Amanda Duran

**Determinação de microRNAs circulantes em plasma de
pacientes jovens e de meia idade com câncer de mama**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi
Brentani

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2019

Amanda Duran

**Determinação de microRNAs circulantes em plasma de
pacientes jovens e de meia idade com câncer de mama**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi
Brentani

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Duran, Amanda

Determinação de microRNAs circulantes em plasma
de pacientes jovens e de meia idade com câncer de
mama / Amanda Duran. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Mitzi Brentani.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Expressão
gênica 3.microRNAs 4.Comunicação celular
5.Epigenômica

USP/FM/DBD-276/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esse trabalho à minha amada, alegre e doce mamãe Lilian (*in memoriam*). Minha força, minha luz e minha guia.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter sido desde sempre minha grande sustentação. Por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais Lilian (*in memoriam*) e Aguinaldo, que desde cedo me incentivaram a buscar pelos meus sonhos e nunca desistir, por mais difícil que o caminho pareça e por investirem tanto na minha educação, são eles que abraçaram tantos sonhos meus e os fizeram realidade. Obrigada por vibrarem tanto com minhas conquistas e preencherem minha vida com tanto amor. Ao meu irmão Filipe, meu primeiro e melhor amigo, a vida pra todos que trilham ao seu lado é mais leve e muito mais divertida. À minha cunhada Mariana, por ter sido uma irmã todos esses anos. Agradeço também a toda minha família que compreendeu todos os momentos que não pude estar presente, são minha base e de onde tiro forças todos os dias.

Agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Mitzi Brentani, que desde a Iniciação Científica me deu inúmeras oportunidades e me ensinou tantas coisas com tanta paciência, que jamais serei capaz de agradecer o suficiente. Obrigada por todas as palavras de incentivo quando deixei a ansiedade prevalecer. Esses anos que temos passado juntas ficarão sempre na minha memória e serão lembrados sempre com muito carinho.

À Dra. Fátima Solange Pasini, pela co-orientação na parte experimental desse projeto e por ceder os reagentes.

À toda equipe do Biobanco, em especial à Dra. Myuki Uno, aos enfermeiros de coleta e à MSc. Mazé e Liliane.

Ao Dr. René A.C. Vieira do Hospital do Câncer de Barretos, por ser tão prestativo e comprometido com o envio de amostras de plasma.

Ao Setor de Mecanismo de Lípidos, do Instituto do Coração (Incor), em especial à Dra Débora, por permitir a utilização da ultracentrífuga.

À Dra. Michele e ao Dr. Edson do A.C. Camargo por cederem e auxiliarem na utilização do Nanosight.

À Dra. Diana Noronha e a Dra. Andreia Otake pelas contribuições na banca de qualificação.

À Cristiane e Maiara por serem tão atenciosas e comprometidas em ajudar os alunos nas questões administrativas da pós graduação.

Aos funcionários do Centro Translacional de Pesquisa em Oncologia.

Aos colegas de laboratório, em especial Gláucia, Livia, Isabela, Alexis, Rose, Jânio, Mayara e Renata. Foram todos essenciais nesses anos passados juntos, o carinho e amizade que compartilhamos em momentos profissionais e pessoais seguirá sempre comigo.

Agradecimento especial a todas as pacientes participantes do estudo, que mesmo em um momento tão delicado e muitas vezes obscuro, concordaram em ceder amostras para o Biobanco e acreditar na ciência feita no ICESP. A vocês, todo meu carinho, admiração e desejo de que a luz prevaleça em seus caminhos!

E ao apoio da CAPES, pela bolsa de mestrado recebida.

“The scariest moment is always just before you start.”

Stephen King

RESUMO

Duran, A. *Determinação de microRNAs circulantes em plasma de pacientes jovens e de meia idade com câncer de mama* [dissertação]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Câncer de mama em pacientes jovens é uma condição rara (4% dos casos) e parece apresentar um pior prognóstico para essas pacientes quando comparado com as mais velhas. Um estudo anterior do grupo, comparou a expressão de microRNAs (miRs) entre tumores de pacientes jovens (≤ 35 anos) e de meia-idade (50-69 anos) e foram encontradas diferenças em 8 miRs (miR-9, miR-106a, miR-106b, miR-18b, miR-210, miR-33b, miR-518a-3p and miR-372). Nosso objetivo principal foi verificar se a diferença de expressão encontrada no tumor está refletida também no plasma, comparando a expressão desses 8 miRs circulantes entre dois grupos de idade com câncer de mama ductal invasivo, luminal e baixo risco de mutação em BRCA1/2. **MÉTODOS:** Foram realizadas consultas a prontuários das pacientes admitidas no Serviço de Mastologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) (Abril/2016 até Abril/2018) e selecionadas amostras de plasma de pacientes jovens (GJ com ≤ 35 anos) e de pacientes de meia-idade (GMI com 50-69 anos). No GJ também foram incluídas pacientes do Hospital do Câncer de Barretos com o mesmo diagnóstico. Essas pacientes possuíam diagnóstico confirmado de carcinoma mamário ductal invasivo, luminal (A, B ou luminal HER-2+), sem histórico familiar de câncer de mama com amostras coletadas antes de qualquer tipo de tratamento. Foi realizada extração de RNA total dessas amostras de plasma e feita a determinação de expressão dos 8 miRs por meio de real-time PCR (qPCR) e comparada entre os grupos de idade. Para determinar se esses miRs eram encontrados também presentes dentro de vesículas extracelulares (VEs), estas foram isoladas por ultracentrifugação e quantificadas por Nanosight e o RNA contido nas VEs foi extraído e a expressão dos miRs foi determinada por qPCR. Os resultados foram analisados usando o teste de Mann-Whitney. **RESULTADOS:** Foram selecionadas amostras de plasma de 24 pacientes do GJ, (15 do ICESSP e 9 do Hospital do Câncer de Barretos) e de 21 pacientes do GMI. Nessas amostras, dos 8 miRs avaliados, 6 foram encontrados circulantes e apenas dois (miR-372 e miR-518a-3p) não apresentaram expressão em nenhuma amostra. O cálculo da expressão relativa foi realizado com duas possibilidades de combinação de miRs como normalizadores (miR-18b e miR-21; miR-18b e miR-425), conforme resultado encontrado utilizando o programa Normfinder e por meio do cálculo de ΔCt /Desvio Padrão, respectivamente. E, em ambas condições, o miR-9 foi detectado com maior nível de expressão nas pacientes do GJ quando comparado com a expressão das pacientes do GMI ($p = 0,03$ e $p = 0,01$). Na análise de genes-alvo desse miR, foi observado que as principais vias reguladas estão relacionadas principalmente com motilidade celular, regulando genes envolvidos em importantes vias como ILK e transição epitélio-mesênquima. Os demais miRs circulantes não apresentaram diferenças de expressão entre os grupos de idade. Também não houve diferença na quantidade de VEs encontradas no plasma ($p = 1,0$). A expressão dos 8 miRs também foi avaliada nas amostras de VEs isoladas e foi observado que o miR-

106a, embora presente em todas as amostras de plasma como um miR circulante, não é transportado dentro das VEs, enquanto o miR-9, miR-106b e o miR-18b foram encontrados presentes em todas as amostras de VEs avaliadas. **CONCLUSÕES:** os tumores de pacientes jovens parecem apresentar determinadas características biológicas diferentes, como a expressão do miR-9, importante miR relacionado principalmente com invasão e associado com um pior prognóstico. Um maior acompanhamento dessas pacientes será importante para determinar a real influência desse miR na progressão tumoral e compreender as diferenças biológicas encontradas nos tumores de mama jovem.

