T	189.0	1.94	1.95
TN 45303T	181.9	2.00	1.83
TN 29271T	68.8	1.82	2.00
TN 21114T	231.6	2.06	2.14
TN 0973T	205.5	1.84	1.51
TN 3942T	19.0	1.79	1.34
TN 170T	392.6	1.93	1.60
TN 595T	995.4	1.98	1.80
TN 13510T	388.8	1.93	1.81
TN 16351T	581.0	1.95	1.81
TN 181T	485.8	1.90	2.00
TN 2147T	196.6	1.95	1.86
TN 19147T	606.7	1.94	1.88
TN 1743T	114.8	1.92	1.83
TN 1086T	285.7	1.91	1.76
TN 1601T	228.4	2.01	1.84

As amostras de tecido 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 5.

Tabela 5 - Concentração de RNA e razões de purificação da amostra de tecido normal

Amostra	Concentração (Ng/ Ml)	260/280	260/230
TN 1954N	48.4	1.91	1.43
TN 3303N	58.9	1.84	1.19
TN 6514N	60.6	1.90	1.61
TN 9073N	36.0	1.89	1.75
TN 25872N	34.1	1.93	1.17
TN 11241N	89.3	2.13	2.16
TN 1N	111.2	1.98	1.72
TN 2N	51.3	1.51	0.67
TN 3N	38.9	1.97	1.64
TN 16351N	42.2	1.92	1.69
TN 18498N	84.2	1.92	1.54
TN 45303N	42.0	1.99	2.48
TN 4N	47.1	1.93	1.40
TN 5N	32.3	2.04	1.88
TN 6N	31.8	1.93	1.60
TN 7N	15.1	1.86	1.66
TN 13073	53.5	1.86	1.34
TN 1301601N	38.2	1.80	1.15

A média de tempo entre a fixação em formalina-parafina até a extração de RNA das amostras avaliadas foi de 28,8 meses, variando de 3 a 59 meses, com desvio-padrão de 16,6 meses.

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-estudo (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.

A avaliação da hiperexpressão (em vermelho) e da hipoexpressão (em azul) de microRNAs no grupo 1 em relação ao controle está discriminada na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores do *fold-change*, intervalo de confiança, *p-value* e *fold-regulation* nos miRNAs avaliados.

mi-RNA	Fold-change	95%IC	p	Fold-regulation
hsa-let-7a-5p	0,4291	(0.09, 0.77)	0,086258	-2,3303
hsa-let-7b-5p	0,5337	(0.26, 0.81)	0,016027	-1,8738
hsa-let-7c-5p	0,2034	(0.05, 0.36)	0	-4,9155
hsa-let-7d-5p	0,8301	(0.28, 1.38)	0,866634	-1,2047
hsa-let-7e-5p	0,3184	(0.11, 0.53)	0,006271	-3,1409
hsa-let-7f-5p	0,5638	(0.09, 1.04)	0,257701	-1,7737
hsa-let-7g-5p	0,6874	(0.11, 1.27)	0,782185	-1,4547
hsa-let-7i-5p	2,3074	(0.00001, 4.94)	0,090454	2,3074
hsa-miR-1	0,3327	(0.14, 0.53)	0,008256	-3,0056
hsa-miR-100-5p	0,4077	(0.20, 0.61)	0,225002	-2,4528
hsa-miR-107	3,9119	(2.26, 5.57)	0,00061	3,9119
hsa-miR-10a-5p	0,355	(0.16, 0.55)	0,417843	-2,8166
hsa-miR-10b-5p	0,3109	(0.15, 0.48)	0,000217	-3,2162
hsa-miR-125b-5p	0,2328	(0.13, 0.34)	0	-4,295
hsa-miR-125b-1-3p	0,5052	(0.23, 0.78)	0,016127	-1,9793
hsa-miR-128	1,7585	(0.85, 2.67)	0,053636	1,7585
hsa-miR-129-5p	1,4781	(0.74, 2.22)	0,06079	1,4781
hsa-miR-130a-3p	0,6206	(0.39, 0.85)	0,351133	-1,6114
hsa-miR-130b-3p	1,8966	(1.24, 2.56)	0,002867	1,8966
hsa-miR-132-3p	0,8975	(0.57, 1.22)	0,294604	-1,1142
hsa-miR-140-5p	1,1287	(0.60, 1.66)	0,580194	1,1287
hsa-miR-141-3p	3,8942	(2.01, 5.78)	0,000599	3,8942
hsa-miR-145-5p	0,2501	(0.16, 0.34)	0	-3,9985
hsa-miR-148a-3p	0,9021	(0.35, 1.46)	0,165229	-1,1085
hsa-miR-152	0,9467	(0.67, 1.22)	0,504041	-1,0563
hsa-miR-155-5p	4,401	(2.83, 5.97)	0,00019	4,401
hsa-miR-15a-5p	1,8331	(0.48, 3.19)	0,023265	1,8331
hsa-miR-15b-5p	2,79	(1.76, 3.82)	0,000977	2,79
hsa-miR-16-5p	2,2623	(1.59, 2.93)	0,000044	2,2623
hsa-miR-17-5p	3,364	(2.01, 4.71)	0,000132	3,364
hsa-miR-181a-5p	3,3475	(2.23, 4.47)	0,000065	3,3475
hsa-miR-181b-5p	2,8233	(1.93, 3.71)	0,000807	2,8233
hsa-miR-181c-5p	3,1098	(1.97, 4.25)	0,001547	3,1098
hsa-miR-181d	2,4623	(1.73, 3.20)	0,001774	2,4623
hsa-miR-182-5p	7,9218	(4.65, 11.19)	0,000001	7,9218
hsa-miR-186-5p	1,8418	(1.39, 2.30)	0,0001	1,8418
hsa-miR-18a-5p	9,5167	(4.81, 14.23)	0,000034	9,5167
hsa-miR-193b-3p	2,1063	(1.01, 3.20)	0,421054	2,1063
hsa-miR-195-5p	0,773	(0.53, 1.01)	0,177064	-1,2937
hsa-miR-199b-3p	0,7128	(0.43, 1.00)	0,450391	-1,403
hsa-miR-199a-5p	1,3272	(0.79, 1.86)	0,17113	1,3272

continua

continuação

mi-RNA	Fold-change	95%IC	P	Fold-regulation
hsa-miR-19a-3p	2,6105	(1.34, 3.88)	0,001245	2,6105
hsa-miR-19b-3p	2,2039	(1.29, 3.12)	0,002414	2,2039
hsa-miR-200a-3p	3,2633	(1.68, 4.85)	0,000135	3,2633
hsa-miR-200b-3p	1,835	(1.28, 2.39)	0,001355	1,835
hsa-miR-200c-3p	2,1318	(1.52, 2.74)	0,094857	2,1318
hsa-miR-202-3p	1,8166	(0.99, 2.65)	0,020026	1,8166
hsa-miR-203a	2,212	(0.96, 3.47)	0,00212	2,212
hsa-miR-204-5p	0,0974	(0.06, 0.14)	0	-10,2676
hsa-miR-205-5p	0,2454	(0.10, 0.39)	0,019822	-4,0747
hsa-miR-206	0,8693	(0.52, 1.22)	0,606449	-1,1503
hsa-miR-20a-5p	2,6794	(1.65, 3.70)	0,000614	2,6794
hsa-miR-20b-5p	2,3433	(1.41, 3.27)	0,002469	2,3433
hsa-miR-21-5p	4,4771	(3.18, 5.78)	0	4,4771
hsa-miR-210-3p	11,8336	(7.25, 16.41)	0,000048	11,8336
hsa-miR-212-3p	1,8277	(1.17, 2.48)	0,182141	1,8277
hsa-miR-214-3p	0,6017	(0.40, 0.80)	0,334355	-1,6618
hsa-miR-22-3p	3,0473	(1.83, 4.27)	0,000119	3,0473
hsa-miR-222-3p	1,1299	(0.85, 1.41)	0,175148	1,1299
hsa-miR-223-3p	1,0552	(0.67, 1.44)	0,87766	1,0552
hsa-miR-25-3p	2,2918	(1.70, 2.89)	0,000043	2,2918
hsa-miR-26a-5p	0,3987	(0.30, 0.49)	0	-2,5084
hsa-miR-26b-5p	0,3882	(0.27, 0.51)	0	-2,5761
hsa-miR-27a-3p	2,1155	(1.49, 2.74)	0,00061	2,1155
hsa-miR-27b-3p	1,2611	(0.91, 1.61)	0,028485	1,2611
hsa-miR-29a-3p	0,8082	(0.60, 1.02)	0,245449	-1,2373
hsa-miR-29b-3p	0,9695	(0.71, 1.23)	0,52687	-1,0315
hsa-miR-29c-3p	0,7162	(0.51, 0.92)	0,015269	-1,3963
hsa-miR-31-5p	0,7269	(0.38, 1.07)	0,586011	-1,3757
hsa-miR-328	0,4001	(0.27, 0.53)	0,000355	-2,4995
hsa-miR-340-5p	2,1961	(1.54, 2.85)	0,001685	2,1961
hsa-miR-424-5p	0,7269	(0.38, 1.07)	0,082747	-1,3757
hsa-miR-429	3,3143	(1.61, 5.02)	0,000558	3,3143
hsa-miR-485-5p	0,508	(0.24, 0.78)	0,036722	-1,9685
hsa-miR-489	0,8023	(0.53, 1.07)	0,523516	-1,2465
hsa-miR-495-3p	0,7414	(0.00001, 1.70)	0,061797	-1,3488
hsa-miR-497-5p	0,5312	(0.35, 0.72)	0,004073	-1,8826
hsa-miR-548c-3p	1,5002	(0.81, 2.19)	0,060753	1,5002
hsa-miR-607	0,6076	(0.34, 0.87)	0,123526	-1,6457
hsa-miR-613	1,1791	(0.84, 1.52)	0,223816	1,1791

continua

conclusão

mi-RNA	Fold-change	95%IC	P	Fold-regulation
hsa-miR-7-5p	5,897	(3.21, 8.59)	0,00137	5,897
hsa-miR-93-5p	4,1527	(2.73, 5.58)	0,000023	4,1527
hsa-miR-96-5p	9,6873	(4.31, 15.07)	0,000008	9,6873
hsa-miR-98-5p	2,2562	(1.49, 3.02)	0,000028	2,2562
cel-miR-39-3p	0,6367	(0.37, 0.90)	0,134248	-1,5705
cel-miR-39-3p	0,6652	(0.38, 0.95)	0,328519	-1,5033
SNORD61	0,7783	(0.58, 0.98)	0,193948	-1,2849
SNORD68	0,7934	(0.60, 0.99)	0,722548	-1,2604
SNORD72	1,6561	(1.06, 2.25)	0,021262	1,6561
SNORD95	0,8058	(0.60, 1.01)	0,547355	-1,2411
SNORD96A	0,9357	(0.69, 1.18)	0,664901	-1,0688
RNU6-2	1,545	(1.16, 1.93)	0,020843	1,545
miRTC	1,0918	(0.43, 1.75)	0,69092	1,0918
miRTC	1,1067	(0.43, 1.79)	0,580906	1,1067
PPC	0,6326	(0.35, 0.91)	0,098943	-1,5807
PPC	0,6506	(0.37, 0.94)	0,146074	-1,537

A seguir, observamos o clustergrama da magnitude da expressão gênica de miRNAs (Figura 9) nas amostras tumorais (T) e não tumorais(N).

Figura 9 - Clustergrama da magnitude da expressão gênica de miRNAs

Identificamos 8 microRNAs mais hiperexpressos e 4 mais hipoexpressos considerando *fold regulation* $>+4$ ou <-4 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Gráfico de dispersão: em vermelho, miRNAs hiperexpressos, em verde, os hipoexpressos ($p < 0.05$; $+4 < \text{fold regulation} < -4$).

O Gráfico 2 nos mostra a magnitude de expressão dos microRNAs no grupo-estudo (grupo 1) conforme o valor de *fold change*.

Gráfico 2 - Comparação dos *fold-change* de microRNAs com expressão relevante

Foi feita a categorização supervisionada com a expressão de 20 microRNAs nas amostras tumorais e não tumorais selecionando o perfil de expressão que diferenciou o tumor do tecido normal com o menor número de miRNAs possível (Figura 10).

Figura 10 - Categorização supervisionada dos microRNAs estudados, dividindo as amostras em dois grupos: tecido tumoral (T) e tecido não tumoral (N).

Foram analisadas, também, as informações referentes à idade, à paridade, ao *status* menopausal, à idade ao primeiro parto de gestação a termo, à amamentação, à história familiar, ao tabagismo, ao tamanho do tumor(T), ao estadiamento, ao acometimento linfonodal, à terapia hormonal, à invasão linfática, ao infiltrado inflamatório, à invasão perineural, à presença de componente intraductal, à expressão de KI-67, à sobrevida livre de doença e à sobrevida câncer específica.

A média de idade das pacientes, das quais as amostras de tumor foram bem-sucedidas na avaliação da expressão de miRNAs por RT-PCR, foi de 61,06 anos (mediana de 64 anos).

Em relação à paridade, 3 (9,68%) pacientes eram nuligestas e 28 (90,32%) haviam gestado.