Descritores: Neoplasias da mama; Expressão gênica; microRNAs; Comunicação celular; Epigenômica

ABSTRACT

DURAN, A. Determination of circulating microRNAs in plasma of young and middle-age breast cancer patients

INTRODUCTION: Breast cancer in young women is rare (4% of all breast cancer cases) and tends to have a poorer prognosis than older women. A previous study of our group compared microRNAs (miRs) expression profiles between breast tumors of young (≤ 35 years) and middle-age women (50-69 years) and showed difference in expression of 8 miRs (miR-9, miR-106a, miR-106b, miR-18b, miR-210, miR-33b, miR-518a-3p and miR-372). Our main objective was to verify if the difference in expression observed in tissue was reflected in plasma with circulating miRs in the comparison of these two age groups with invasive ductal breast cancer, luminal subtype with low BRCA1/2 mutation risk. **EXPERIMENTAL DESIGN:** Medical reports were consulted to search patients who started treatment at *Instituto do Câncer do Estado de São Paulo* (ICESP) (April, 2016 – April, 2018) and to select young (≤ 35 years - GJ) and middle-age women (50-69 years - GMI) with confirmed diagnosis of invasive ductal breast cancer, luminal subtype (A, B ou luminal HER-2+), with no family history and samples were collected before any type of treatment. Patients samples from *Hospital do Câncer de Barretos* (HCB) were included in the study too. The total RNA was extracted by chromatography from the plasma samples and qPCR was performed to determine the expression of miRs. To verify if these miRs were inside EVs too, they were isolated using ultracentrifugation and quantified with Nanosight LIM-14. The results were analyzed using Mann-Whitney test. **RESULTS:** Samples of 24 patients from GJ (15 from ICESP and 9 from HCB) and 21 from GMI were selected. In these samples, 6 from 8 miRs were found circulating and only two of them (miR-372 and miR-518a-3p) had no detectable expression in any sample. Two combinations of miRs were used to normalize data (miR-18b e miR-21; miR-18b and miR-425), using Normfinder software and ΔC_t Calculation/Standard Deviation, respectively. Under both conditions, miR-9 was detected with a higher level of expression in GJ patients when compared to GMI patients ($p=0,03$ and $p=0,01$). In the analysis of target genes of this miR, it was observed that the main regulated pathways are mainly related to cellular motility, regulating genes involved in important pathways such as ILK and epithelial-mesenchymal transition. The other circulating miRs did not show differences of expression between the age groups. There was also no difference in the amount of EVs found in plasma ($p=1,0$). The expression of the 8 miRs was also evaluated in the isolated EVs samples and it was observed that miR-106a, although present in all plasma samples as a circulating miR, is not transported within the EVs, whereas miR-9, miR-106b and miR-18b were found present in all samples of EVs evaluated. **CONCLUSIONS:** Tumors of young patients appear to have certain different biological characteristics, such as miR-9 expression, important miR mainly related to invasion and associated with a worse prognosis. Further follow-up of these patients will be important to determine the real influence of this miR on tumor progression and to understand the biological differences found in young breast tumors.

Descriptors: Breast neoplasms; Gene expression; microRNAs; Cell communication; Epigenomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da Glândula Mamária	18
Figura 2 – Estimativa do número de casos novos de câncer em mulheres no Brasil em 2018.....	20
Figura 3 – Biogênese dos miRs e liberação para o meio extracelular.....	23
Figura 4 – MiRs atuando como oncomiRs e supressores de tumor	25
Figura 5 – Síntese de cDNA.....	37
Figura 6 – Funcionamento da sonda Taqman	39
Figura 7 – Esquema do funcionamento do Nanosight.....	43
Figura 8 – Funcionamento do sistema miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR	46
Figura 9 – Fluxograma das técnicas do estudo	47
Figura 10 – Casos de pacientes com câncer de mama atendidos no Serviço de Mastologia do ICESP no período de abril/2016 até abril/2018	48
Figura 11 – Distribuição do número de casos, metástase e óbitos dos fenótipos moleculares de Carcinomas Ductais Invasivos.....	50
Figura 12 – Valores de Ct dos miRs candidatos a normalizadores	55
Figura 13 – Combinações analisadas no cálculo de normalizador por ΔCt	55
Figura 14 – Análise de pares de miRs candidatos para normalizadores.....	57
Figura 15 – Expressão do miR-9 no GJ e no GMI.....	58
Figura 16 – Relação da expressão do miRNA-9 com o estadiamento dos tumores	59
Figura 17 – Relação da expressão do miR-9 com os fenótipos moleculares dos tumores	59
Figura 18 – Relação da expressão do miR-9 com o grau histológico dos tumores	60

Figura 19 – Relação da expressão do miRNA-9 com o grau nuclear dos tumores	60
Figura 20 – Expressão do miR-106a no GJ e GMI	61
Figura 21 – Expressão do miR-106b no GJ e GMI	61
Figura 22 – Expressão do miR-210 no GJ e GMI	62
Figura 23 – Expressão do miR-33b no GJ e GMI	62
Figura 24 – Relação dos genes-alvo com doenças	64
Figura 25 – Funções celulares e moleculares relacionadas com os genes-alvos do miR-9	64
Figura 26 – Via ILK.....	65
Figura 27 – Receptores Tirosina Quinase e EMT	66
Figura 28 – Quantificação das VEs dos grupos de idade	68
Figura 29 – Distribuição por tamanho das VEs no GJ	68
Figura 30 – Distribuição por tamanho das VES no GMI	69
Figura 31 – Tamanho médio das Vesículas Extracelulares no plasma das pacientes do GJ e do GMI	69
Figura 32 – Moda do tamanho das VEs no plasma das pacientes do GJ e do GMI.....	70
Figura 33 – Expressão do miR-21 em diferentes condições de tratamento	71
Figura 34 – Expressão do miR-16 em diferentes condições de tratamento	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de classificação dos fenótipos moleculares	30
Tabela 2 – Estadiamento dos Tumores de Mama	31
Tabela 3 – Características dos grupos do estudo	32
Tabela 4 – MicroRNAs alvos.....	34
Tabela 5 – Candidatos a microRNAs normalizadores	35
Tabela 6 – Frequência de idade das pacientes com câncer de mama atendidas no ICESP	49
Tabela 7 – Frequência dos tipos histológicos identificados nos pacientes do ICESP.....	49
Tabela 8 – Comparação das características clínico-patológicas entre as pacientes jovens e de meia-idade atendidas no ICESP	51
Tabela 9 – Principais características dos tumores das pacientes participantes do estudo	53
Tabela 10 – Resultado <i>Normfinder</i>	54
Tabela 11 – Cálculo de Normalizador pelo método ΔCt	56
Tabela 12 – Genes-alvo do miR-9	63
Tabela 13 – Principais vias reguladas pelos genes-alvo do miR-9	65
Tabela 14 – Quantificação das Vesículas Extracelulares	67
Tabela 15 – Frequência de expressão dos miRs circulantes <i>versus</i> miRs em Ves no GJ.....	72
Tabela 16 – Frequência de expressão dos miRs circulantes <i>versus</i> miRs em Ves no GMI	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
GJ	Grupo Jovem
GMI	Grupo Meia-Idade
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RNA	Ácido ribonucleico
PBS	Tampão Fosfato Salino
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real
ER	Receptor de Estrógeno
PR	Receptor de Progesterona
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCB	Hospital do Câncer de Barretos
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
MiR	MicroRNA
RQ	Quantidades relativas
VEs	Vesículas Extracelulares
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1 Introdução	17
1.1 Mama e Câncer	17
1.2 MicroRNAs	22
1.3 Vesículas Extracelulares	26
2 Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 Materiais e Métodos	30
3.1 Análise de Prontuários	30
3.1.1 Perfil dos Pacientes do Serviço de Mastologia do ICESP	30
3.2 Seleção das Amostras.....	31
3.2.1 Processamento das Amostras Seleccionadas	32
3.3 Extração de RNA Circulante do Plasma.....	33
3.4 PCR em Tempo Real (qPCR)	34
3.4.1 Taqman® Advanced miRNA Assays	35
3.4.2 Normalização dos dados	39
3.4.2.1 Programa <i>Normfinder</i>	40
3.4.2.2 Método de ΔCt e Desvio Padrão	40
3.4.3 Cálculo da Expressão Gênica	41
3.5 Isolamento das vesículas por Ultracentrifugação	41
3.6 Análise de genes-alvo do miR-9.....	42
3.7 Quantificação das Vesículas Extracelulares.....	42
3.8 Extração de RNA de Vesículas Extracelulares.....	43
3.9 Controle da Qualidade da Extração de RNA das VES	45

3.10 Determinação da Expressão de miRs em Vesículas Extracelulares por qPCR.....	46
3.11 Análise Estatística	47
4 Resultados	48
4.1 Prontuários	48
4.1.1 Levantamento Geral	48
4.1.2 Comparação das características tumorais entre as pacientes jovens (≤35 anos) e de meia-idade (50-69 anos)	50
4.2 Amostras Seleccionadas.....	52
4.3 Determinação dos Níveis de Expressão dos miRs por PCR em tempo-real (qPCR)	53
4.3.1 Normalização dos dados da qPCR.....	54
4.3.1.1 <i>Normfinder</i>	54
4.3.1.2 Normalização pelo método de ΔCt e Desvio Padrão.....	54
4.3.2 Determinação da quantificação relativa dos microRNAs circulantes em plasma.....	57
4.4 Genes-alvo do miR-9 e suas vias.....	62
4.5 Quantificação das VEs por Nanosight	66
4.6 Extração de RNA das VEs	70
4.7 Determinação da Expressão de miRs nas VEs por qPCR	72
5 Discussão	74
6 Conclusão	82
7 Referências	83
Anexos	91
(A) Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa.....	91
(B) Características das pacientes seleccionadas para o estudo	92
(C) Genes Alvos do miR-9-5p	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mama e Câncer

A glândula mamária passa por diversos estágios de desenvolvimento que se inicia no período embrionário e sofre grandes mudanças relacionadas ao tamanho, forma e função durante a puberdade, gravidez e lactação (FENG et al., 2018), reguladas pela sinalização hormonal (LANIGAN et al., 2007).

O epitélio mamário é formado por dois tipos celulares principais: basal e luminal, conforme demonstrado na **Figura 1A**. O epitélio basal é composto pelas células mioepiteliais, já o epitélio luminal forma os ductos e contém as populações celulares definidas pelos receptores hormonais que expressam (MACIAS e HINCK, 2012). Por alterações genéticas e epigenéticas, as vias de sinalização que controlam proliferação, divisão e morte celular podem ficar desreguladas e alterar a estrutura e funcionamento normal das células da glândula (FENG et al., 2018). A hiperplasia é caracterizada quando há mais de duas camadas de células e podem variar de leve até atípica, nesta última apresentando características histológicas similares aos casos de carcinoma *in situ*, com a distinção de preencherem apenas parcialmente os ductos afetados (KUMAR et al., 2013). O *carcinoma in situ* (**Figura 1B**) é caracterizado pela limitação das células malignas nos ductos e lóbulos pela membrana basal, ou seja, sem invasão (LEE et al., 2012). Quando há invasão do estroma e infiltração da membrana basal com a perda de células mioepiteliais, origina-se o carcinoma invasivo de mama (**Figura 1C**), o qual pode invadir os tecidos adjacentes e migrar para órgãos distantes (**Figura 1D**) e pode apresentar uma grande variedade de fenótipos morfológicos e tipos histopatológicos específicos com características clínicas e patológicas bem diversificadas (POLYAK, 2007).

Figura 1. Estrutura da Glândula Mamária. (A) Organização normal das células; (B) Carcinoma *in situ*; (C) Carcinoma Invasivo; (D) Células cancerosas com capacidade metastática.

Fonte: Modificado de Marshall (2014).

O câncer de mama é encontrado em distintas áreas do órgão e pode ser classificado de diferentes formas (FENG et al., 2018), a maioria dos casos são carcinomas e possuem uma enorme diversidade de classificações que pode ser observada na 4ª edição da *WHO classification of tumours of the breast* (Classificação dos tumores de mama da Organização Mundial da Saúde) publicada pela *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC) em 2012 com mais de 20 subtipos diferentes da doença. Essas diferentes classificações podem ser baseados na histologia do tumor, sendo os principais: Carcinoma Ductal (*In situ* ou invasivo) e Carcinoma Lobular (*In situ* ou invasivo). Além desses tipos mais comuns, ainda podem existir outros tipos de tumores mais raros, sendo cerca de 5-10% dos casos, como câncer de mama inflamatório, carcinoma papilar, tumor *Phyllodes*, dentre outros (FENG et al., 2018). Perou et al. (2000) classificaram os tumores de mama em 4 subtipos principais, baseados no padrão de expressão gênica: luminais, *basal-like*, HER-2+ (do inglês *human epidermal growth factor receptor-type 2*) e *normal-like*.

Os tumores luminais são os mais prevalentes e são classificados conforme o padrão de expressão dos receptores hormonais, expressão de HER-2 e níveis de Ki67: os tumores luminal A apresentam um melhor prognóstico (EROLES et al., 2012) e possuem expressão do receptor de estrógeno (ER), presença do receptor de progesterona (PR), ausência da expressão de HER-2 e $Ki67 \leq 14\%$ (MORRISON et al., 2012; PRAT et al. 2013). Os tumores luminal B possuem um pior prognóstico quando comparados com os tumores luminal A (EROLES et al., 2012), fazem parte dessa classificação os tumores que apresentam ER+, PR+/-, HER-2- e $Ki67 > 14\%$ (MORRISON et al., 2012). Apresentam maior grau, maior tamanho, acometimento de linfonodos e invasão linfovascular mais frequentes quando comparados com os tumores luminal A. Esses tumores podem ainda ser subdivididos em Luminal-HER-2, com expressão de ER+, PR+/- e HER-2+ (CHEANG et al., 2009).

Os tumores triplo negativo (ER-, PR-, HER-2-), principais representantes do *basal-like*, são tumores que apresentam comportamento agressivo, incluindo grande instabilidade genômica (ARPINO, MILANO, PLACIDO, 2015). Os tumores HER-2 (ER-, PR- e alta expressão de HER-2) também são considerados mais agressivos, apresentando alta taxa de proliferação e prognóstico ruim (YERSAL e BARUTCA, 2014). Já o subtipo *normal-like* apresenta os mesmos marcadores que o Luminal A, porém com padrões de expressão gênica similares ao tecido epitelial normal e tem um pior desfecho (DAI et al., 2015).

O câncer de mama é considerado o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres em todo mundo. Segunda a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019), em 2018 foram registrados 2.088.849 milhões de casos da doença (incluindo ambos os sexos e todas as idades) e 626.679 mortes registradas.

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, também é o tipo de câncer mais comum e a principal causa de morte entre as mulheres (CECILIO et al., 2015). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2019), para o ano de 2018 foram estimados 59.700 novos casos desse carcinoma, conforme exposto na **Figura 2**.

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 2. Estimativa do número de casos novos de câncer em mulheres no Brasil em 2018

Fonte: INCA, 2019

A doença é considerada multifatorial e, portanto, engloba vários fatores de risco e possíveis causas. Além da predisposição genética presente em 5-10% dos casos de câncer de mama, sendo a mutação em BRCA1/BRCA2 a mais comum (FENG et al., 2018), outros fatores também foram relacionados com o maior risco de desenvolvimento do carcinoma mamário, como fatores envolvidos com reprodução e balanço hormonal, estilo de vida (hábitos alimentares, consumo de álcool e tabaco, etc) e a idade (WHO, 2002). Embora o risco de desenvolvimento da doença aumente com o aumento da idade, ela também é observada em pacientes jovens, que correspondem 5-7 % dos casos (PINHEIRO et al., 2013). Os riscos parecem ser maiores também em países menos desenvolvidos, na América Latina, a incidência de câncer de mama nas pacientes jovens é maior quando comparada com os casos novos registrados em regiões mais desenvolvidas, como na América do Norte (20% *versus* 12%, respectivamente), o mesmo ocorre para a mortalidade nesse grupo de pacientes, que na América Latina é de 14%, enquanto na América do Norte a taxa encontrada é de 7% (VILLAREAL-GARZA et al., 2013).

Porém, a idade de classificação considerada “jovem” entre os estudos apresenta variação (<25, <30, <35, <40 anos) e essa determinação é de extrema importância, pois características biológicas, hormonais e ambientais variam durante a vida e podem modular as características do tumor

(CANCELLO et al., 2013). Han e Kang (2010) realizaram um estudo com 9.885 pacientes com grupos de idade de <30 até 50 anos e, pelos resultados obtidos, o grupo de idade com pacientes de até 35 anos apresentou diferenças relacionadas com pior sobrevida quando comparados com outros grupos de idade de mulheres pré-menopausadas. Além disso, Sabiani et al. (2016) também demonstrou que pacientes com idade <35 anos apresentavam características diferentes e piores do que as do grupo de idade de 36-40 anos, como maior frequência de recorrência e metástase a distância. Por isso, 35 anos parece ser um *cut-off* ideal para esse grupo e foi adotado para classificação das pacientes jovens no atual estudo.

Os tumores dessas pacientes podem apresentar um comportamento biológico relacionado com um pior prognóstico (COLLEONI, 2002; HAN et al. 2004): tumores maiores e menos diferenciados, maior acometimento linfonodal e diagnóstico em estágios mais avançados (GNERLICH et al., 2009; MORRISON et al., 2012; FREDHOLM et al., 2016; MARTÍNEZ, 2019). Também podem apresentar uma maior frequência de fenótipos moleculares mais agressivos (FREDHOLM et al., 2017), como de Luminal HER-2+ e triplo negativo e uma menor frequência de tumores Luminal A nessas pacientes com idade <35 anos (CANCELLO et al., 2010). Em um estudo retrospectivo de Gnerlich et al. (2009) com 243.012 pacientes (6,4% com idade < 40 anos e 93,6% com idade > 40 anos), as pacientes jovens apresentaram uma maior taxa de morte por câncer de mama (90%) quando comparada com as pacientes mais velhas (49%), num período de acompanhamento de 15 anos.