Quanto ao *status* menopausal, 7 (22,58%) pacientes encontravam-se em pré-menopausa e 24 (77,42%) em pós-menopausa; dentre as pacientes que gestaram, 14 (50,00%) tinham até 25 anos de idade ao primeiro parto de gestação a termo, 6 (21,43%) tinham mais de 25 anos e de 08 pacientes (28,57%) não obtivemos este dado.

Dos casos, 87,1% (27 pacientes) já haviam amamentado durante a vida, enquanto 12,9% (4 pacientes) nunca amamentaram.

Dez pacientes apresentavam história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário (32,26%), enquanto 11 pacientes eram tabagistas (35,48%).

Quanto ao tamanho tumoral: 16,13% (5 pacientes) tinham tumor até 2 cm; 61,29%, tumores entre 2,1 a 5 cm e 22,58% tinham tumores maiores que 5 cm.

Apresentavam doença localmente avançada 58,06% (18 pacientes) (estádio IIB ou maior), enquanto 41,94% (13 pacientes) apresentavam doença em estágio I e IIA (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Distribuição dos casos por estágio da doença

Foram submetidas à mastectomia radical modificada(MRM) 45,16%, 12,90%, à mastectomia simples com biópsia de linfonodo sentinela (MS+LS), 22,58%, à quadrantectomia com esvaziamento axilar (QUAD+EA) e 19,35%, à quadrantectomia com biópsia de linfonodo sentinela (QUAD+LS) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Distribuição dos casos de acordo com o tratamento cirúrgico realizado

Apresentavam componente de carcinoma ductal *in situ* associado 41,94% das pacientes; 35,48% apresentavam invasão perineural; 70,97% infiltrado inflamatório; 16,13% invasão linfática e 48,39% tinham acometimento linfonodal.

Vinte e quatro pacientes (77,42%) apresentavam imunoistoquímica positiva para citoqueratinas 5-6 e/ou EGFR; 02 pacientes (6,45%) apresentavam imunoistoquímica negativa para CK 5-6 e EGFR; 05 pacientes (16,13%) não tinham avaliação de CK 5-6; e EGFR no exame imunoistoquímico.

Das 6 pacientes que não foram submetidas à QT (quimioterapia) adjuvante, 5 tinham mais de 70 anos de idade e uma, com 56 anos de idade, desistiu da QT, mas manteve o seguimento.

Das 08 pacientes que não foram submetidas a RT adjuvante, 06 haviam sido submetidas à mastectomia e não tinham indicação para RT adjuvante, 01 submetida à mastectomia tinha indicação de RT, mas tinha contraindicação clínica; 01 paciente, submetida à quadrantectomia, não foi convocada para radioterapia e perdeu o prazo para início de tratamento.

O tempo médio de seguimento das pacientes foi de 31,7 ($\pm$ 21,9) meses.

Quanto ao perfil de expressão de microRNAs em relação às características clínicas das pacientes, considerou-se *fold regulation* maior que +2 ou menor que -2 e $p < 0.05$. Observamos que:

a) Em relação à idade(i):

Dividiu-se os casos em três grupos de acordo com a faixa etária: idade < 40 anos, 40 a 60 anos e > 60 anos. A comparação de expressão foi feita entre grupos em relação ao tecido normal. Identificou-se diferença estatística entre os grupos na expressão dos seguintes miRNAs: miR-129-5p, miR-203a, miR-205-5p, miR-26b-5p e miR-7-5p (Tabela 7). Posteriormente, foi feito teste *post-hoc* com estes miRNAs, possibilitando a identificação de em quais comparações entre grupos se encontrava a diferença estatística.

Por exemplo, em relação ao miR 203a, houve diferença estatística na comparação de expressão entre pacientes com 40 a 60 anos *versus* pacientes com > 60 anos ($p=0,005$) (Tabela 8).

Tabela 7 – Dados da expressão de microRNAs avaliados por grupos de idade. Em vermelho, hiperexpressão, e, em azul, hipoeexpressão (considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$; $P < 0,05$).

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-padrão	P	Fold regulation
hsa_miR_129_5p	<40 anos	6,19	1,09	0,019	6,19
	40-60 anos	2,42	2,37		2,42
	>60 anos	1,84	1,57		1,84
hsa_miR_203a	<40 anos	4,34	4,31	0,014	4,34
	40-60 anos	7,49	4,84		7,49
	>60 anos	2,58	2,29		2,58
hsa_miR_205_5p	<40 anos	2,53	2,52	0,005	2,53
	40-60 anos	0,51	0,62		-1,96
	>60 anos	0,40	0,29		-2,50
hsa_miR_26b_5p	<40 anos	0,14	0,12	0,038	-7,14
	40-60 anos	0,54	0,22		-1,85
	>60 anos	0,43	0,17		-2,32
hsa_miR_7_5p	<40 anos	21,88	18,96	0,017	21,88
	40-60 anos	11,17	8,06		11,17
	>60 anos	5,69	4,23		5,69

Tabela 8 – Dados da expressão de microRNAs avaliados por grupos de idade em Teste Post-Hoc.

Teste Post-Hoc Tukey HSD			
Variável dependente	(I) Idade	(J) Idade	p
hsa_miR_129_5p	< 40 ANOS	40-60 ANOS	0,046
		>60 ANOS	0,014
	40-60 ANOS	< 40 ANOS	0,046
		>60 ANOS	0,725
	>60 ANOS	< 40 ANOS	0,014
		40-60 ANOS	0,725
hsa_miR_203 ^a	< 40 ANOS	40-60 ANOS	0,511
		>60 ANOS	0,794
	40-60 ANOS	< 40 ANOS	0,511
		>60 ANOS	0,005
	>60 ANOS	< 40 ANOS	0,794
		40-60 ANOS	0,005
hsa_miR_205_5p	< 40 ANOS	40-60 ANOS	0,008
		>60 ANOS	0,004
	40-60 ANOS	< 40 ANOS	0,008
		>60 ANOS	0,938
	>60 ANOS	< 40 ANOS	0,004
		40-60 ANOS	0,938
hsa_miR_26b_5p	< 40 ANOS	40-60 ANOS	0,033
		>60 ANOS	0,12
	40-60 ANOS	< 40 ANOS	0,033
		>60 ANOS	0,358
	>60 ANOS	< 40 ANOS	0,12
		40-60 ANOS	0,358
hsa_miR_7_5p	40-60 ANOS	40-60 ANOS	0,198
		< 40 ANOS	0,198
	>60 ANOS	>60 ANOS	0,189
		< 40 ANOS	0,025
		40-60 ANOS	0,189

b) Em relação ao *status* menopausal:

Os grupos pré-menopausa ao diagnóstico e pós-menopausa ao diagnóstico foram comparados com o tecido normal para obtenção dos valores de *fold-change* e *fold-regulation*. Posteriormente, a comparação entre pré-menopausa e pós-menopausa identificou 3 miRNAs com diferença de expressão: let-7i-5p, miR-1 e miR-125b-1-3p (Tabela 9).

Tabela 9 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao *status* menopausal das pacientes. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando +2 <fold regulation < -2 e p<0,05.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-padrão	P	Fold Regulation
hsa_let_7i_5p	PRÉ-MENOPAUSA	1,5	0,67831	0,018	1,5
	PÓS-MENOPAUSA	3,3083	2,2934		3.30
hsa_miR_1	PRÉ-MENOPAUSA	0,156	0,11046	0,012	-6,41
	PÓS-MENOPAUSA	0,7526	0,74962		-1,33
hsa_miR_125b_1_3p	PRÉ-MENOPAUSA	0,3918	0,23619	0,033	-2,56
	PÓS-MENOPAUSA	0,842	0,88256		-1,19

c) Em relação à paridade:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: nuligestas e pacientes com, pelo menos, 01 parto a termo. Os miRNAs identificados estão listados abaixo (Tabela 10).

Tabela 10 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à paridade das pacientes. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold change	Desvio-padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_107	Nuligesta	11,3666	3,01287	0,013	11,36
	1 ou mais gestações	4,7004	4,47716		4,70
hsa_miR_129_5p	Nuligesta	1,0812	0,55435	0,025	1,08
	1 ou mais gestações	2,4349	2,22688		2,43
hsa_miR_186_5p	Nuligesta	3,1475	1,15476	0,02	3,14
	1 ou mais gestações	1,8931	0,81074		1,89
hsa_miR_21_5p	Nuligesta	7,571	1,4069	0,036	7,57
	1 ou mais gestações	4,6569	2,22604		4,65
hsa_miR_93_5p	Nuligesta	9,1291	4,75325	0,038	9,12
	1 ou mais gestações	4,73	3,20809		4,73

d) Em relação à amamentação:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: pacientes que amamentaram (sim) e pacientes que não amamentaram (não), sendo possível estabelecer diferença estatística em 6 miRNAs (Tabela 11).

Tabela 11 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao antecedente de amamentação das pacientes. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$, e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-padrão	P	Fold Regulation
hsa_let_7c_5p	Não	0,1745	0,12706	0,04	-5,88
	Sim	0,3995	0,39889		-2,56
hsa_let_7e_5p	Não	0,1999	0,2707	0,024	-5,26
	Sim	0,7077	0,74166		-1,42
hsa_miR_100_5p	Não	0,2416	0,1242	0,019	-4,16
	Sim	0,8976	1,32787		-1,12
hsa_miR_10a_5p	Não	0,2135	0,17482	0,036	-4,76
	Sim	0,9003	1,55431		-1,11
hsa_miR_200a_3p	Não	1,3612	1,52588	0,006	1,36
	Sim	5,025	3,28613		5,02
hsa_miR_429	Não	1,3073	1,58536	0,003	1,30
	Sim	5,6038	4,2928		5,60

- e) Em relação à idade no primeiro parto de gestação a termo:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: primeiro filho até os 25 anos e primeiro filho após os 25 anos, sendo identificados diferencialmente expressos: miR-145-5p e miR-328-3p (Tabela 12).

Tabela 12 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à idade no primeiro parto de gestação a termo. Em azul, houve hipoeexpressão, considerando *fold regulation* < -2 e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_145_5p	≤25anos	0,4564	0,32768	0,021	-2,22
	>25anos	0,1964	0,159		-5,26
hsa_miR_328_3p	≤25anos	0,6031	0,43827	0,045	-1,66
	>25anos	0,3171	0,17898		-3,22

- f) Em relação à história familiar:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário (em parentes de primeiro e segundo grau) e história familiar negativa. Apenas um miRNA apresentou diferença estatística na expressão entre os grupos: miR-155-5p (Tabela 13).

Tabela 13 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à história familiar para câncer de mama e/ou ovário. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando *fold regulation* >2 e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_155_5p	Positivo (mama/ovário)	3,6049	3,33686	0,016	3,60
	Negativo	6,763	4,96356		6,76

- g) Em relação à terapia hormonal:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: pacientes com antecedente de uso de terapia hormonal e pacientes sem história de terapia hormonal. Identificou-se 3 miRNAs diferencialmente expressos (Tabela 14).

Tabela 14 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à terapia hormonal. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < fold\ regulation < -2$ e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_let_7c_5p	Não	0,3189	0,33572	0,019	-3,14
	Sim	0,8517	0,52407		-1,17
hsa_miR_129_5p	Não	2,4614	2,21035	0,004	2,46
	Sim	0,8335	0,43558		-1,20
hsa_miR_7_5p	Não	9,1552	8,95318	0,016	9,15
	Sim	2,426	0,27051		2,42

h) Em relação ao tabagismo:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: tabagistas e não tabagistas. Não houve diferença significativa na expressão de microRNAs entre os grupos.

i) Em relação ao tamanho do componente invasivo do tumor:

A comparação de expressão foi feita entre três grupos, com grupo normal como controle, assim divididos: tumores até 2.0cm, tumores entre 2,1 a 5 cm e tumores com mais de 5.0cm. Identificou-se 7 miRNAs com diferença estatística entre 3 grupos (Tabela 15). O teste post-Hoc identificou onde se encontrava a diferença estatística entre estes grupos. Por exemplo, na análise da expressão do miR-10b-5p, houve diferença significativa na comparação entre tumores até 2,0 cm x tumores de 2,1 a 5 cm ($p=0,037$) e na comparação entre tumores até 2,0 cm x tumores > 5 cm ($p=0,046$) (Tabela 16).

Tabela 15 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao tamanho tumoral. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < fold\ regulation < -2$ e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold change	Desvio-padrão	P	Fold regulation
hsa_let_7g_5p	até 2 cm	3,1061	2,628	0,008	3,10
	2.1-5.0cm	0,9575	0,809		-1,11
	>5 cm	1,3663	0,854		1,36
hsa_miR_10b_5p	até 2 cm	1,178	1,554	0,032	1,17
	2.1-5.0cm	0,3567	0,269		-2,85
	>5 cm	0,2568	0,069		-3,89
hsa_miR_128_3p	até 2 cm	4,9886	5,605	0,045	4,98
	2.1-5.0cm	1,7203	1,349		1,72
	>5 cm	3,5022	2,535		3,50
hsa_miR_129_5p	até 2 cm	2,9578	2,303	0,018	2,95
	2.1-5.0cm	1,5008	1,558		1,50
	>5 cm	4,0165	2,571		4,01
hsa_miR_15a_5p	até 2 cm	5,6206	3,745	0,016	5,62
	2.1-5.0cm	2,0791	2,141		2,07
	>5 cm	4,8053	3,395		4,80
hsa_miR_15b_5p	até 2 cm	7,0512	5,442	0,014	7,05
	2.1-5.0cm	2,6722	1,541		2,67
	>5 cm	3,9826	2,987		3,98
hsa_miR_193b_3p	até 2 cm	3,6586	2,622	0,001	3,65
	2.1-5.0cm	1,789	1,188		1,78
	>5 cm	5,2875	3,098		5,28

Tabela 16 - Dados da expressão de microRNAs avaliados por grupos de idade em Teste Post-Hoc.

Teste Post-Hoc				
Tukey HSD				
Variável dependente	(I) Tamanho_Tumor	(J) Tamanho_Tumor	Diferença média (I-J)	P
hsa_let_7a_5p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	,93704*	0,036
		>5 CM	0,67913	0,248
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-,93704*	0,036
		>5 CM	-0,25791	0,692
	>5 CM	ATÉ 2 CM	-0,67913	0,248
		2.1-5.0CM	0,25791	0,692
hsa_let_7g_5p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	2,14866*	0,005
		>5 CM	1,73985	0,062
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-2,14866*	0,005
		>5 CM	-0,40881	0,742
	>5 CM	ATÉ 2 CM	-1,73985	0,062
		2.1-5.0CM	0,40881	0,742
hsa_miR_10b_5p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	,82138*	0,037
		>5 CM	,92125*	0,046
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-,82138*	0,037
		>5 CM	0,09987	0,931
	>5 CM	ATÉ 2 CM	-,92125*	0,046
		2.1-5.0CM	-0,09987	0,931
hsa_miR_128_3p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	3,26828	0,053
		>5 CM	1,48641	0,609
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-3,26828	0,053
		>5 CM	-1,78188	0,297
	>5 CM	ATÉ 2 CM	-1,48641	0,609
		2.1-5.0CM	1,78188	0,297
hsa_miR_129_5p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	1,45698	0,306
		>5 CM	-1,05867	0,623
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-1,45698	0,306
		>5 CM	-2,51565*	0,017
	>5 CM	ATÉ 2 CM	1,05867	0,623
		2.1-5.0CM	2,51565*	0,017
hsa_miR_15a_5p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	3,54151*	0,039
		>5 CM	0,81534	0,867
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-3,54151*	0,039
		>5 CM	-2,72617	0,078
	>5 CM	ATÉ 2 CM	-0,81534	0,867
		2.1-5.0CM	2,72617	0,078
hsa_miR_15b_5p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	4,37895*	0,011
		>5 CM	3,06856	0,16
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-4,37895*	0,011
		>5 CM	-1,31039	0,54
	>5 CM	ATÉ 2 CM	-3,06856	0,16
		2.1-5.0CM	1,31039	0,54
hsa_miR_193b_3p	ATÉ 2 CM	2.1-5.0CM	1,86955	0,165
		>5 CM	-1,62888	0,354
	2.1-5.0CM	ATÉ 2 CM	-1,86955	0,165
		>5 CM	-3,49843*	0,001
	>5 CM	ATÉ 2 CM	1,62888	0,354
		2.1-5.0CM	3,49843*	0,001

j) Em relação ao *status* linfonodal:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: linfonodos comprometidos (positivo) e linfonodos não comprometidos (negativo). Apenas o miR-340-5p apresentou

diferença significativa, estando mais expresso no grupo com linfonodos não comprometidos ($p=0,019$) (Tabela 17).

Tabela 17 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao *status* linfonodal. Em vermelho, houve hiperexpressão considerando *fold regulation* >2 e $p<0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_340_5p	Negativo	3,5249	2,4583	0,019	3,52
	Positivo	1,7918	0,8021		1,79

k) Em relação a presença de infiltrado inflamatório:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: infiltrado inflamatório presente e infiltrado inflamatório ausente (Tabela 18).

Tabela 18 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à presença de infiltrado inflamatório. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p<0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_let_7c_5p	Não	0,6866	0,47039	0,003	-1,45
	Sim	0,2411	0,25109		-4,15
hsa_let_7d_5p	Não	2,4878	1,25847	0,002	2,48
	Sim	0,911	1,00171		-1,09
hsa_let_7e_5p	Não	1,2348	0,98153	0,003	1,23
	Sim	0,3998	0,39398		-2,50
hsa_let_7g_5p	Não	2,8197	1,83925	0	2,81
	Sim	0,8141	0,66576		-1,23
hsa_let_7i_5p	Não	4,5875	2,84267	0,013	4,58
	Sim	2,2096	1,39201		1,39
hsa_miR_128_3p	Não	4,5297	3,91308	0,009	4,52
	Sim	1,8808	1,93358		1,88
hsa_miR_129_5p	Não	3,3336	2,01366	0,024	3,33
	Sim	1,8826	2,11106		1,88
hsa_miR_15a_5p	Não	6,2704	3,27372	0	6,27
	Sim	2,0368	1,93529		2,03
hsa_miR_15b_5p	Não	6,2697	4,25421	0,005	6,26
	Sim	2,6127	1,70818		2,61
hsa_miR_16_5p	Não	3,207	1,47293	0,049	3,20
	Sim	2,2224	1,09725		2,22

l) Em relação à presença de invasão linfática:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: invasão linfática presente (sim) e invasão linfática ausente (não). MiR-206 apresentou diferença estatística ($p=0,003$) (Tabela 19).

Tabela 19 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação a presença de invasão linfática. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando *fold regulation* >2 e $p<0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_206	Não	0,9145	0,77949	0,003	-1,09
	Sim	2,2595	1,15979		2,25

m) Em relação à presença de invasão perineural:

A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: invasão perineural presente (sim) e invasão perineural ausente (não). Os miRNAs descritos a seguir apresentaram diferença estatística (Tabela 20).

Tabela 20 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à presença de invasão perineural. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p<0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_let_7a_5p	Não	1,1395	0,80718	0,004	1,13
	Sim	0,3936	0,35412		-2,54
hsa_let_7b_5p	Não	0,9836	0,73955	0,008	-1,02
	Sim	0,3712	0,30005		-2,69
hsa_let_7c_5p	Não	0,4766	0,41676	0,008	-2,10
	Sim	0,1775	0,20654		-5,63
hsa_let_7e_5p	Não	0,805	0,82431	0,036	-1,24
	Sim	0,3462	0,31872		-2,89
hsa_miR_1	Não	0,7924	0,81333	0,02	-1,26
	Sim	0,3005	0,25304		-3,33
hsa_miR_125b_1_3p	Não	0,9671	0,92297	0,023	-1,03
	Sim	0,3281	0,16251		-3,05
hsa_miR_15a_5p	Não	4,2034	3,23966	0,006	4,20
	Sim	1,5614	1,72963		1,56

- n) Em relação à presença de componente intraductal associado:
A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: componente intraducto presente (sim) e componente intraducto ausente (não). MiR-1, miR-145-5p, miR181b-5p, miR181d-5p apresentaram diferença na expressão entre grupos (Tabela 21).

Tabela 21 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação à presença de componente intraductal associado. Em vermelho, houve hiperexpressão e, em azul, hipoeexpressão, considerando $+2 < \text{fold regulation} < -2$ e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_1	Não	0,2562	0,25206	0,015	-3,90
	Sim	0,8791	0,81295		-1,13
hsa_miR_145_5p	Não	0,2118	0,15274	0,012	-4,72
	Sim	0,4332	0,29838		-2,30
hsa_miR_181b_5p	Não	2,3438	1,60187	0,042	2,34
	Sim	4,3643	3,12716		4,36
hsa_miR_181d_5p	Não	1,9433	1,31844	0,026	1,94
	Sim	3,9841	2,91245		3,98

- o) Em relação ao estadiamento:
A comparação de expressão foi feita entre dois grupos, assim divididos: pacientes em estágio I e IIA; pacientes em estágio IIB ou maior. MiR-18a-5p teve expressão aumentada no grupo com estágio mais avançado em comparação com estágios mais iniciais ($p=0,048$) (Tabela 22).

Tabela 22 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao estadiamento. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando $\text{fold regulation} > 2$ e $p < 0,05$.

microRNA	GRUPOS	Fold Change	Desvio-Padrão	P	Fold Regulation
hsa_miR_18a_5p	Estádio I/IIA	9,4052	5,31716	0,048	9,40
	Estádio $\geq$ IIB	16,8617	13,7713		16,86

- p) Em relação aos índices de KI-67 na avaliação imunoistoquímica:
Dividimos as amostras tumorais de acordo com os índices de KI-67, em três grupos, assim distribuídos: G1 com índices de KI-67 até 30%; G2 com índices de KI-67 maiores que 30% até 50%; G3

com índices de KI-67 $\geq 60\%$. Identificou-se maior hiperexpressão quanto mais alto o índice de proliferação nos miRNAs abaixo descritos (Tabela 23).

Tabela 23 - MicroRNAs com expressão aberrante em relação ao índice de KI-67 imunoistoquímico. Em vermelho, houve hiperexpressão, considerando *fold regulation* >2 e $p < 0,05$.

microRNAs	G1 (KI-67 $\leq 30\%$)	G2 (30% < KI-67 $\leq 50\%$)	G3 (KI-67 $\geq 60\%$)
	Fold regulation / P	Fold regulation / P	Fold regulation / P
miR-96-5p	6,9762 (P = 0,000845)	8,4045 (P = 0,000169)	11,5688 (P=0,000006)
miR-7-5p	3,2376 (P = 0,015447)	5,0095 (P = 0,002744)	16,1619 (P = 0,000322)
miR-210-3p	7,9075 (P = 0,000016)	12,6969 (P = 0,000092)	15,3717 (P = 0,000204)
miR-18a-5p	2,693 (P = 0,041704)	9,9351 (P = 0,011856)	16,6813 (P = 0,000000)

- q) Em relação à sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica:

Para a análise de sobrevida, os valores de *fold change* foram categorizados da seguinte forma: categoria 0, valores menores que 0,5; categoria 1 – valores entre 0,5 e 1,99; categoria 2 – valores maiores que 2. Na sobrevida livre de doença, identificou-se miR-199a-5p e miR-223-3p com diferença estatística entre as categorias (Tabela 24).

Sobrevida livre de doença (SLD):

Tabela 24 - Dados para análise de sobrevida livre de doença (Qui²: Qui quadrado; P: significância).

microRNAs	Categorias			Comparações globais	
	0	1	2		
	Número de eventos			Qui ²	P
miR-199a-5p	2	0	1	9,923	0,007
miR-223-3p	0	2	1	8,340	0,015

No Gráfico 5, observamos a análise de sobrevida livre de doença tomando como parâmetro o miRNA-199a-5p.

Gráfico 5 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência livre de doença (SLD) para os diferentes níveis de miR-199a-5p.

No Gráfico 6, observamos a análise de sobrevida livre de doença tomando como parâmetro o miRNA-223-3p.

Gráfico 6 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência livre de doença (SLD) para os diferentes níveis de miR-223-3p

Sobrevida câncer específica:

Em relação a sobrevida câncer específica identicaram-se quatro miRNAs com diferença estatística na análise entre categorias: miR-199a-5p, miR-199b-3p, miR-152-3p e miR125b-1-3p (Tabela 25).

Tabela 25 - Dados para análise de sobrevida câncer específica (Qui²: Qui quadrado; P: significância).

	Categorias				
	0	1	2		
	Número de eventos				
microRNAs				Qui ²	P
miR-199a-5p	2	1	0	14,714	0,001
miR-199b-3p	2	1	0	6,374	0,041
miR-152-3p	2	0	1	8,712	0,013
miR-125b-1-3p	2	0	1	6,627	0,036

No Gráfico 7, observamos a análise de sobrevida câncer específica tomando como parâmetro o miRNA-199a-5p.

Gráfico 7 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica (SCE) para os diferentes níveis de miR-199a-5p

No Gráfico 8, observamos a análise de sobrevida câncer específica tomando como parâmetro o miRNA-199b-3p.

Gráfico 8 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica (SCE) para os diferentes níveis de miR-199b-3p

No Gráfico 9, observamos a análise de sobrevida câncer específica tomando como parâmetro o miRNA-152-3p.

Gráfico 9 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica (SCE) para os diferentes níveis de miR-152-3p

No Gráfico 10, observamos a análise de sobrevida câncer específica tomando como parâmetro o miRNA-125b-1-3p.

Gráfico 10 - Teste de igualdade de distribuições de sobrevivência câncer específica para os diferentes níveis de miR-125b-1-3p

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A análise comparativa dos 31 casos de carcinoma ductal invasor triplo negativo com os 18 casos de parênquima mamário normal define microRNAs hiperexpressos em maior magnitude (*fold-regulation* > 4), sendo eles: miR-96-5p (*fold-regulation* = 9,6873, $p = 0,000008$), miR-21-5p (*fold-regulation* = 4,4771, $p = 0,00000$), miR-7-5p (*fold-regulation* = 5,897, $p = 0,00137$), miR-182-5p (*fold-regulation* = 7,9218, $p = 0,000001$), miR-210-3p (*fold regulation* = 11,8336, $p = 0,000048$), miR-18a-5p (*fold regulation* = 9,5167, $p = 0,000034$), miR-155-5p (*fold regulation* = 4,401, $p = 0,00019$) e miR-93-5p (*fold regulation* = 4,1527, $p = 0,000023$).