Além disso, os tumores em pacientes jovens parecem apresentar também alterações em características moleculares, como no perfil de expressão de microRNAs (PEÑA-CHILET et al., 2014; TSAI et al., 2018). Um estudo anterior do grupo (BASTOS et al., 2016) identificou que os tumores de mama de pacientes jovens (≤ 35 anos) apresentavam sete miRs (miR-9-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-18b-5p, miR-210-3p, miR-33b, miR-518a-3p) com maior nível de expressão quando comparados com tumores de mama de pacientes de meia-idade (50-69 anos) e um miR com menor nível de expressão (miR-372-3p) nas pacientes com idade menor. Foi observado que é possível discriminar esses dois grupos de idade pelo perfil de miRs expressos no tumor

e que estes podem estar envolvidos com comportamentos mais agressivos nas pacientes jovens.

1.2 MicroRNAs

A ação dos microRNAs (miRs) foi descrita pela primeira vez em 1993 nos nematódeos *Caenorhabditis elegans*. Nessas larvas foi observado um nível constante dos transcritos do gene heterocrônico *lin-14*, porém, o nível de proteínas desse gene era reduzido em determinado estágio do desenvolvimento larval, sugerindo então, uma regulação pós-transcricional. Essa diminuição da proteína LIN-14 foi associada com o aumento de um pequeno transcrito do gene *lin-4*, que se tornou então, o primeiro miR descoberto (LEE, FEINBAUM e AMBROS, 1993; WIGHTMAN, HÁ e RUVKUN, 1993). Desde então, muitos miRs foram descritos (38.589, segundo miRBase) e foram classificados segundo sua localização genômica em: **(a) intergênicos:** possuem seus próprios promotores regulando sua expressão; **(b) intrônicos:** encontrados em íntrons, utilizam os mesmos promotores da unidade transcricional que estão localizados; e **(c) exônicos/intragênicos:** são pouco frequentes e utilizam os promotores dos genes que estão localizados (ISIK, KORSWAGEN, BEREZIKOV, 2010; OLENA, PATTON, 2010).

A biogênese desses pequenos transcritos de aproximadamente 22 nucleotídeos se inicia com a transcrição dos genes dos miRs pela RNA polimerase II, dando origem ao miR primário (pri-miRNA). Esse transcrito longo é reconhecido e clivado no núcleo pela enzima RNase Drosha, resultando no pré-miRNA, de aproximadamente 70 nucleotídeos, que através de uma proteína de exportação nuclear exportina 5, é exportado do núcleo para o citoplasma e é processado por outra RNase chamada Dicer, dando origem então a miRs de fitas duplas com 21-25 nucleotídeos (GARZON, CALIN, CROCE, 2009; HÁ, KIM, 2014). Uma das fitas desse duplex (denominada fita madura) é incorporada ao complexo proteico denominado RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) contendo a proteína Argonata (HWANG, MENDELL, 2006). De maneira geral, o miR pode atuar na regulação da expressão gênica de duas maneiras: (1) clivando o mRNA e (2) reprimindo a tradução. O fator que determina qual via será realizada é a

complementariedade entre as bases do miR com as do mRNA-alvo. Essa complementariedade é determinada pela região 5' do microRNA, chamada de “seed” (“semente”) que apresenta 6-8 nucleotídeos e, na maior parte das vezes, reconhece a região 3' UTR dos mRNAs (DWEET et al., 2011), embora, em alguns casos também possa reconhecer a região 5' UTR (PRICE, CHEN, 2014). Na via canônica, quando o pareamento é completo ou quase completo, há a clivagem do mRNA. Após esse processo, o miR se mantém íntegro podendo reconhecer e degradar outros RNAs mensageiros. A complementariedade completa ou quase completa é apontada como essencial para que haja a clivagem através do complexo RISC, mas não é necessário para que haja a repressão traducional, impedindo somente a tradução do mRNA, mas não degradando a fita (KIM, 2005), conforme demonstrado na **Figura 3**.

Figura 3. Biogênese dos miRs e liberação para o meio extracelular. Os miRs são processados parte no núcleo e parte no citoplasma celular, atuam principalmente dentro das células, mas também podem ser transportados para o meio extracelular por diversos mecanismos, agindo também em células vizinhas.

Fonte: Adaptada de Soheli, 2016.

Níveis normais de expressão de miRs são fundamentais para que funções como proliferação, diferenciação, angiogênese, migração e apoptose funcionem normalmente (BERTOLI, CAVA, CASTIGLIONI, 2015) conforme demonstrado na **Figura 4a**, porém, se ocorre uma alteração em seus níveis essas etapas fundamentais são desreguladas (HAMAM et al., 2017). Os miRs tem um papel já bem elucidado na tumorigênese e podem funcionar tanto como supressores de tumor, ou seja, impedindo a progressão tumoral agindo em oncogenes ou como oncomiRs, quando beneficiam o desenvolvimento das células tumorais inibindo os transcritos de genes supressores de tumor, em ambos os casos, modificações em seus níveis de expressão, podem favorecer o desenvolvimento do tumor (ESQUELA-KERSCHER e SLACK, 2006; SVORONOS, ENGELMAN, SLACK, 2016), conforme esquematizado na **Figura 4b e 4c**.

Figura 4. MiRs atuando como oncomiRs e supressores de tumor.

(A) Em tecidos e condições normais, os miRs têm sua expressão em níveis adequados e podem se ligar ao seu mRNA-alvo e impedir a sua tradução, consequentemente, todos os processos relacionados com crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular são mantidos corretamente. **(B)** Quando há redução ou inibição dos miRs que são considerados supressores de tumor (inibem oncogenes), há aumento da tradução de oncoproteínas, levando, consequentemente, desregulação na proliferação, invasão/angiogênese e diferenciação, favorecendo desenvolvimento da doença. **(C)** A desregulação também pode ocorrer com os oncomiRs (inibem genes supressores de tumor), se eles estão com níveis de expressão maiores que o normal, pode haver uma grande inibição aos genes importantes em momentos inapropriados do ciclo celular, impedindo a tradução de proteínas importantes para controlar proliferação, por exemplo, também favorecendo a progressão do tumor.

Fonte: adaptado de ESQUELA-KERSCHER e SLACK, 2006.

Os miRs podem também ser encontrados circulantes em fluídos biológicos e já foram apontados como possíveis marcadores de diagnóstico no câncer, como por exemplo, indicadores de câncer de pulmão (PATNAIK et al., 2012; HEEGARD et al., 2012), diagnóstico em estágios iniciais de adenocarcinomas colorretais (ZHENG et al., 2014) e também associados com avaliadores de prognóstico no câncer gástrico (KOMATSU et al., 2013), além de marcadores de diversos outros tipos de câncer (CHENG, 2015). No soro de pacientes com câncer de mama também foram encontrados miRs circulantes capazes de diferenciar controles saudáveis de pacientes com a doença, até em

estágios mais iniciais (ZHANG et al., 2017) e de refletirem a progressão tumoral, visto que determinados miRs circulantes podem estar em maiores níveis no sangue de pacientes com câncer de mama em estágio mais avançado quando comparadas com pacientes com câncer de mama em estágios iniciais (ROTH et al., 2010). Os miRs circulantes podem possibilitar a detecção precoce da doença, o que é de extrema importância para reduzir a taxa de mortalidade além de permitir tratamentos menos invasivos, capaz de suprir as falhas de sensibilidade de métodos de diagnóstico comuns (PIMENTEL et al., 2015). No caso das pacientes jovens, podem auxiliar na detecção da doença, já que esse grupo de pacientes tem um parênquima mamário com maior densidade, tornando difícil a diferenciação de tecido normal e tumoral por mamografia (HARTMANN, REIMER, GERBER, 2011).

O crescente interesse nesses miRs circulantes é observado principalmente pois eles se mantêm estáveis, protegidos das degradações por RNAses endógenas e apresentam diferentes níveis de expressão em diferentes condições patológicas (SCHWARZENBACH et al., 2014; SCHOONEVELD, 2015), além de apresentarem um fácil acesso e de forma não-invasiva com facilidade de inclusão na rotina laboratorial (BERTOLI, CAVA, CASTIGLIONI, 2015; SWELLAM et al., 2018).