Aponta, ainda, microRNAs com hipoexpressão (*fold regulation* < -4) no tecido tumoral quando comparados ao tecido normal, a saber: miR-204-5p (*fold-regulation* = -10,2676, $p = 0,000000$), miR-205-5p (*fold-regulation* = -4,0747, $p = 0,019822$), miR-125b-5p (*fold-regulation* = -4,295, $p=0,000000$) e let 7c-5p (*fold-regulation* = -4,9155, $p=0,000000$).

5.1 miR-96-5p e miR-182-5p

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 9,6873, $p = 0,000008$. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores em linhagens celulares de câncer de mama (Gutilla IK, 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 se comparados com tecidos e células epiteliais normais de mama. A expressão ectópica de miR-96 induziu a

proliferação e o crescimento ancoragem-independente de células de câncer de mama, enquanto a inibição de miR-96 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 um 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 H, 2010).

Nossos dados de hiperexpressão de miR 182-5p (*fold-regulation* = 7,9218, $p = 0,000001$) corroboram os resultados apontados por Krishnan K *et al.*, evidenciando sua hiperexpressão em diversas amostras de câncer de mama humano e apontando seu potencial papel oncogênico (Krishnan K, 2013). Krishnan *et al.* 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 microRNA-182 (miR-182) está hiperexpresso no câncer de mama triplo-negativo (TNBC) promovendo a proliferação e invasão por meio da regulação negativa da PFN1 (profilina 1). A profilina parece exercer um papel de proteína supressora tumoral, pois mostra-se hipoexpressa em células metastáticas e, quando hiperexpressa, reduz capacidades tumorais destas células (Liu *et al.*, 2013).

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 and 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 identificou hipoexpressão do mRNA de FOXO1 em amostras de câncer de mama comparadas com tecido mamário normal. Identificou-se um novo mecanismo de regulação FOXO1 por meio da hiperexpressão de miR-27a, miR-96 e miR-182. Sugeriu, também, que o FOXO 1, como alvo de microRNA, pode contribuir para a manutenção de um estado oncogênico nas células de câncer de mama. (Gutilla IK, 2009).

5.1.1 miR-7-5p

O miR-7-5p, apesar de hiperexpresso em nossa casuística de carcinomas mamários ductais invasivos (*fold-regulation* = 5,897, *p* = 0,0137), 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, 2013).

5.1.2 miR-21-5p

Encontramos hiperexpressão do miR-21-5p (*fold-regulation* = 4,4771, $p = 0,00000$), 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 J, 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 J, 2012).

5.1.3 MIR 93-5p

O miR-93 deriva de um paralogo (miR-106b-25) do cluster miR-17-92 e está hiperexpresso em diversos tipos tumorais (Du *et al.*; Kim *et al.*, 2009).

Os alvos já identificados do miR-93 incluem LATS2 (Fang *et al.*, 2012), AICDA (Borchert *et al.*, 2011), ITGB8 (Fang *et al.*, 2011), PTEN (Fu *et al.*, 2012), VEGFA (Long *et al.*, 2010), TP53INP1 (Yeung *et al.*, 2008), DAB2 (Du *et al.*, 2013), dentre outros, sugerindo um papel oncogênico.

O miR-93 suprime o TGF β R2 favorecendo o crescimento celular e a metástase em carcinoma nasofaríngeo (Lyu *et al.*, 2014).

Deng *et al.* avaliaram a expressão de miR-93 em 101 amostras de tecido fixado em formol e parafinado (FFPE) de câncer da mama e em 40 controles, utilizando RT-PCR. O miR-93 foi significativamente hiperexpresso em tumores na comparação com os controles ($p < 0,01$). MiR-93 exibiu grande capacidade de discriminar entre amostras tumorais e controles sem câncer (Deng *et al.*, 2014).

Em nossas amostras, o Mir-93-5p mostrou-se hiperexpresso (fold regulation = 4,1527, $p = 0,000023$) sugerindo a existência de um papel do mesmo na carcinogênese de tumores mamários triplo negativos.

5.1.4 Mir 210-3p

Encontramos hiperexpressão do miR-210-3p (*fold regulation* = 11,8336, $p = 0,000048$) no tecido tumoral da nossa casuística.

O miR-210 é descrito como oncogênico e está associado com pior prognóstico mesmo nos casos iniciais de câncer de mama. Apresenta, em relação ao nível de sua expressão, uma correlação inversamente proporcional com a sobrevida global e livre de doença em 10 anos (Camps *et al.*, 2008).

Li *et al.* mostraram que a expressão de microRNA-210 é um preditor significativo de sobrevida global (OS), sobrevida livre de doença (MFS/DRFS) e da sobrevida específica por câncer, nos cânceres em geral. No câncer de mama, especialmente, a maior expressão de miR-210 correlaciona-se com pior sobrevida global e livre de doença (Li *et al.*, 2014).

O miR-210 é induzido por hipoxia em linhagens celulares tumorais, como mama, cabeça e pescoço e pulmão (Huang *et al.*, 2007). Essa relação com a hipoxia, que é um mecanismo de resistência terapêutica, pode ser a causa parcial do pior prognóstico associado à expressão deste microRNA. O miR-210 regula diretamente o fator de hipoxia induzida 1-a (HIF-1a) na sua transcrição (Huang *et al.*, 2009).

5.1.5 Mir-155-5p

Song *et al.* observaram hiperexpressão do miR 155, quantificadas por real time PCR, em tecido mamário tumoral quando comparado ao tecido normal em 88 amostras (FFPE). A hiperexpressão do miR-155 foi observada

em casos com metástase linfonodal, em tumores T3 e T4, em estádios avançados, HER-2 positivo e na invasão vascular (Song *et al.*, 2012).

Em relação à sobrevida global (HR:2.057; 95% CI: 1.392-3.039) e sobrevida livre de doença (HR:1.918; 95% CI: 1.311-2.806), a hiperexpressão do miR-155 pode predizer significativamente um pior desfecho (He *et al.*, 2013).

Em nossas amostras tumorais, em comparação com amostras não tumorais, houve hiperexpressão do miR-155-5p (*fold regulation* = 4,401, $p = 0,00019$).

5.1.6 miR-18a-5p

O miR 18-a encontra-se hiperexpresso em tumores de mama basal-símile nos quais os níveis de PTEN e HOXA9 estão reduzidos. Este microRNA atua sobre a HOXA9 (homeobox A9), reduzindo, dessa forma, o nível do supressor tumoral PTEN (Mouw *et al.*, 2014). Também já foi descrita associação da hiperexpressão de miR18a/b com alta proliferatividade, negatividade de receptor estrogênico e positividade para citoqueratinas 5/6, demonstrando forte associação com características de tumores mamários basal-símile (Jonsdottir *et al.*, 2012).

A hiperexpressão do miR-18a já foi associada, também, ao aumento de proliferação celular em hepatoma (Liu *et al.*, 2009).

Em nossa casuística, foi observado padrão de hiperexpressão do miR-18a-5p (*fold regulation* = 9,5167, $p = 0,000034$) nos tecidos mamários tumorais.

5.1.7 miR 125b-5p

Zhou *et al.* (2010) mostraram que a hiper-regulação do mir 125b, 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* = -4,295, $p=0,000000$).

5.1.8 miR 205-5p

O miR-205-5p, hipoexpresso em nossa casuística tumoral (*Fold-regulation* = -4,0747, $p = 0,019822$), vem sendo considerado um microRNA supressor tumoral. Esta função parece ser parcialmente exercida por meio da regulação de E2F1, envolvido na progressão do ciclo celular e de LAMC1, componente da matriz extracelular envolvido na adesão, proliferação e migração celular. Foi demonstrada a transativação direta de miR-205 pelo p53, sendo sua reexpressão realizada *in vitro* e *in vivo*. (Piovan, 2012; Mahamodhossen, 2013).

5.1.9 miR 204-5p

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 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, 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, 2012).

Em nossa casuística, houve hipoexpressão do miR-204-5p (FR:-10,2676; P=0,00000), em concordância com a literatura.

5.1.10 Let-7c-5p

A família let-7, que é supressora tumoral, encontra-se, frequentemente, hipoexpressa em vários tipos de cânceres humanos e sua hipoexpressão no câncer de mama pode estar regulada pela ação da LIN28, que é uma proteína de ligação ao RNA, que inibe o processamento do precursor do let-7. Sakurai *et al.* demonstraram que a expressão de let-7a, let-7c, let-7d e let-7f é inversamente proporcional aos níveis de LIN28 (Sakurai *et al.*, 2012).

Em nossa casuística, o Let-7c-5p mostrou-se hipoexpresso no tecido tumoral (fold regulation: -4,9155; P=0,00000), em concordância com a literatura.

No clustergrama da magnitude de expressão de microRNAs (FIGURA 9), observamos a tradução gráfica do nível de expressão para, mais ou para menos, de cada um dos microRNAs estudados em cada amostra tumoral e não tumoral incluída. Notamos uma tendência a que se dividam as amostras tumorais e não tumorais quanto à expressão dos microRNAs.

Analisando a categorização supervisionada da figura 10, observamos que 20 dos 84 microRNAs diferencialmente expressos parecem ser capazes de dividir as amostras de tecido tumoral em relação às amostras não tumorais. Dentre estes 19 microRNAs, apenas o let-7a-5p (fold regulation:-2,33; 95%IC: 0.09-0.77; P=0,08) e o miR-200c-3p (fold regulation:2,13; 95%IC: 1.52-2.74; P=0,09), embora superassem o *fold regulation* de 2, não atingiram significância estatística. Estes miRNAs estão, provavelmente, relacionados na regulação de genes que conduzem a carcinogênese mamária.

As diferenças de expressão baseadas no *fold regulation*, que representa a tradução biológica do *fold change*, podem ser vistas no Gráfico 1, assim como os normalizadores utilizados na análise (em preto).

Analisando o gráfico 2, observamos as diferenças do *fold change* entre os microRNAs expressos cujo *fold regulation* mostrou-se maior que 4, seja na hiperexpressão, seja na hipoexpressão. Nota-se que alguns microRNAs têm um nível de expressão bastante elevado, como o miR-210-3p e o miR-18a-5p, na hiperexpressão, e como o miR-204-5p e o let7c-5p, na hipoexpressão. Observamos que o *fold change* no grupo-controle sempre será igual a 1, pois o *fold change* é calculado com base na diferença de médias de Ct dos microRNAs entre o grupo-estudo e o controle, sendo, portanto, o $\Delta\Delta C(t)$ igual a 0 e o fold change ($2^{(-\Delta\Delta C(t))}$) igual a 1.

Foram também analisadas, quanto à expressão de microRNAs, as informações referentes à idade, à paridade, ao *status* menopausal, à idade ao primeiro parto de gestação a termo, à amamentação, à história familiar, ao tabagismo, ao tamanho do tumor (T), ao estadiamento, ao acometimento linfonodal, à terapia hormonal, à invasão linfática, a infiltrado inflamatório, à invasão perineural, à presença de componente intraductal e a índices de KI-67.

Das 31 pacientes que tiveram suas amostras de tumor avaliadas quanto à expressão de microRNAs, conseguimos obter 18 amostras de tecido não tumoral que foram utilizadas como grupo-controle. A presença de tecido gorduroso em abundância nas amostras não tumorais e a baixa representatividade do parênquima mamário, em lâminas e blocos não tumorais dos casos avaliados, reduziu a eficácia de extração e a qualidade do RNA extraído das amostras não tumorais. Desta forma, obtivemos 18 amostras (em 39 utilizadas) de tecido não tumoral que obtiveram sucesso na avaliação da expressão de microRNA por RT-PCR.

5.2 Expressão de microRNAs e idade das pacientes

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs nas amostras tumorais levando em consideração a idade das pacientes, observamos que ocorreu maior expressão, com *fold regulation* maior que 4, do miR-129-5p nas pacientes com 40 anos ou menos (*fold regulation*: 6,19; $P=0,019$) quando comparadas à expressão das pacientes com idade entre 40 e 60 anos (*fold regulation*: 2,42; $P=0,019$) e as com mais de 60 anos (*fold regulation*: 1,84; $P=0,019$). Houve maior expressão do miR 203 nas pacientes entre 40 e 60 anos (*fold regulation*: 7,49 e $P=0,014$) do que nas com 40 anos ou menos (*fold regulation*: 4,34; $P=0,014$) e nas pacientes com mais de 60 anos (*fold regulation*: 2,58 e $P=0,014$);

Houve, também, hiperexpressão do miR-7-5p nas pacientes com 40 anos ou menos (*fold regulation*: 21,88; $P=0,017$) quando comparadas à expressão das pacientes com idade entre 40 e 60 anos (*fold regulation*: 11,17; $P=0,017$) e as com mais de 60 anos (*fold regulation*: 5,69; $P=0,017$).

Ocorreu hipoeexpressão, com *fold regulation* menor que -4, do miR 26b-5p, nas pacientes com 40 anos ou menos (*fold regulation*: -7,14; $P=0,038$).

A avaliação da presença de associação entre grupos, mediante utilização do teste Post-Hoc de Tukey, demonstrou ocorrência de associação significativa na diferença de expressão dos microRNAs 129-5p ($P=0,014$) e 7-5p ($P=0,025$) entre o grupo de pacientes com menos de 40 anos e o grupo com mais de 60 anos. Esses dois grupos de pacientes apresentam, em geral, evoluções clínicas diferentes com pior prognóstico para as pacientes mais jovens.

A hipoeexpressão do microRNA 129 foi descrita em diversos tumores como, por exemplo, o câncer gástrico (Yu *et al.*, 2013), câncer de tireoide (Brest *et al.*, 2011), carcinoma hepatocelular (Liu *et al.*, 2012) e câncer de mama (Wang *et al.*, 2012). Trata-se de um microRNA com atividade antitumoral que tem, entre seus alvos, a ciclina dependente de quinase-6, que é uma proteína do ciclo celular envolvida na transição da fase G1 para S (Yu *et al.*, 2013).

Duan *et al.* (2014) descreveram o miR 129 com função supressora tumoral e indutora de apoptose, e a migração celular por meio da redução dos níveis do AKT fosforilado (Duan *et al.*, 2014). Por outro lado, no carcinoma de células escamosas da laringe, por exemplo, o miR 129-5p encontra-se hiperexpresso. Essa hiperexpressão correlaciona-se com doença avançada. (Li *et al.*, 2013).

O miR 203 apresenta atividade supressora tumoral. Sua hipoexpressão já foi descrita em rabdomiosarcoma (Diao *et al.*, 2014), melanoma (Kozubek *et al.*, 2013) e câncer de esôfago (Zhang *et al.*, 2014). Exerce sua ação por meio da supressão da via de PLD2 (fosfolipase D2), da caveolina 1, do fator inibidor de leucemia, da PKC α (*protein kinase C alpha*), dentre outras (Chen *et al.*; Diao *et al.*; Miao *et al.*, 2014).

Por outro lado, nas neoplasias epiteliais malignas do ovário, a hiperexpressão do miR 203 está associada a maior recorrência, acometimento linfonodal, menor sobrevida global e sobrevida livre de doença (Wang *et al.*, 2013). No câncer de mama, Zhang *et al.* descreveram hiperexpressão do miR 203 em tumores primários e em algumas linhagens celulares não metastáticas, e hipoexpressão em linhagens celulares metastáticas (Zhang *et al.*, 2011).

O miR 26b mostrou-se, em estudo de Zhao *et al.*, hipoexpresso em casos de câncer de mama, facilitando as capacidades de migração e invasão celular (Verghese *et al.*, 2013). A família do miR 26 mostrou-se, frequentemente, hipoexpressa no carcinoma hepatocelular, principalmente nas pacientes com pior sobrevida, inibindo vias como a NF- κ B (Zhao *et al.*, 2014).

5.3 Expressão de microRNAs e *status* menopausal

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando $+4 < \text{fold regulation} < -4$, nas amostras tumorais levando em consideração o *status* menopausal das pacientes no momento do

diagnóstico, observamos que ocorreu hipoeexpressão do miR 1 (*fold regulation*: -6,41; $P=0,012$) no grupo de pacientes em pré-menopausa.

O miR-1 é um supressor tumoral regulado negativamente pela via de sinalização do NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) em câncer pulmonar. O aumento da expressão de genes dependentes de NRF2 está associada a pior prognóstico (Singh *et al.*, 2013).

5.4 Expressão de microRNAs e paridade

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, nas amostras tumorais levando em consideração a paridade das pacientes, observamos que ocorreu maior expressão do miR 107 no grupo de pacientes nuligestas (*fold regulation*: 11,36; $P=0,013$) do que no grupo com, pelo menos, um parto a termo (*fold regulation*: 4,70; $P=0,013$).

O miR 21-5p mostrou maior expressão no grupo de pacientes nuligestas (*fold regulation*: 7,57; $P=0,036$) do que no grupo com, pelo menos, um parto a termo (*fold regulation*: 4,65; $P=0,036$). Da mesma forma, o miR 93-5p mostrou maior expressão no grupo de pacientes nuligestas (*fold regulation*: 9,12; $P=0,038$) do que no grupo com, pelo menos, um parto a termo (*fold regulation*: 4,73; $P=0,038$).

Li *et al.* demonstraram uma expressão reduzida no microRNA 107 em amostras de câncer de mama quando comparadas ao tecido normal adjacente e sua hiperexpressão levou à inibição da via CDK8 (Li *et al.*, 2014).

Hiperexpressão do miR-107 foi descrita no câncer gástrico, causando regulação negativa da via FOXO1 (Li *et al.*, 2014).

A hiperexpressão do miR 21-5p e miR 93-5p, já comentadas, está presente em diversos subtipos tumorais.

5.5 Expressão de microRNAs e amamentação

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, nas amostras tumorais levando em consideração o antecedente de ter ou não ter amamentado, observamos que ocorreu hipoexpressão, no grupo que nunca havia amamentado, do let-7c-5p (*fold regulation*: -5,88; $P=0,04$), do let-7e-5p (*fold regulation*: -5,26; $P=0,024$), do miR-100-5p (*fold regulation*: -4,16; $P=0,019$) e do miR 10a-5p (*fold regulation*: -4,76 ; $P=0,036$). Observou-se hiperexpressão, no grupo que havia amamentado, do miR 200a-3p (*fold regulation*: 5,02; $P=0,006$) e do miR 429 (*fold regulation*: 5,60; $P=0,003$).

Cai *et al.* descreveram expressão reduzida do microRNA let 7e na neoplasia maligna epitelial de ovário (Cai *et al.*, 2013).

O microRNA 100 tem papel de regulação negativa da motilidade e capacidade de invasão em células tumorais mamárias. Encontra-se, geralmente, hipoexpresso no câncer de mama como consequência da hipermetilação do gene MIR100HG. Tem como alvo a HOXA1, que é oncogênico e pró-invasivo, levando, também, à repressão de outros alvos oncogênicos consecutivos ao HOXA1 (Chen *et al.*, 2014).

O microRNA 10a é um supressor tumoral cuja hipoexpressão já foi descrita em câncer gástrico (Jia *et al.*, 2014) e em tumores mamários com recorrência precoce (Pérez-Rivas *et al.*, 2014). Sua ação parece estar relacionada à ação direta sobre HOXA1 (Jia *et al.*, 2014).

O microRNA 200a tem papel oncogênico no adenocarcinoma endometrial. Ele afeta a proliferação e apoptose regulando o supressor tumoral PTEN (Li *et al.*, 2014).

Roy *et al.* demonstraram que o PELP1 (*proline, glutamic acid and leucine rich protein 1*), que está hiperexpresso durante o processo de metastatização do câncer de mama, age sobre o miR200a, que apresenta função supressora de metástase em câncer de mama (Roy *et al.*, 2013).

O microRNA 429 já foi descrito como hipoexpresso no carcinoma colorretal (Sun *et al.*, 2014), no osteossarcoma (Liu *et al.*, 2014), no câncer

gástrico e no câncer de mama (Uhlmann *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011). Sua função supressora decorre da ação sobre c-myc e PLGG1. Sua hipoexpressão está associada ao pior prognóstico do câncer colorretal.

5.6 Expressão de microRNAs e idade ao primeiro parto a termo

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando *fold regulation* < -4, nas amostras tumorais levando em consideração a idade no primeiro parto a termo, observamos que houve hipoexpressão, no grupo com mais de 25 anos de idade, do miR-145-5p (*fold regulation*: -5,26; P=0,021).

O microRNA 145 tem função inibitória na angiogênese tumoral, no crescimento celular e na capacidade de invasão por meio da ação sobre seus alvos N-RAS e VEGF-A (Zou *et al.*, 2012).

Kim *et al.* analisaram tecido tumoral maligno mamário e descreveram uma correlação inversa entre o miR 145 e seus genes-alvo, como fascin-1, SMAD2/3 e IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) (Kim *et al.*, 2011).

5.7 Expressão de microRNAs e história familiar de câncer de mama e/ou ovário

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando o *fold regulation* maior que 4, nas amostras tumorais levando em consideração a história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário, observamos que houve hiperexpressão do miR-155-5p (*fold regulation*: 6,76; P=0,016) no grupo sem história familiar.

Conforme descrito previamente, a hiperexpressão do miR 155 está associada a pior prognóstico, a metástase linfonodal, a tumores T3 e T4, estádios avançados, HER-2 positivo e a invasão vascular (Song *et al.*, 2012).

5.8 Expressão de microRNAs e terapia hormonal

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando o *fold regulation* maior que 4, nas amostras tumorais levando em consideração o antecedente de uso de terapia hormonal, observamos que o miR-7-5p mostra-se hiperexpresso no grupo que não fez uso de terapia hormonal (*fold regulation*: 9.15; $P=0,016$).

Conforme já mencionado, o miR-7-5p, apesar de hiperexpresso em nossa casuística de carcinomas mamários ductais invasivos (*fold-regulation* = 5,897, $p = 0,0137$), 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, 2013).

5.9 Expressão de microRNAs e tabagismo

Não houve diferença significativa na expressão de microRNAs entre o grupo de pacientes fumantes e não fumantes, traduzindo uma provável ausência de influência do tabagismo no desenvolvimento de expressões aberrantes de microRNAs associadas à carcinogênese mamária, nas amostras estudadas.

5.10 Expressão de microRNAs e tamanho tumoral

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando o *fold regulation* maior que 4, nas amostras tumorais levando em consideração o tamanho do tumor (T), observamos que ocorreu hiperexpressão do miR-128-3p (no $T \leq 2\text{cm}$), do miR-129-5p (no $T > 5\text{cm}$),

do miR-15a-5p (no $T \leq 2\text{cm}$ e no $>5\text{cm}$), do miR-15b-5p (no $T \leq 2\text{cm}$) e do miR-193-3p (no $T > 5\text{cm}$).

Mostrou associação significativa da diferença de expressão dos microRNAs 129-5p e 193-3p entre o grupo de tumores com 2,1 a 5cm e o grupo com mais de 5 cm.

5.11 Expressão de microRNAs e *status* linfonodal

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando o *fold regulation* maior que 2, nas amostras tumorais levando em consideração o *status* linfonodal, observamos que houve hiperexpressão do miR-340-5p no grupo sem comprometimento linfonodal (*fold regulation*: 3,52; $P=0,019$), enquanto que, no grupo com comprometimento linfonodal, houve menor expressão, com *fold regulation* de 1,79 ($P=0,019$). Não houve hipoexpressão nem hiperexpressão considerando $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, entre os microRNAs avaliados.

O microRNA 340 tem um papel supressor tumoral. Wu *et al.* demonstraram que a expressão do miR-340 era significativamente menor em tumores mamários com metástase linfonodal. A perda da expressão do miR 340 associa-se à metástase linfonodal, alto grau histológico, estágio clínico avançado e pior sobrevida global (Wu *et al.*, 2011).

5.12 Expressão de microRNAs e infiltrado inflamatório

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, nas amostras tumorais levando em consideração a presença ou não de infiltrado inflamatório, observamos que houve hiperexpressão, no grupo com infiltrado inflamatório ausente, do let-7i-5p (*fold regulation*: 4,58; $P= 0,013$), do miR-128-3p (*fold regulation*: 4,52;

P=0,009), do miR-15a-5p (*fold regulation*: 6,27; P=0,000) e do miR 15b-5p (*fold regulation*: 6,26; P: 0,005).

Houve hipoexpressão do let-7c-5p (*fold regulation*: -4,15; P=0,003) no grupo que apresenta infiltrado inflamatório associado.

O let 7i tem função supressora tumoral e a sua hipoexpressão, que pode ocorrer por uma mutação de p53, está associada a aumento do potencial de migração, invasão e metástase celular em câncer de mama (Subramanian *et al.*, 2014).

Zhao *et al.* descreveram que a expressão do microRNA let 7i era inversamente proporcional aos níveis de receptor de estrogênio alfa (Zhao *et al.*, 2011).

Zhu *et al.* (2011) mostraram que a menor expressão do miR 128 em amostras de câncer de mama estava associada à ocorrência de quimiorresistência e pior sobrevida das pacientes (Zhu *et al.*, 2011).

Por outro lado, Ji *et al.* (2013) descreveram que o microRNA 128 encontra-se mais expresso em espécimes de câncer de mama resistentes a drogas do que em amostras de tecido tumoral sensíveis (Ji *et al.*, 2013).

Luo *et al.* (2013) demonstraram expressão reduzida de miR 15a em amostras de câncer de mama quando comparadas a tecido normal. A hiperexpressão do miR 15a inibe o crescimento celular, suprime a migração e o arrest celular na fase G1, mas não promove a apoptose. O mir 15a pode funcionar como supressor tumoral em câncer de mama (Luo *et al.*, 2013).

Liu *et al.* (2014) descreveram que o Smurf2, um membro da família HECT de ligases da ubiquitina, que tem um papel supressor tumoral, encontra-se suprimido quando da hiperexpressão de miR 15a, miR 15b, miR 16 e miR 128 em linhagens celulares triplo negativas de câncer de mama (Liu *et al.*, 2014).