Os miRs circulantes podem ser liberados na corrente sanguínea de duas maneiras gerais: a maioria associados com proteínas, principalmente Argonauta-2 (ARROYO et al., 2011), ou dentro de vesículas extracelulares - não apenas por células apoptóticas, mas também por liberação constitutiva de exossomos e microvesículas (SCHWARZENBACH et al., 2014)

1.3 Vesículas Extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) desempenham um papel essencial de comunicação entre células vizinhas e distantes (TKACH e THÉRY, 2016), influenciando diversos processos biológicos principalmente por meio da transferência de seu conteúdo (ácidos nucleicos, proteínas, lipídios) no citoplasma de células receptoras (YOON, KIM e GHO, 2014). As VEs podem

ser classificadas conforme sua biogênese e seu tamanho. As três principais classificações são:

a) **Corpos apoptóticos:** possuem tamanho aproximado de 1-5µm de diâmetro e são liberados por células que estão em apoptose.

b) **Microvesículas:** vesículas grandes com bicamada lipídica descrita pela primeira vez em 1946 por Chargaff e West. Possuem aproximadamente 100-1000 nm de diâmetro e são formadas por brotamento da membrana plasmática.

c) **Exossomos:** Descritos primeiramente em 1981 por Trams et al., são vesículas com bicamada lipídica de aproximadamente 50-100 nm liberadas por diversos tipos celulares. São liberadas a partir da fusão de endossomos multivesiculares (grande estrutura endosomal com várias vesículas em seu interior) com a membrana plasmática. Podem agir por meio do contato entre a superfície de moléculas das vesículas e células, endocitose e fusão entre a membrana da vesícula e da célula. (VALADI et al., 2007; GYÖRGY et al., 2011; VAN DER POL et al., 2012; CRESCITELLI et al., 2013; MINCIACCHI, FREEMAN, VIZIO, 2015).

A liberação de VEs foi observada em diversos tipos celulares e sua presença detectada em fluidos biológicos como sangue, urina e leite materno (MORHAYIM, BARONCELLI e LEUWEN, 2014), sua interação com células ocorre em condições fisiológicas, mas também podem regular mecanismos celulares na presença de doenças infecciosas, neurodegenerativas e também no câncer (YOON, KIM e GHO, 2014), onde os níveis de exossomos são mais elevados quando comparados com indivíduos saudáveis (MELO et al., 2014).

Acredita-se que os exossomos/microvesículas derivados de células tumorais podem ter importante papel no microambiente tumoral (fibroblastos) além de agir em células distantes (células imunes e alteração na estrutura da matriz extracelular) e modificar células normais e saudáveis por meio da ação das biomoléculas que transportam, como os microRNAs. A transferência de miRNAs pode causar uma regulação epigenética nas células receptoras, regulando negativamente os mRNAs nessas células e alterando suas funções (YOON, KIM e GHO, 2014; WHITESIDE, 2015; MINCIACCHI, FREEMAN, VIZIO, 2015).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que os miRs transportados por VEs, são capazes de conferir resistência a drogas nas células de câncer de mama (CHEN et al., 2014; MAO et al., 2016), estimular a proliferação (WEI et al., 2016) e alterar o potencial metastático (BARONI et al., 2016).

Nosso objetivo, então, foi verificar se os 8 miRs (miR-9-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-18b-5p, miR-210-3p, miR-33b, miR-372-3p, miR-518a-3p) encontrados previamente nos tumores de mama por BASTOS et al., 2016 também poderiam ser encontrados circulantes no plasma das pacientes e se também seriam capazes de diferenciar os grupos de idade (jovens *versus* meia-idade), além de verificar se estariam sendo transportados por meio das VEs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar se a diferença de expressão de 8 microRNAs identificada em tumores congelados na comparação de dois grupos de idade (≤ 35 anos versus 50-69 anos) em estudo anterior do grupo pode ser encontrada também em plasma de pacientes de grupos independentes com câncer de mama ductal invasivo, subtipo luminal e baixo risco de mutação em BRCA1/BRCA2.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil clínico-patológico de todas pacientes admitidas no Serviço de Mastologia do ICESP no período de dois anos.
2. Selecionar amostras de plasma de pacientes com idade ≤ 35 anos e de pacientes com idade entre 50-69 anos, com carcinoma ductal invasivo, subtipo luminal e baixo risco de mutação.
3. Verificar a presença de 8 microRNAs (miR-9-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-18b-5p, miR-210-3p, miR-33b-5p, miR-518a-3p, miR-372-5p) no plasma de pacientes dos dois grupos de idade.
4. Após determinação da expressão dos 8 microRNAs no plasma, verificar se a diferença encontrada no tecido congelado também é encontrada no plasma.
5. Isolar vesículas extracelulares do plasma e verificar presença ou não dos microRNAs em seu conteúdo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise de prontuários

Após aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - nº 503/15 (Anexo A), foram consultados dados de prontuários de pacientes do serviço de Mastologia do ICESP por meio do banco de dados do hospital (TASY) e coletados os dados clínico-patológicos disponíveis.

3.1.1 Perfil dos Pacientes do Serviço de Mastologia do ICESP

Com o propósito de verificar qual o perfil das pacientes admitidas no serviço de Mastologia do ICESP, foi realizado o levantamento de informações pelos prontuários eletrônicos (período de 01/abril/2016 até 30/abril/2018) como: idade das pacientes, expressão de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2* - HER-2), marcador de proliferação Ki67, grau nuclear (GN), grau histológico (GH), tamanho dos tumores (T), acometimento dos linfonodos (N) e a frequência de metástases (M) em todas as pacientes que deram entrada no serviço de Mastologia do ICESP durante esses dois anos.

Os fenótipos moleculares foram considerados conforme informado em laudos de exames imunohistoquímicos, classificados conforme Tabela 1:

Tabela 1. Critérios de classificação dos fenótipos moleculares

Fenótipo	ER	PR	HER-2	Ki67
Luminal A	+	+	-	<15%
Luminal B	+	+/-	-	≥ 15%
Luminal HER-2+	+	+/-	+	SR
HER-2	-	-	+	SR
Triplo Negativo	-	-	-	SR

SR: *Sem Relevância*

Fonte: Cheang et al., 2009.

O estadiamento dos tumores foi determinado conforme o manual do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 7^a edição.

Tabela 2. Estadiamento dos Tumores de Mama

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	TI	N0	M0
IIA	T0-1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0-2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
IIIB	T4	N0-2	M0
IIIC	qualquer T	N3	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1

Tis: tumor *in situ*

3.2 Seleção das amostras

A seleção das amostras de plasma para a análise no presente estudo foi realizada seguindo os critérios de inclusão relacionados com:

- **Idade:** pacientes com idade ≤ 35 anos (idade recomendada por HAN e KANG, 2010) ou 50-69 anos;
- **Diagnóstico:** Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) de mama com exame imunohistoquímico positivo para luminal A, luminal B ou luminal HER-2+;
- **Baixo risco de mutação em *BRCA1/BRCA2*:** pacientes que não possuíam um ou mais familiares próximos (primeiro, segundo e terceiro grau) com câncer de mama em idade ≤ 50 anos ou com dois ou mais parentes próximos com câncer de mama e/ou pâncreas em qualquer idade ou um ou mais familiares próximos com câncer de ovário em qualquer idade, conforme os critérios da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*);
- **Tratamento:** as amostras foram consideradas viáveis apenas quando a coleta de sangue ocorreu antes de qualquer tipo de intervenção (quimioterapia neoadjuvante ou cirurgia).

As pacientes selecionadas receberam esclarecimentos sobre a utilização das amostras cedidas para pesquisas do instituto e as que concordaram participar voluntariamente, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a coleta de sangue foi realizada por enfermeiros de pesquisa do Biobanco em tubos de coleta a vácuo com EDTA conforme protocolo de coleta do ICESP.

Para inclusão de mais pacientes jovens foi realizada uma cooperação com o Hospital do Câncer de Barretos (HCB), sob a supervisão do Dr. René A.C. Vieira. Para inclusão desse hospital como colaborador, foi realizada uma emenda na Plataforma Brasil e a solicitação encaminhada ao CEP foi aprovada.

As pacientes selecionadas foram divididas em dois grupos denominados **GJ (Grupo Jovem)** e **GMI (Grupo Meia-Idade)** conforme idade:

Tabela 3. Características dos Grupos do estudo

	GJ	GMI
Idade	≤ 35 anos	50-69 anos
Diagnóstico	Luminal A, Luminal B, Luminal HER-2+	Luminal A, Luminal B, Luminal HER-2+
Mutação ⁽¹⁾	Baixo Risco de Mutação em <i>BRCA1/BRCA2</i>	Baixo Risco de Mutação em <i>BRCA1/BRCA2</i>
Tratamento Prévio	Sem	Sem

⁽¹⁾: Conforme os critérios da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*).

3.2.1 Processamento das Amostras Selecionadas

Após a coleta no ICESP em tubos com EDTA, as amostras de sangue foram processadas em até 50 minutos com centrifugação por 10 minutos a 3.000 g em temperatura ambiente e o plasma foi transferido para um microtubo de 2 mL com número de identificação da amostra e armazenados no freezer - 80°C em caixas devidamente identificadas até o momento da extração do RNA circulante.

No HCB, a coleta também foi realizada em tubo com EDTA e as amostras de sangue foram processadas em até 3 horas com centrifugação de 3.000 g por 10 minutos a 4°C e as alíquotas de plasma foram armazenadas em freezer -80°C.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA CIRCULANTE NO PLASMA

O primeiro experimento realizado nas amostras selecionadas foi a extração do RNA total. Para isso, foi utilizado o kit **miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids** da Exiqon, que consiste em uma técnica para isolar RNAs menores que 1000 nucleotídeos. Através do método de cromatografia, os RNAs pequenos foram separados de outros componentes celulares.

Na primeira parte, em 200 µL de amostras de plasma, foram adicionados 10 µL de Proteinase K (20 mg/mL) seguida de incubação a 37°C por 10 minutos para promover a inativação das nucleases que poderiam degradar o RNA. As membranas celulares e partículas foram lisadas através da adição da solução de lise (60 µL de *Lysis Solution BF*) e foram acrescentados 1,25 µL de MS2 (0,8 µg/µL - Roche) RNA carreador que aumenta a recuperação dos microRNAs, com o auxílio do vórtex por 5 segundos, esses reagentes foram misturados às amostras tratadas com Proteinase K e incubados em temperatura ambiente por 3 minutos. Para precipitação das proteínas, foram adicionados 20 µL de *Protein Precipitation Solution BF*, a mistura foi agitada no vórtex por 5 segundos e foi feita uma incubação de 1 minuto em temperatura ambiente e, em seguida, uma centrifugação de 11.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet formado foi desprezado. Foram adicionados 270 µL de isopropanol para precipitar o RNA e essa solução foi agitada por 5 segundos por meio do vórtex e transferida para um tubo de coleta com a *mini spin column BF*. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugados a 11.000 g por 30 segundos. Ocorreu a ligação do RNA à resina, enquanto as proteínas residuais não ficaram aderidas e foram eliminadas pelos processos de lavagem que consistiram na adição de 700 µL de *Wash Solution 2 BF* na coluna e centrifugação de 11.000 g por 30 segundos. O filtrado gerado foi descartado e a lavagem seguinte foi feita pela

adição de 250 µL de *Wash Solution 2 BF* e centrifugação de 11.000 g por 2 minutos. Após esses passos, as amostras foram tratadas com 50 µL de rDNase e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada uma nova sequência de lavagens. A primeira pela adição de 100 µL de *Wash Solution 1BF* e centrifugação por 30 segundos a 11.000 g, a segunda 700 µL de *Wash Solution 2BF* e centrifugação de 11.000 g por 30 segundos e a última pela adição de 250 µL de *Wash Solution 2 BF* e centrifugação de 11.000 g por 2 minutos. Após todos esses passos de lavagens, os filtrados gerados foram descartados, mantidas apenas as colunas. Foram adicionados diretamente na membrana da coluna 50 µL de água RNase-free para que o conteúdo aderido fosse eluído. O tubo foi incubado por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugado a 11.000 g por 1 minuto. O filtrado gerado foi armazenado em freezer a -80°C até o momento da realização da reação de síntese de cDNA (DNA complementar).

3.4 PCR em Tempo-Real (qPCR)

Foram determinados os níveis de expressão dos miRs:

Tabela 4. MicroRNAs-alvos

microRNA	Posição genômica	Região genômica	Sequência
hsa-miR-9-5p	1q22	Intergênico	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-106a-5p	Xq26.2	Intergênico	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-106b-5p	7q22.1	Intragênico	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
hsa-miR-18b-5p	Xq26.2	Intergênico	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
hsa-miR-210-3p	11p15.5	Intergênico	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-33b-5p	17p11.2	Intragênico	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC
hsa-miR-518a-3p	19q13.42	Intergênico	GAAAGCGCUUCCCUUUGCUGGA
hsa-miR-372-3p	19q13.42	Intergênico	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU

Além desses alvos, também foram incluídas as avaliações dos níveis de expressão de dois miRs como possíveis normalizadores:

Tabela 5. Candidatos a microRNAs normalizadores

microRNA	Posição genômica	Região genômica	Sequência
hsa-miR-21-5p	17q23.1	Intergênico	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-425-5p	3p21.31	Intergênico	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA

3.4.1 TAQMAN® ADVANCED MIRNA ASSAYS

Os kits **Taqman Advanced miRNA Assays** e **Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis** foram escolhidos para fazer a determinação de expressão dos microRNAs para posteriormente compará-la entre os dois grupos de idade.

O kit é feito para analisar os níveis de expressão de microRNAs maduros a partir de 1-10 ng de RNA total do tecido ou a partir de 2 µL de RNA total do plasma ou soro e permite a análise de múltiplos microRNAs a partir de uma única amostra amplificada.

A partir do RNA extraído das amostras de plasma, foi realizada a reação de síntese de cDNA. A primeira parte do experimento consistiu na **Reação de Adição da Cauda de Poli(A)** na extremidade 3' do microRNA maduro, que serve como sítio de ligação da enzima Transcriptase Reversa.

Todos os reagentes de todos os passos ficaram armazenados em freezer -20°C e foram descongelados em gelo minutos antes do início do experimento, exceto pelas enzimas descongeladas imediatamente antes do uso. Foi preparada uma mistura com 0,5 µL de *Poly (A) Buffer* (10x), 0,5 µL de ATP (10 mM), 0,3 µL de *Poly (A) Enzyme* (5 U/µL) e 1,7 µL de água RNase-free para cada amostra. Em cada tubo foram adicionados 3 µL dessa mistura e 2 µL do RNA extraído do plasma, conforme indicado pelo fabricante. Essa mistura com volume de 5 µL foi agitada com auxílio do vórtex e em seguida *spin*. Esses tubos foram colocados no termociclador e incubados por 45 minutos a 37°C (*polyadenylation*), posteriormente a 65°C por 10 minutos (*stop reaction*) e depois mantidos a 4°C (*hold*) até a retirada dos tubos do aparelho, esse passo está esquematizado na **figura 5A**.

O próximo passo consistiu na **Reação de Ligação do Adaptador** na extremidade 5' que serve como sítio de ligação para a reação de amplificação, realizada imediatamente após a retirada do produto da reação da cauda de poli(A) do termociclador. Os reagentes foram descongelados minutos antes do uso, exceto pela enzima que foi descongelada apenas no momento do uso e pela solução de Polietilenoglicol 50% (PEG-8000) que foi retirado do freezer e deixado em bancada assim que a primeira etapa deste protocolo foi iniciada, pois no momento do seu uso é indicado que este reagente esteja em temperatura ambiente.

Uma mistura foi preparada com 3 µL de *DNA Ligase Buffer* (5x), 0,6 µL de *Ligation Adaptor* (25x), 1,5 µL de *RNA Ligase* (10 U/ µL), 0,4 µL de água RNase-free e 4,5 µL de 50% PEG 8000 (reagente muito viscoso, então no momento da aspiração, a pipeta foi mantida dentro do tubo durante 10 segundos e no momento que foi dispensado na mistura também foi mantida pressionada pelo mesmo tempo para garantir que todo conteúdo tenha sido dispensado). A mistura foi agitada pelo vórtex seguido de *spin* e, em cada tubo contendo todo o produto da reação da cauda de poli(A) foi transferido 10 µL dessa mistura, tendo então um volume total de 15 µL por tubo. Seguido por agitação em vórtex e *spin*. Esses tubos foram colocados no termociclador por 60 minutos a 16°C (*ligation*) e mantidos a 4°C (*hold*) até o momento dos tubos serem retirados do aparelho. Essa etapa está esquematizada na **figura 5B**.

Imediatamente após esse passo, foi iniciada a **Reação de Transcrição Reversa**. Foi preparada uma mistura contendo 6 µL de *RT Buffer* (5x), 1,2 µL de *dNTP Mix* (100 mM), 1,5 µL de *Universal RT Primer* (20x), 3 µL de *RT Enzyme Mix* (10x) e 3,3 µL de água RNase-free. Em cada tubo com todo o produto da reação de ligação do adaptador, foram adicionados 15 µL dessa nova mistura. A mistura foi agitada com o auxílio do vórtex seguido por *spin*. Posteriormente foram incubados por 15 minutos a 42°C (*reverse transcription*) e por 5 minutos a 85°C (*stop reaction*) e foram mantidos a 4°C (*hold*) até o momento dos tubos serem retirados do aparelho. Essa etapa está esquematizada na **figura 5C**.