5.13 Expressão de microRNAs e invasão linfática

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando o *fold regulation* maior que 2, nas amostras tumorais levando

em consideração a presença ou não de invasão linfática, observamos que ocorreu hiperexpressão do miR-206 (FR: 2,25; P=0,003) no grupo que mostrava invasão linfática. Nesta avaliação, não consideramos $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, pois não houve hiper ou hipoexpressão de microRNAs que atingisse este corte.

A hipoexpressão do microRNA 206 mostrou-se significativamente associada a estádios clínicos mais avançados e a comprometimento linfonodal no câncer de mama. Li *et al.* (2013) mostraram que a hipoexpressão do miR 206 é um fator prognóstico desfavorável no que se refere à sobrevida global no câncer de mama (Li *et al.*, 2013).

O miR 206 funciona como um supressor tumoral no melanoma, agindo nas vias Ciclina D1 e CDK4 (Georgantas *et al.*, 2014).

5.14 Expressão de microRNAs e invasão perineural

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, nas amostras tumorais levando em consideração a presença ou não de invasão perineural, observamos que o miR 15a-5p encontra-se hiperexpresso no grupo sem invasão perineural identificada (*fold regulation*: 4,20; P=0,006, enquanto o let-7c-5p encontra-se hipoexpresso no grupo com presença de infiltração perineural (*fold regulation*: -5,63; P=0,008).

5.15 Expressão de microRNAs e componente intraductal

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando $+4 < \textit{fold regulation} < -4$, nas amostras tumorais levando em consideração a presença ou não de componente intraductal associado, observamos que o miR-145-5p encontra-se hipoexpresso (*fold regulation*: -4,72; P=0,012) no grupo livre de componente de carcinoma intraductal

associado, enquanto o miR-181b-5p encontra-se hiperexpresso (*fold regulation*: 4,36; $P=0,042$) nas amostras com carcinoma intraductal associado.

O miR 181b já mostrou-se hiperexpresso no câncer de pâncreas (Panarelli *et al.*, 2012), cabeça e pescoço (Nurul-Syakima *et al.*, 2011), e bexiga (Ratert N *et al.*, 2012). Por outro lado, sua hipoexpressão foi descrita em câncer gástrico (Li *et al.*, 2011) e de próstata (Schaefer *et al.*, 2010).

No câncer de mama, o HMGA1 (*High-mobility group AT-hook 1*) modula a expressão do miR 181b por meio de ativação transcricional direta. O HMGA1 está, frequentemente, ativado em diversos tumores malignos, inclusive no câncer de mama (Calin, Croce, 2006; Liu *et al.*, 2014).

O microRNA 145, conforme já discutido previamente, demonstra uma função inibitória na angiogênese tumoral, no crescimento celular e na capacidade de invasão por meio da ação sobre seus alvos N-RAS e VEGF-A. (Zou *et al.*, 2012).

5.16 Expressão de microRNAs e estadiamento

Quando comparamos o perfil de expressão de microRNAs, considerando o *fold regulation* maior que 4, nas amostras tumorais levando em consideração os estádios clínicos I e IIa *versus* o estágio clínico IIb ou maior, observamos que o microRNA 18a-5p encontra-se fortemente hiperexpresso nos dois grupos. Entretanto, enquanto o *fold regulation* nos estádios I e IIa foi de 9,40 (ou seja, hiperexpresso 9,40 vezes a mais que o controle), nos estádios IIb ou maior, o *fold regulation* foi de 16,86 ($P=0,048$).

Conforme descrito anteriormente, o miR-18-a encontra-se hiperexpresso em tumores de mama basal-símile, reduzindo o nível do supressor tumoral PTEN (Mouw *et al.*, 2014). Também já foi descrita associação da hiperexpressão de miR18a/b com alta proliferatividade, negatividade de receptor estrogênico e positividade para citoqueratinas 5/6,

demonstrando forte associação com características de tumores mamários basal-símile (Jonsdottir *et al.*, 2012).

Acreditamos que o aumento da expressão do miR-18a-5p, em nossas amostras, possa estar diretamente relacionado com a progressão da doença.

5.17 Expressão de microRNAs e índices de KI-67

Observamos que, quanto maior o KI-67, maior a magnitude de expressão do miR-96-5p, miR-7-5p, miR-210-3p e miR-18a-5p (Tabela 21).

Os microRNAs 96-5p, 210-3p e 18a-5p foram descritos como responsáveis por estimular a oncogênese e a sua crescente expressão, em nossa casuística, diretamente proporcional ao aumento dos níveis de KI-67, sugere uma associação com um perfil tumoral mais agressivo.

Por outro lado, o miR-7-5p já foi descrito como um miRNA supressor da migração celular e da capacidade de invasão em melanoma (Giles, 2013). A hiperexpressão do miR-7-5p, em nossas amostras, e a sua crescente expressão, diretamente proporcional ao aumento dos níveis de KI-67, sugere um papel promotor da carcinogênese deste microRNA em tumores de mama triplo negativos.

5.18 Expressão de microRNAs e sobrevida

Em quase todos os casos, quando analisamos os gráficos 5, 6, 7, 8, 9 e 10, existe uma nota dizendo que os dados foram censurados. Isso quer dizer que, para algum dos grupos avaliados, todos os pacientes incluídos tiveram a interrupção do seguimento antes do evento (recidiva ou óbito por câncer), ou seja, os pacientes continuavam sem sinais de doença ou vivos no momento em que se encerrou a coleta dos dados para a análise.

Na avaliação da expressão de microRNAs e sobrevida livre de doença, houve diferença significativa em relação às recidivas nas categorias dos miRNAs: miR-199a-5p (mais recidivas no grupo com hipoexpressão); e miR-223-3p (mais recidivas no grupo cuja expressão não alcançou o $+2\text{-fold regulation} < -2$); (tabela 22).

Na avaliação da expressão de microRNAs e sobrevida câncer específica, comparando-se as categorias por *fold-change* de cada miRNA, houve diferença significativa de acordo com o evento óbito nos miRNAs: miR-199a-5p (mais óbitos no grupo com hipoexpressão); miR-199b-3p mais óbitos no grupo com hipoexpressão); miR-152-3p (mais óbitos no grupo com hipoexpressão) e miR-125b-1-3p mais óbitos no grupo com hipoexpressão); (tabela 23).

Lin *et al.* descreveram hipoexpressão do miR199b-3p em amostra tecidual de câncer hepático (Lin *et al.*, 2013).

He *et al.* observaram que o miR-199a-5p pode promover migração e invasão de células de câncer gástrico, e encontra-se com expressão significativamente aumentada em tecido tumoral gástrico comparada com o tecido normal (He *et al.*, 2014).

Giray *et al.* analisaram a expressão de microRNAs no plasma de pacientes com hepatite B crônica, cirrose HBV-positiva e hepatocarcinoma HBV-positivo. Encontraram hipoexpressão do miR-223-3p com *fold* de -5.55 ($p = 0.01513$), - 13.88 ($p = 0.0009440$) e -12.65 ($p = 0.0001446$), respectivamente (Giray *et al.*, 2014).

Sanfiorenzo *et al.* demonstraram que a hipoexpressão do miR-223-3p está significativamente associada a maior risco de progressão do adenocarcinoma pulmonar, e que a hipoexpressão do miR-152-3p e do miR-199a-5p é preditora significativa de menor sobrevida livre de doença no carcinoma de células escamosas pulmonar (Sanfiorenzo *et al.*, 2013).

A avaliação dos mRNAs-alvo dos miRNAs identificados permitirá avaliar se a diferença na expressão repercute em alteração fenotípica, indicando quais vias de sinalização estariam recrutadas e potencialmente reguladas por estes miRNAs em tumores triplo negativos.

No futuro, a chave para a correta utilização de terapias-alvo será a habilidade em subclassificar o câncer de mama. Espera-se que os microRNAs tenham papel nessa subclassificação, uma vez que o entendimento do processo de interferência por eles promovido, pode ajudar no desenvolvimento de terapias em doenças que sejam consequência de alterações na atividade gênica

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que a expressão de microRNAs no carcinoma ductal invasivo triplo negativo permite diferenciá-lo do tecido normal

A avaliação da expressão de microRNAs, por PCR em tempo real, no carcinoma mamário ductal invasivo triplo negativo comparado com tecido mamário normal definiu hiperexpressão do miR-96-5p, miR-21-5p, miR-7-5p, miR-182-5p, miR-210-3p, miR-18a-5p, miR-155-5p e miR-93-5p. Apontou, ainda, hipoexpressão do miR-204-5p, miR-205-5p, miR-125b-5p e let 7c-5p.

Na avaliação da expressão de microRNAs e sobrevida houve significância na hipoexpressão do miRNA 199a-5p quanto à sobrevida livre de doença. Em relação à sobrevida câncer específica houve significância na hipoexpressão dos microRNAs 199a-5p, 199b-3p, 152-3p e 125b-1-3p.

A avaliação imunoistoquímica mostrou que 77,42% das amostras apresentavam imunoistoquímica positiva para citoqueratinas 5-6 e/ou EGFR, traduzindo correspondência destas com o subtipo basal-símile.

Em relação ao KI-67, nossos dados sugerem que quanto maior o KI-67, maior a magnitude de expressão do miR-96-5p, miR-7-5p, miR-210-3p e miR-18a-5p.

7 ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética.

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 06/04/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0042/11**, intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR DE CÂNCER DE MAMA A PARTIR DA EXPRESSÃO GENÉTICA DE MICRORNA: TUMORES RECEPTORES HORMONAIS NEGATIVOS E HER-2 NEGATIVOS**", apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Edmund Chada Baracat**
Pesquisador (a) Executante: **Carlos Marino Cabral Calvano Filho**
Co-autores: **Marcos Desidério Ricci, Ana Maria Massad Costa, Gustavo Arantes Rosa Maciel, Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva e José Roberto Filassi.**

CAPPesq, 07 de Abril de 2011

Prof. Dr. Marcelo Zugaib
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Obstetrícia e Ginecologia
FMUSP

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:
SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:
ENDEREÇO:
CEP:
TELEFONE:

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
GRAU DE PARENTESCO:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:
SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:
ENDEREÇO:
CEP:
TELEFONE:

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Caracterização da população celular de câncer de mama a partir da expressão de micro RNA: tumores receptores hormonais e HER 2 negativos"
2. PESQUISADOR: EDMUND CHADA BARACAT
CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR TITULAR
UNIDADE DO HCFMUSP: DISCIPLINA DE GINECOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA
INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL: 28085
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA
RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa fornecendo parte do tecido de mama extraído da cirurgia a que foi submetida. As informações contidas neste documento são fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

O tumor de mama retirado na cirurgia a que você foi submetida será usado para isolar parte do material das células nele contido. O material dessas células é responsável pelo funcionamento e reprodução adequados dessas células. Parte do tumor de mama já processado e devidamente identificado pelos médicos patologistas do Hospital das Clínicas será levado a um laboratório vinculado ao projeto que possui a infra-estrutura necessária para o tratamento do material biológico recebido. No laboratório, após a análise da pesquisa, o material restante será descartado de forma segura e sem contaminação ambiental. Todo esse processo está de acordo com as normas determinadas no projeto intitulado: "Caracterização de população celular de câncer de mama a partir da expressão de microRNA: tumores receptores hormonais e HER 2 negativos" que foi previamente aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Como dito anteriormente, os tumores de mama obtidos serão utilizados para identificar e caracterizar componentes de suas células. Mais especificamente, material genético humano envolvido na produção de proteínas e proliferação celular, os microRNAs, presentes nestes tumores. As informações obtidas poderão ser usadas em pesquisas científicas que visem entender o desenvolvimento do câncer de mama e a partir daí, tornar possível o emprego de terapias mais eficientes para as pacientes portadoras deste tipo de câncer. Outros tipos de análise laboratorial poderão ser realizadas com o mesmo material doado e com o mesmo objetivo desta pesquisa.

Não haverá riscos adicionais a sua saúde ou qualquer desconforto com sua aderência ao estudo. Sua participação voluntária será de extrema importância para a realização dessa pesquisa. Contudo, esta NÃO envolverá qualquer tipo de remuneração de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Carlos Marino Cabral Calvano Filho que pode ser encontrado no 10º andar do Hospital das Clínicas. Telefone(s) 30696373. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações obtidas de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à

sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Não há riscos de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos aqui expostos, não tendo o participante qualquer direito à indenização.

Os dados obtidos do material coletado a partir do tecido tumoral serão usados apenas para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” Caracterização de população celular de câncer de mama a partir da expressão de microRNA: tumores receptores hormonais e HER 2 negativos”

Eu discuti com o Dr Carlos Marino Cabral Calvano Filho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Ambros V. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10:428–33.

American Cancer Society. *Breast cancer*. Available from: <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/breastcancer-what-is-breast-cancer>. Accessed May 25, 2011.

Anders C, Carey L. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology*. 2008;22:1233e43.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 1997;277:965–8.

Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor *Pdcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27:2128–36.

Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*. 2011;18:1121–6.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer*. 2007;109:1721–8.

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

Billar JA, Dueck AC, Stucky CC, Gray RJ, Wasif N, Northfelt DW, McCullough AE, Pockaj BA. Triple-negative breast cancers: unique clinical presentations and outcomes. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:384e90.

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:R214.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Brooks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, *et al*: Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010;7:e1000279.

Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K, *et al*. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nature Commun*. 2013;4:1393.