O cDNA gerado foi então submetido à **Reação de Amplificação**, que consistiu no preparo de uma mistura com 25 µL de *miR-Amp Master Mix* (2x),

2,5 μL de *miR-Amp Primer Mix* (20x) e 17,5 μL de água RNase-free. Essa mistura foi agitada no vórtex, seguido de *spin*. Foram adicionados 45 μL dessa mistura em 5 μL do produto da reação de transcrição reversa e esses tubos foram agitados por vórtex e *spin* antes de serem colocados no termociclador e incubados por 5 minutos a 95°C (*enzyme activation*) por 1 ciclo, 3 segundos a 95°C (*denature*) por 14 ciclos, por 30 segundos a 60°C (*anneal/extend*) por 14 ciclos, por 10 minutos a 99°C (*stop reaction*) por 1 ciclo e mantidos a 4°C (*hold*) até o momento que foram retirados do aparelho. Essa etapa está esquematizada na **figura 5D**.

Figura 5. Síntese de cDNA. (A) Reação de Adição da cauda de poli(A); (B) Reação de Ligação do Adaptador; (C) Reação de Transcrição Reversa; (D) Reação de Amplificação.

Fonte: Modificada de Taqman® Advanced miRNA cDNA Synthesis Assays User Guide.

O cDNA amplificado ficou armazenado em freezer -20°C até o momento do preparo da placa de qPCR. Para essa etapa, o cDNA amplificado foi diluído 1:10 em Tris-EDTA (TE) Buffer, pH 8.0 (0,1x). Foi preparado uma mistura com 5 µL de *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (2x), 0,5 µL de *Taqman® Advanced miRNA Assay* (20x) e 1,5 de água RNase-free para cada poço da placa. Essa mistura foi agitada com o auxílio do vórtex e *spin*. Em cada poço da placa (Micro-Amp® **Fast** 96-Well Reaction Plate – Applied Biosystems®) foram adicionados 7 µL dessa mistura e 3 µL do cDNA amplificado diluído. O volume final da reação foi de 10 µL em cada poço. Para cada amostra foram feitas reações em triplicatas. A placa foi selada com *sealing* óptico e agitada com o auxílio do vórtex, seguida de *spin*.

A placa foi colocada no aparelho *StepOnePlus™ Real Time PCR System*. A programação realizada consistia em 1 ciclo de 20 segundos a 90°C para ativação da enzima e 40 ciclos de 95°C por 1 segundo (desnaturação) e 60°C por 20 segundos (anelamento/extensão).

Os valores de *threshold* foram determinados manualmente.

Durante a qPCR, os primers *forward* e *reverse* se anelam em sequências complementares ao cDNA desnaturado. A sonda se liga especificamente na sequência complementar entre os dois primers e possui em uma extremidade o repórter (emite fluorescência) e na outra extremidade o *quencher* (silenciador). A DNA polimerase, por meio da sua atividade exonuclease, cliva as sondas que estão hibridizadas com as sequências-alvo. Essa quebra faz com que o repórter se separe do *quencher*, resultando no aumento de liberação da fluorescência, conforme demonstrado no esquema da **figura 6**.

Legenda:

Hot-start da DNA polimerase

Repórter

Quencher

Figura 6. Funcionamento da sonda Taqman.

Fonte: Modificada de Taqman® Advanced miRNA cDNA Synthesis Assays User Guide.

3.4.2 Normalização dos dados

Após a realização da reação de PCR, é de extrema importância normalizar os dados gerados para reduzir erros comuns causados, por exemplo, por diferença na qualidade e quantidade dos cDNAs e na eficiência da transcrição reversa. Para isso, algumas ferramentas podem ser utilizadas. Foram testados os miRs miR-21 e miR-425 e os miRs-alvos que apresentaram níveis de expressão detectáveis em mais de 95% das amostras, utilizando dois métodos: o programa *Normfinder* e o método de cálculo de ΔC_t (Ciclo de Threshold)/Desvio Padrão.

3.4.2.1 Programa *Normfinder*

O algoritmo desse programa identifica, dentre um grupo de genes candidatos, quais apresentam melhor estabilidade de expressão num grupo de amostras. Os dados são processados numa escala linear, então os valores de Ct foram convertidos para quantidades relativas (RQ). Para isso, foram identificados, **para cada microRNA**, o menor Ct encontrado e esse menor valor foi substituído por 1. Para os demais, a conversão foi realizada por meio da seguinte fórmula:

$$RQ = \frac{1}{2^{(Ct_{interesse} - Ct_{menor})}}$$

Os valores obtidos foram então inseridos no *software*. O programa gera um *stability value* para cada candidato, esse valor deve ser o mais próximo de zero possível para ser considerado um normalizador ideal. Além disso, também são realizadas análises de variação intra e intergrupo. Os candidatos que apresentarem grandes variações intergrupos devem ser eliminados.

São sugeridas combinações de genes como melhores normalizadores, deve-se calcular, então, a média geométrica entre esses dois candidatos para o cálculo de expressão da qPCR.

3.4.2.2 Método de ΔCt e Desvio Padrão

Esse método foi adotado por Silver et al. (2006) e é baseado na comparação da expressão relativa de “pares de genes” candidatos para normalizadores para cada amostra por meio da utilização de ΔCt , método similar ao adotado por Vandesompele et al. (2002).

A partir dos miRs candidatos (miR-21, miR-425 e todos os miRs-alvos que apresentaram níveis de expressão detectáveis em mais de 95% das amostras avaliadas), foram feitas as possíveis combinações de pares de microRNAs. Para cada par de miR foi realizado o cálculo de ΔCt , ou seja, o Ct de um miR subtraído pelo Ct do outro miR, em todas as amostras. Foi então

calculado a média do ΔCt e o Desvio Padrão também para cada par de miR. Os miRs que apresentaram os menores valores de Desvio Padrão, foram considerados os melhores normalizadores.

3.4.3 Cálculo de Expressão Gênica

A expressão gênica foi determinada utilizando o método de Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001), onde:

$$\Delta\Delta Ct = \underbrace{\Delta Ct \text{ (amostra de interesse)}}_{Ct_{\text{miR-alvo}} - Ct_{\text{miR-normalizador}}} - \underbrace{\Delta Ct \text{ (amostra referência)}}_{Ct_{\text{miR-alvo}} - Ct_{\text{miR-normalizador}}}$$

Foram consideradas apenas as amostras que apresentaram um Ct abaixo ou igual 38.

3.5 Isolamento das vesículas extracelulares por ultracentrifugação

As amostras de plasma foram submetidas a uma centrifugação de 10.000 g por 30 minutos a 4°C. Foi utilizado 1 mL ou a quantidade disponível do sobrenadante para o protocolo de ultracentrifugação e o pellet formado foi descartado.

Esse sobrenadante gerado após a centrifugação foi filtrado em filtro de 0,2 μm junto com o PBS 1x utilizado para completar o volume total do tubo utilizado (aproximadamente 10 mL).

As amostras foram submetidas a uma ultracentrifugação de 100.000 g por 2 horas a 4°C com o rotor SW - 41Ti (*Beckman L8-80M Ultracentrifuge, USA*).

Após a ultracentrifugação, todo o sobrenadante foi aspirado com auxílio de uma pipeta conectada ao sistema a vácuo. Foram adicionados 100 μL de PBS 1x para cada 1 mL de plasma em cada tubo e agitação com o auxílio do vórtex por 5 minutos para garantir que todas as vesículas aderidas ao fundo do tubo se desprendessem.

Para evitar o processo de descongelamento por diversas vezes, foram feitas 3 alíquotas: 1 com 10 μ L para utilização no protocolo de quantificação das vesículas, 1 com 20 μ L para realização do protocolo de extração de RNA e 1 com 70 μ L para futuros experimentos. Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C.

3.6 Análise de genes alvo do miR-9

Para avaliar quais genes podem ser regulados pelo miR-9, foi consultado o banco de dados miRWalk 2.0, que possui informações sobre interações de miR-alvo (DWEET et al., 2015). Foram obtidas informações sobre a interação de miRNA-gene-doença, sendo selecionadas as denominações: *Mammary câncer* [DOID: 1612], *Primary Breast Cancer* [DOID: 1648], *Ductal Breast Carcinoma* [DOID: 3008], *Breast Carcinoma* [DOID: 3459]. A partir desses resultados gerados, foi utilizado o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) para avaliar em quais vias esses genes estão envolvidos.

3.7 Quantificação das vesículas extracelulares

As vesículas foram quantificadas no equipamento *Nanosight* LIM-14 no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do hospital AC Camargo Câncer Center. Este equipamento é capaz de caracterizar as partículas de 10 nm - 2000 nm por meio da tecnologia *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), essa metodologia produz resultados da concentração e da distribuição de tamanho das partículas, determinada pela relação do movimento Browniano (movimento aleatório das partículas suspensas em líquidos, dependente da temperatura, viscosidade e diâmetro das partículas). O laser emitido pelo sistema atinge as partículas individualmente suspensas e dispersa a luz. Elas são então, detectadas por um microscópio óptico convencional em ampliação de 20x acoplado com uma câmera, capaz de determinar tamanho e concentração dessas partículas conforme demonstrado na **figura 7**.