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. p. 53-mediated activation of miRNA34 candidate tumorsuppressor genes. *Curr Biol*. 2007;17:1298–307.

Borchert GM, Holton NW, Larson ED. Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC Cancer*. 2011;11:347.

Borrmann L, Wilkening S, Bullerdiek J. The expression of HMGA genes is regulated by their 3'UTR. *Oncogene*. 2001;20:4537–41.

Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010;36:206e15.

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;92:11534–8.

Brest P, Lassalle S, Hofman V, Bordone O, Gavric Tanga V, Bonnetaud C, Moreilhon C, Rios G, Santini J, Barbry P, Svanborg C, Mograbi B, Mari B, Hofman P. MiR-129-5p is required for histone deacetylase inhibitor-induced cell death in thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(6):711-9.

Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Ther.* 2011;18:1104–10.

Broeks A, Schmidt MK, Sherman ME, Couch FJ, Hopper JL, Dite GS, *et al*: Low penetrance breast cancer susceptibility loci are associated with specific breast tumor subtypes: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum Mol Genet.* 2011;20:3289e3303.

Cai J, Yang C, Yang Q, Ding H, Jia J, Guo J, Wang J, Wang Z. Deregulation of let-7e in epithelial ovarian cancer promotes the development of resistance to cisplatin. *Oncogenesis.* 2013 Oct 7;2:e75.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:2999–3004.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, *et al*. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353:1793–1801.

Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, *et al.* MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:5166–71.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:857-66.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:15524–9.

Calza S, Hall P, Auer G, Bjohle J, Klaar S, Kronenwett U, Liu ET, Miller L, Ploner A, *et al.* Intrinsic molecular signature of breast cancer in a populationbased cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8:R34.

Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J. hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1340–8.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;95:2492e2502.

Griffiths CLMA, Olin JL. Olin. Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. *J Pharm Pract*. 2012;25(3):319-23.

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

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;26:745–52.

Chen D, Sun Y, Yuan Y, Han Z, Zhang P, Zhang J, You MJ, Teruya-Feldstein J, Wang M, Gupta S, Hung MC, Liang H, Ma L. miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004177.

Chen X, Li J, Gray WH, Lehmann BD, Bauer JA, Shyr Y, Pietersen JA. TNBCtype: a subtyping tool for triple-negative breast cancer. *Cancer Inform* 2012;11:147e56.

Chen Z, Li D, Cheng Q, Ma Z, Jiang B, Peng R, Chen R, Cao Y, Wan X. MicroRNA-203 inhibits the proliferation and invasion of U251 glioblastoma cells by directly targeting PLD2. *J Mol Med Rep.* 2014 Feb;9(2):503-8.

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;81:505–12.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:13944–9.

Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol.* 2007;8:235–44.

Corcoran C, Rani S, Breslin S, Gogarty M, Ghobrial IM, Crown J, O Driscoll L. miR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. *Mol Cancer.* 2014;13(1):71.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids - the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:467–77.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:647-56.

Costinean S, Zanesi N, Perkarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in Eμ-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:7024-9.

Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10:704-14.

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

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486:346e352.

Davis S, Lollo B, Freier S, Esau C. Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:2294–2304.

Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*. 2013;32:617e628.

de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, et al. Germline deletion of the miR-7 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nature Genet*. 2011;43:1026–30.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22:8543–67.

Deng ZQ, Qian J, Liu FQ, Lin J, Shao R, Yin JY, Tang Q, Zhang M, He L. Expression level of miR-93 in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of breast cancer patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Mar 7.

Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod AS. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115:423–8.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triplenegative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4429–34.

Diao Y, Guo X, Jiang L, Wang G, Zhang C, Wan J, Jin Y, Wu Z. miR-203, a tumor suppressor frequently down-regulated by promoter hypermethylation in rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem*. 2014;289(1):529-39.

Dijkstra JR, Mekenkamp LJ, Teerenstra S, De Krijger I, Nagtegaal ID. MicroRNA expression in formalin-fixed paraffin embedded tissue using real time quantitative PCR: the strengths and pitfalls. *J Cell Mol Med*. 2012 Apr;16(4):683-90.

Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2008;10:203–11

Du L, Schageman JJ, Subauste MC, Saber B, Hammond SM, Prudkin L, Wistuba II, Ji L, et al. miR-93, miR-98, and miR-197 regulate expression of tumor suppressor gene FUS1. *Mol Cancer Res*. 2009;7:1234–43.

Du L, Zhao Z, Ma X, Hsiao TH, Chen Y, Young E, Suraokar M, Wistuba I, Minna JD, Pertsemlidis A. miR-93-directed downregulation of DAB2 defines a novel oncogenic pathway in lung cancer. *Oncogene*. 2013 Sep 16. doi: 10.1038/onc.2013.381.

Duan L, Hao X, Liu Z, Zhang Y, Zhang G. MiR-129-5p is down-regulated and involved in the growth, apoptosis and migration of medullary thyroid carcinoma cells through targeting RET. *FEBS Lett*. 2014:S0014-5793(14)00194-X.

Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4:721–6.

Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, *et al.* miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*. 2010;140:652–65.

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:3627–32.

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

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;27:3970–81.

Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, Spizzo R, Nicoloso MS, Rossi S, *et al.* Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*. 2011;305:59–67.

Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:E2110–6.

Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, Yee AJ, Ang LC, He C, Shan SW, Yang BB. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta8. *Oncogene*. 2011;30:806–21.

Fang L, Du WW, Yang W, Rutnam ZJ, Peng C, Li H, O'Malley YQ, Askeland RW, Sugg S, Liu M, *et al.* MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle*. 2012;11:4352–65.

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, *et al.* MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:18081–6.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806–11.

Flowers A, Chu QD, Panu L, Meschonat C, Caldito G, Lowery-Nordberg M, Li BD. Eukaryotic initiation factor 4E overexpression in triple-negative breast cancer predicts a worse outcome. *Surgery*. 2009;146:220e6.

Foulkes WD, Brunet J-B, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Begin LR, Hamel N, Goffin JR, Wong N, et al. The prognostic implication of the basal-like phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64:830–5.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938e48.

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;283:1026–33.

Fu X, Tian J, Zhang L, Chen Y, Hao Q: Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Lett*. 2012;586:1279–86.

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;282:23716–24.

Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev*. 2006;20:1–13.

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.

Georgantas RW 3rd, Streicher K, Luo X, Greenlees L, Zhu W, Liu Z, Brohawn P, Morehouse C, Higgs BW, Richman L, Jallal B, Yao Y, Ranade K. MicroRNA-206 induces G1 arrest in melanoma by inhibition of CDK4 and Cyclin D. *Pigment Cell Mel Res.* 2014;27(2):275-86.

Ghadimi BM, Schrock E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer PS, Ried T. Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol.* 1999;154:525–36.

Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Profiles of serum microRNAs miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2014 Mar 5.

Glud M, Klausen M, Gniadecki R, Rossing M, Hastrup N, Nielsen FC, Drzewiecki KT. MicroRNA expression in melanocytic nevi: the usefulness of formalin-fixed, paraffinembedded material for miRNA microarray profiling. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1219–24.

Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N. Triple-negative breast cancer-current *status* and future directions. *Ann Oncol.* 2009;20:1913e27.

Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, et al. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5 nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn.* 2000;2:84-91.

Gonzalez-Angulo AM, Chen H, Timms K, et al. Incidence and outcome of BRCA mutation carriers with triple receptornegative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 2010. General Session IX: *Triple-negative Breast Cancer: Clinical Science Symposium.* Abstract No: 160.

Greenwood C, Metodieva G, Al-Janabi K, Lausen B, Alldridge L, Leng L, Bucala R, *et al.* Stat1 and CD74 overexpression is co-dependent and linked to increased invasion and lymph node metastasis in triple-negative breast cancer. *J Proteomics*. 2012;75:3031e40.

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

Guo LJ, Zhang QY. Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening. *Int J Mol Med*. 2012;30:680-6.

Ha NH, Nair VS, Reddy DN, Mudvari P, Ohshiro K, Ghanta KS, *et al.* Lactoferrin-endothelin-1 axis contributes to the development and invasiveness of triple-negative breast cancer phenotypes. *Cancer Res*. 2011;71:7259e69.

Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:5652–7.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:2784-95.

He J, Zhang F, Wu Y, Zhang W, Zhu X, He X, Zhao Y, Zhang W, Zhao Y. Prognostic role of microRNA-155 in various carcinomas: results from a meta-analysis. *Dis Markers*. 2013;34(6):379-86.

He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007a;447:1130–4.

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

He XJ, Ma YY, Yu S, Jiang XT, Lu YD, Tao L, Wang HP, Hu ZM1, Tao HQ. Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets klotho. *BMC Cancer*. 2014;14(1):218.

Hermeking H. Enters the microRNA world. *Cancer Cell*. 2007;12:414–8.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8:R76.

Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol*. 2006;26:8191–201.

Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Molecular Cell*. 2009;35(6):856–67.

Huang X, Le Q-T, Giaccia AJ. miR-210-micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in Molecular Medicine*. 2010;16(5):230–37

Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:1168–76.

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;102:16961–6.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal *RNA Science*. 2001;293:834–8.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2007;297:2056-60.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065–70.

Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013;368:1685–94.

Ji S, Shao G, Lv X, Liu Y, Fan Y, Wu A, Hu H. Downregulation of miRNA-128 sensitises breast cancer cell to chemodrugs by targeting Bax. *Cell Biol Int*. 2013;37(7):653-8. May 8.

Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, Ambis S, *et al.* MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:1437–47.

Jia H, Zhang Z, Zou D, Wang B, Yan Y, Luo M, Dong L, Yin H, Gong B, Li Z, Wang F, Song W, *et al.* MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e88057.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120:635–47.

Jonsdottir K, Janssen SR, Da Rosa FC, Gudlaugsson E, Skaland I, Baak JP, Janssen EA. Validation of expression patterns for nine miRNAs in 204 lymph-node negative breast cancers. *PLoS One*. 2012;7(11):e48692.

- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*. 2005;309:1577–81.
- Kandel MJ, Stadler Z, Masciari S, Collins L, Schnitt S, Harris L, *et al*. Prevalence of BRCA1 mutations in triple negative breast cancer (BC). *J Clin Oncol*. 2006;24(18S):508.
- Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25:6188–96.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH, *et al*. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001;15:2654–9.
- Khoshnaw SM, Green AR, Powe DG, Ellis IO. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. *J Clin Pathol* 2009;62:422–8.
- Kim SJ, Oh JS, Shin JY, Lee KD, Sung KW, Nam SJ, Chun KH. Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *J Control Release*. 2011 Nov 7;155(3):427-34.
- Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, *et al*. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cellcycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:1672–81.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*. 2007;129:1141–51.
- Klopfleisch R, Weiss AT, Gruber AD. Excavation of a buried treasure-DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol*. 2011; 26:797–810.

Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*. 2009;137:1005–17.

Kozubek J, Ma Z, Fleming E, Duggan T, Wu R, Shin DG, Dadras SS. In-depth characterization of microRNA transcriptome in melanoma. *PLoS One*. 2013;8(9):e72699.

Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, van de Vijver MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triplenegative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007;9:R65.

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;37:495–500.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature*. 2005;438:685–9.

Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, *et al.* A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007;27(5):1859–67.

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

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietersen JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750e2767.

Lennox KA, Behlke MA. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther*. 2011;18:1111–20.

Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive- gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol.* 2001;195:66–71.

Li C, Li R, Song H, Wang D, Feng T, Yu X, *et al.* Significance of AEG-1 expression in correlation with VEGF, microvessel density and clinicopathological characteristics in triplenegative breast cancer. *J Surg Oncol.* 2011;103:184e92.

Li F, Liu B, Gao Y, Liu Y, Xu Y, Tong W, Zhang A. Upregulation of MicroRNA-107 induces proliferation in human gastric cancer cells by targeting the transcription factor FOXO1. *FEBS Lett.* 2014;588(4):538-44.

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

Li M, Ma X, Li M, Zhang B, Huang J, Liu L, Wei Y. Prognostic role of microRNA-210 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Dis Markers.* 2014;2014:106197.

Li M, Tian L, Wang L, Yao H, Zhang J, Lu J, Sun Y, Gao X, Xiao H, Liu M. Down-regulation of miR-129-5p inhibits growth and induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting APC. *PLoS One.* 2013;8(10):e77829.

Li R, He JL, Chen XM, Long CL, Yang DH, Ding YB, Qi HB, Liu XQ. MiR-200a is involved in proliferation and apoptosis in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B by targeting the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Rep.* 2014;41(4):1977-84.

Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, *et al.* miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res.* 2011;9:824-33.

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;7(1):32-40.

Li Y, Hong F, Yu Z. Decreased expression of microRNA-206 in breast cancer and its association with disease characteristics and patient survival. *J Int Med Res*. 2013;41(3):596-602.

Lieberman J, Sarnow P. Micromanaging hepatitis C virus. *N Engl J Med*. 2013;368:1741–3.

Lin L, Lin Y, Jin Y, Zheng C. Microarray analysis of microRNA expression in liver cancer tissues and normal control. *Gene*. 2013;523(2):158-60.

Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(11):847-65.

Liu A, Tetzlaff MT, Vanbelle P, Elder D, Feldman M, Tobias JW, Sepulveda AR, Xu X. MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin- fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2:519–27.

Liu H, Wang Y, Li X, Zhang YJ, Li J, Zheng YQ, Liu M, Song X, Li XR. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1. *Tumour Biol*. 2013;34(3):1713-22.

Liu J, Shi W, Wu C, Ju J, Jiang J. miR-181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer (Review). *Biomed Rep*. 2014;2(1):7-11.

Liu WH, Yeh SH, Lu CC, Yu SL, Chen HY, Lin CY, Chen DS, Chen PJ. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*. 2009;136(2):683-93.

Liu X, Gu X, Sun L, Flowers AB, Rademaker AW, Zhou Y, Kiyokawa H. Downregulation of Smurf2, a tumor-suppressive ubiquitin ligase, in triple-negative breast cancers: involvement of the RB-microRNA axis. *BMC Cancer*. 2014;14:57.

Liu X, Liu Y, Wu S, Shi X, Li L, Zhao J, Xu H. Tumor-suppressing effects of miR-429 on human osteosarcoma. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Mar 16.

Liu Y, Hei Y, Shu Q, Dong J, Gao Y, Fu H, Zheng X, Yang G. VCP/p97, down-regulated by microRNA-129-5p, could regulate the progression of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(4):e35800.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basallike subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19:264–71.

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

Loibl S, Muller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb- Esfahani S, Ataseven B, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:477e487.

Long J, Wang Y, Wang W, Chang BH, Danesh FR: Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions. *J Biol Chem*. 2010;285:23457–65.

Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67:1424–9.

Luo Q, 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;43(4):1212-8.

Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biological Reviews*. 2009;84:55–71.

Lyu X, Fang W, Zheng H, Cai L, Ye Y, Zhang L, Li J, Peng H, Cho WC, Wang E, Marincola FM, Yao K, Cai H, Li J, Li X. TGFbetaR2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness. *Mol Cancer*. 2014;13(1):51.

Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, *et al*. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nature Biotech*. 2010;28:341–7.

Madhavan D, Cuk K, Burwinkel B, Yang R. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. *Front Genet*. 2013;4:116.

Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramirez JA, Malagon-Santiago I, Espino-Silva PK, Santuario-Facio SK, Ruiz-Flores P, *et al*. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis Markers*. 2013;34:163–9.

Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:4436-43.

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.

Chan M, Liaw CS, Ji SJ, Tan HH, Wong CY, Thike AA, Tan PH, Ho GH, Lee ADG. Identification of circulating MicroRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2013;19(16).

McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;133:66e76.

Melo S, Villanueva A, Moutinho C, Davalos V, Spizzo R, Ivan C, *et al*. Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:4394–9.

Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130:2113–29.

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;133:647–58.

Miao L, Xiong X, Lin Y, Cheng Y, Lu J, Zhang J, Cheng N. miR-203 inhibits tumor cell migration and invasion via caveolin-1 in pancreatic cancer cells. *Oncol Lett*. 2014;7(3):658-62.

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.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, *et al*. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:10513–8.

Mohammed RA, Ellis IO, Mahmmod AM, Hawkes EC, Green AR, Rakha EA, Martin SG. Lymphatic and blood vessels in basal and triple-negative breast cancers: characteristics and prognostic significance. *Mod Pathol*. 2011;24:774e85.

Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2334–40.

Mouw JK, Yui Y, Damiano L, Bainer RO, Lakins JN, Acerbi I, Ou G, Wijekoon AC, et al. Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nat Med*. 2014 Mar 16.

Nassirpour R, Mehta PP, Baxi SM, Yin MJ. miR-221 promotes tumorigenesis in human triple negative breast cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e62170.

Neubauer H, Clare SE, Wozny W, Schwall GP, Poznanovic S, Stegmann W, et al. Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor *status* and differential phosphorylation of PGRMC1. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R85.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367–74.

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

Nurul-Syakima AM, Yoke-Kqueen C, Sabariah AR, Shiran MS, Singh A, Learn-Han L. Differential microRNA expression and identification of putative miRNA targets and pathways in head and neck cancers. *Int J Mol Med*. 2011;28:327-36.

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;216:671–80.

Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and HER2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res.* 2009;7:4–13.

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 2008;30:460–71.

Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Leng N, Brown D. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.* 2007;67:10782–8.

Ozgün A1, Karagoz B, Bilgi O, Tuncel T, Baloglu H, Kandemir EG. MicroRNA-21 as an indicator of aggressive phenotype in breast cancer. *Onkologie.* 2013;36(3):115-8.

Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature.* 2003;425:257–63.

Panarelli NC, Chen YT, Zhou XK, *et al*: MicroRNA expression aids the preoperative diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* 2012;41:685-90.

Park YH, Lee SJ, Cho EY, Kitabayashi N, Yantiss RK. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. *Ann Oncol.* 2011;22:1554e60.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, *et al*. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27:1160e1167.

Peddi PF, Ellis MJ, Ma C. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int J Breast Cancer.* 2012;2012:217185.

Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nature Cell Biol.* 2013;15:546–54.

Peng Y. Potential prognostic tumor biomarkers in triple-negative breast carcinoma. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2012;44:666e72.

Pérez-Rivas LG, Jerez JM, Carmona R, de Luque V, Vicioso L, Claros MG, Viguera E, Pajares B, Sánchez A, Ribelles N, Alba E, Lozano J. A microRNA signature associated with early recurrence in breast cancer. *PLoS One*. 2014 Mar 14;9(3):e91884.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747e52.

Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2010;15(Suppl 5):39e48.

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

Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 2006;21:533–42.

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;309:1573–6.

Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, *et al*. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:264–9.

Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature*. 2012;481:190–4.

Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM: Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triplenegative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18:123e133;

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12:R68.

Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med.* 2009;15:842–4.

Prat A, Perou CM: Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5:5e23.

Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, Kafousi M, Spandidos DA, Stathopoulos EN. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle.* 2011;10(3):507-17.

Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology.* 2009;41:40e7.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007;109:25–32.

Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K, *et al.* Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS One.* 2012;7:e39309.

Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumors: a critical review. *Histopathology.* 2008;52:108–18.

Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12:R90.

Roy SS, Gonugunta VK, Bandyopadhyay A, Rao MK, Goodall GJ, Sun LZ, Tekmal RR, Vadlamudi RK. Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer. *Oncogene.* 2013 Aug 26.

Sakurai M, Miki Y, Masuda M, Hata S, Shibahara Y, Hirakawa H, et al. LIN28: a regulator of tumor-suppressing activity of let-7 microRNA in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 Sep;131(3-5):101-6.

Sanfiorenzo C, Ilie MI, Belaid A, Barlési F, Mouroux J, Marquette CH, et al. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS One*. 2013;8(1):e54596.

Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, Karjalainen A, et al. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol*. 2006;209:206–12.

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.

Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, et al. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:11400–5.

Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139:223–9.

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

Singh A, Happel C, Manna SK, Acquaah-Mensah G, Carrerero J, Kumar S, Nasipuri P, et al. Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2921-34.

Song CG, Wu XY, Fu FM, Han ZH, Wang C, Shao ZM. Correlation of miR-155 on formalin-fixed paraffin embedded tissues with invasiveness and prognosis of breast cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2012;50(11):1011-4.

Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, *et al.* MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*. 2013;154:311–24.

Sörlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10869–74.

Sörlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418–23.

Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10393–8.

Stagg J, Allard B. Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Ther Adv Med Oncol*. 2013;5:169e81.

Subramanian M, Francis P, Bilke S, Li XL, Hara T, Lu X, *et al.* A mutant p53/let-7i-axis-regulated gene network drives cell migration, invasion and metastasis. *Oncogene*. 2014 Mar 24.

Sun B, Zhang S, Zhang D, Li Y, Zhao X, Luo Y, Guo Y. Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:7050e9.

Sun T, Wang C, Xing J, Wu D. miR-429 modulates the expression of c-myc in human gastric carcinoma cells. *Eur J Cancer*. 2011;47:2552–9.

Sun Y, Shen S, Liu X, Tang H, Wang Z, Yu Z, Li X, Wu M. miR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 2014 Jan 10.

Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, Li J. Serum MicroRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e47003.

Svoboda M, Sana J, Redova M, Navratil J, Palacova M, Fabian P, Slaby O, Vyzula R. MiR-34b is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients. *Diag Pathol*. 2012;7:31.

Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, *et al*. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma. *Nature Med*. 2010;16:1134–40.

Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggensch JA, Morrison CD, *et al*. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn*. 2008;10:415–23.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, *et al*. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004;64:3753–62.

Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*. 2003;17:49–63.

Tao Y, Mao J, Zhang Q, Li L. Overexpression of Hedgehog signaling molecules and its involvement in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2011;2:995e1001.

Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, *et al*. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451:147–52.

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;451:147–52.

Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: a comparative clinicopathologic study between “triple-negative” and non-“triple-negative” tumors. *Hum Pathol*. 2012;43:23e30.

Tischkowitz M, Brunet J-S, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:134.

Tivnan A, Orr WS, Gubala V, Nooney R, Williams DE, McDonagh C, et al. Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PLoS One*. 2012;7:e38129.

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t (14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985;229:1390–3.

Uhlmann S, Zhang JD, Schwager A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S, et al. miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene*. 2010;29:4297–4306.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318:1931-4.

Verghese ET, Drury R, Green CA, Holliday DL, Lu X, Nash C, et al. MiR-26b is down-regulated in carcinoma-associated fibroblasts from ER-positive breast cancers leading to enhanced cell migration and invasion. *J Pathol*. 2013;231(3):388-99.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biol.* 2011;13:423–33.

Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, *et al.* Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res.* 2010;20:589–99.

Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, *et al.* Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(4):e34210.

Wang PY, Gong HT, Li BF, Lv CL, Wang HT, Zhou HH, Li XX, *et al.* Higher expression of circulating miR-182 as a novel biomarker for breast cancer. *Oncology Letters.* 2013;6:1681-6.

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;64(4):403-11.

Wang S, Zhao X, Wang J, Wen Y, Zhang L, Wang D, *et al.* Upregulation of microRNA-203 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Med Oncol.* 2013;30(3):681.

Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors - impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7:493–507.

Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:129–38.

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;75:855–62.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:118–45.

Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, Wang XN, Huang J, Zhao JJ, Mao SS, et al. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer*. 2011;117(13):2842-52.

Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression. of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007;13:1668–74.

Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer*. 2008;123:372–9.

Yamamoto Y, Iwase H. Clinicopathological features and treatment strategy for triple-negative breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2010;15:341e51.

Yaman S, Gumuskaya B, Ozkan C, Aksoy S, Guler G, Altundag K. Lymphatic and capillary invasion patterns in triple negative breast cancer. *Am Surg*. 2012;78:1238e42.

Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008;14:2348–60.

Ye XM, Zhu HY, Bai WD, Wang T, Wang L, Chen Y, Yang AG, Jia LT. Epigenetic silencing of miR-375 induces trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer by targeting IGF1R. *BMC Cancer*. 2014;14(1):134.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304:594–6.

Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N, et al. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res.* 2008;68:8976–85.

Yonemori K, Tsuta K, Ono M, Shimizu C, Hirakawa A, Hasegawa T, et al. Disruption of the blood brain barrier by brain metastases of triple-negative and basal-type breast cancer but not HER2/neu-positive breast cancer. *Cancer.* 2010;116:302e8.

Yu X, Song H, Xia T, Han S, Xiao B, Luo L, Xi Y, Guo J. Growth inhibitory effects of three miR-129 family members on gastric cancer. *Gene.* 2013;532(1):87-93.

Zeng RC, Zhang W, Yan XQ, Ye ZQ, Chen ED, Huang DP et al. Down-regulation of miRNA-30a in human plasma is a novel marker for breast cancer. *Med Oncol.* 2013;30:477.

Zhang F, Yang Z, Cao M, Xu Y, Li J, Chen X, et al. MiR-203 suppresses tumor growth and invasion and down-regulates MiR-21 expression through repressing Ran in esophageal cancer. *Cancer Lett.* 2014;342(1):121-9.

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;377:136–40.

Zhang Z, Zhang B, Li W, Fu L, Fu L, Zhu Z, Dong JT. Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the invasiveness of malignant breast cancer cells. *Genes Cancer.* 2011;2(8):782-91.

Zhang Y, Roccaro AM, Rombaoa C, Flores L, Obad S, Fernandes SM, et al. LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood.* 2012;120:1678–86.

Zhao FL, Hu GD, Wang XF, Zhang XH, Zhang YK, Yu ZS, Serum Overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer. *J Int Med Res.* 2012;40:859–66.

Zhao N, Wang R, Zhou L, Zhu Y, Gong J, Zhuang SM. MicroRNA-26b suppresses the NF- κ B signaling and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting TAK and TAB3. *Mol Cancer.* 2014;13(1):35.

Zhao Y, Deng C, Lu W, Xiao J, Ma D, Guo M, Recker RR, Gatalica Z, Wang Z, Xiao GG. Let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor α signaling in breast cancer. *Mol Med.* 2011;17(11-12):1233-41.

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

Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 2008;18:350–9.

Zhu Y, Yu F, Jiao Y, Feng J, Tang W, Yao H, Gong C, et al. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):7105-15.

Zou C, Xu Q, Mao F, Li D, Bian C, Liu LZ, Jiang Y, Chen X, et al. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle.* 2012;11(11):2137-45.