Figura 7. Esquema do funcionamento Nanosight.

Fonte: Adaptado de Manual *Malvern Nanosight Range*.

Para a leitura por *Nanosight*, as vesículas isoladas por ultracentrifugação foram diluídas 100x em PBS 1x filtrado duas vezes no dia do experimento em filtro de 0,2 µm. Também foram quantificadas as partículas presentes no PBS 1x e foi realizado o cálculo para o resultado:

$$(\text{Partículas da amostra} - \text{Partículas do PBS 1x}) \times 100 = \text{Quantificação Final}$$

3.8 Extração de RNA das vesículas extracelulares

Para extrair os microRNAs presentes dentro das vesículas extracelulares, foi escolhido o kit **miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids** da **Exiqon**, o mesmo utilizado para extração de RNAs circulantes, porém com algumas pequenas mudanças no protocolo. Foram utilizados 20 µL provenientes do isolamento de vesículas extracelulares por ultracentrifugação e como a indicação é iniciar o protocolo com 200 µL de amostra, esse volume total foi completado com água RNase-free.

Foi realizada uma extração-teste com as amostras em 4 condições diferentes:

- 1) Amostras (20 µL do produto da ultracentrifugação + 180 µL de água RNase-free) sem qualquer tipo de tratamento;
- 2) Amostras tratadas com 1 µL de RNase A, seguida de incubação por 30 minutos à 37°C e com 10 µL de Proteinase K (20 mg/mL) seguida de incubação por 10 minutos à 37°C;

- 3) Amostras tratadas com 10 µL de Proteinase K seguida de incubação por 10 minutos à 37°C;
- 4) Amostras tratadas com Triton 0,3%, com 1 µL de RNase A, seguida de incubação por 30 minutos à 37°C e com 10 µL de Proteinase K seguida de incubação por 10 minutos à 37°C.

Após esses passos, em todas as condições, foi seguido o seguinte protocolo:

Em cada tubo foram adicionados 60 µL de solução de lise (*Lysis Solution BF*), 1,25 µL de MS2 (0,8 µg/µL - Roche) e 0,6 µL de 2-mercaptoetanol para inibir a RNase A. Após a adição dessa mistura nas amostras, foi feita incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 20 µL de uma solução para precipitar as proteínas contidas nas amostras (*Protein Precipitation Solution*), em seguida agitadas por vórtex durante 5 segundos e incubação por 1 minuto em temperatura ambiente. Foi realizada uma centrifugação de 11.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado, transferido para um novo tubo onde foram adicionados 270 µL de isopropanol, que promove a transição estrutural da molécula dos ácidos nucléicos, sua agregação e consequente precipitação, essa solução foi agitada por 5 segundos com auxílio do vórtex e foi transferida para o tubo contendo uma mini coluna (*mini spin column BF*). Em seguida foi feita uma incubação por 2 minutos em temperatura ambiente e realizada centrifugação por 30 segundos a 11.000 g. O filtrado foi descartado e foram iniciadas as lavagens da coluna contendo os RNAs aderidos. A primeira foi realizada com 700 µL da solução de lavagem (*Wash Solution 2BF*) e centrifugação de 11.000 g por 30 segundos, seguida de outra com 250 µL da mesma solução e centrifugação de 11.000 g por 2 minutos com descarte do filtrado formado após cada centrifugação. Foram adicionados 50 µL de rDNase diretamente na membrana da mini coluna e feita incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. As colunas foram novamente submetidas às lavagens. A primeira com 100 µL de *Wash Solution 1BF* e centrifugação de 11.000 g por 30 segundos, em seguida nova lavagem com 700 µL de *Wash Solution 2BF* e centrifugação de 11.000 g por 30 segundos e, por último, uma lavagem de 250 µL com *Wash Solution 2BF* e

centrifugação de 11.000 g 2 minutos para garantir a eliminação de todas as proteínas residuais que não estavam aderidas à coluna.

A coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 30 µL de água RNase-free diretamente na coluna para a eluição do RNA total. Foi realizada uma incubação de 1 minuto em temperatura ambiente e uma centrifugação de 11.000 g por 1 minuto.

O material eluído foi armazenado em alíquotas em freezer -80°C até o momento do preparo do cDNA.

3.9 Controle da Qualidade da Extração de RNA das Vesículas Extracelulares

Para verificar se as condições de extração apresentaram os resultados esperados, foi realizada uma qPCR com o kit **miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR**, para verificar os níveis de expressão de um miR endógeno (miR-16) em cada condição descrita no item 3.8. O primeiro passo foi a síntese do cDNA (kit *Universal cDNA synthesis*), para isso, todos os reagentes foram descongelados 15-20 minutos antes do início do experimento e mantidos em gelo. Foi preparada uma mistura contendo 2 µL de 5x *Reaction Buffer* (5x), 1 µL de água *Nuclease-free* e 1 µL de *Enzyme Mix* (10x) para cada tubo. Em cada um desses tubos contendo 4 µL dessa mistura, foram adicionados 6 µL de RNA extraído conforme item 3.6. Os tubos foram submetidos a um *spin* e vórtex e foram colocados no termociclador com a seguinte programação: 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C e mantidas a 4°C até o momento da retirada dos tubos do aparelho. Para o preparo da placa de PCR, o cDNA sintetizado foi diluído 50x e foi preparada uma mistura contendo: 5 µL de *SYBR Green Máster Mix* (2x), 0,04 µL de ROX (25 µM) e 1 µL do PCR Primer Mix (miR-16) para cada poço da placa. Além de 6,04 µL dessa mistura em cada poço, também foram adicionados 4 µL de cDNA diluído. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

A placa (Micro-Amp® Fast 96-Well Reaction Plate – Applied Biosystems®) foi selada com *sealing* óptico, foi dado um *spin* de 1.500 g por 1 minuto e a placa foi colocada no aparelho *StepOnePlus™ Real Time PCR*

System. A programação realizada consistia em 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 40 ciclos de 60°C por 1 minuto.

Nesse método, uma cauda de poli (A) é adicionada ao miR maduro (**figura 8A**) e o cDNA é sintetizado por um primer poli (T) (**figura 8B**), ocorre a amplificação do cDNA por meio dos primers específicos (**figura 8C**) e a detecção ocorre quando a molécula fluorescente SYBR Green se intercala na fita dupla de cDNA formada, emitindo a fluorescência que é diretamente proporcional a quantidade de cDNA amplificado (**figura 8D**).

Figura 8. Funcionamento do sistema miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR.

Fonte: Adaptado do manual miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR.

3.10 Determinação da expressão dos miRs em vesículas extracelulares por PCR em tempo real (qPCR)

A partir dos miRs extraídos das amostras de vesículas extracelulares, conforme explicado no item 3.8 (condição 2), foi realizada a reação de síntese de cDNA com o kit **Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis** e feita a reação de qPCR com o kit **Taqman Advanced miRNA Assays**, conforme descrito no item 3.4.1.

3.11 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados por meio do programa IBM SPSS® *Statistics* 22 para comparação entre as frequências de características clínico-patológicas entre os dois grupos de idade e também para determinação das diferenças de expressão dos microRNAs entre os grupos. Foram considerados dados estatisticamente diferentes quando o valor de $p < 0,05$.

Resumidamente, as etapas foram:

Figura 9. Fluxograma das técnicas do estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Prontuários

4.1.1 Levantamento Geral

Para determinar quais as principais características clínico-patológicas de pacientes admitidos no serviço de Mastologia do ICESP, foram avaliados os prontuários eletrônicos por meio do sistema de base de dados de pacientes (TASY) no período de 01/abril/2016 até 30/abril/2018.

O número total de pacientes novos atendidos neste período foi de 1317, com uma média de 52 casos mensais, conforme demonstrado na **figura 10**. Foram excluídos da análise os prontuários de pacientes que desistiram do atendimento ou mudaram de hospital (30), que se consultaram apenas para acompanhamento por alto risco familiar ou presença de tumores benignos (29) e os homens (18), restando **1240** prontuários para análise.

Figura 10 – Casos de pacientes com câncer de mama atendidos no serviço de Mastologia do ICESP no período de abril/2016 até abril/2018

Nesses 1240 prontuários, foram avaliados idade, tipo histológico, fenótipo molecular, tamanho dos tumores, acometimento de linfonodos,

presença de metástase e o tipo de tratamento que as pacientes foram submetidas.

Conforme mostrado na tabela 6, a maior parte das pacientes possuía entre 51-60 anos (28,47%) e a minoria idade ≤ 35 anos (4,6%).

Tabela 6. Frequência de idade das pacientes com câncer de mama atendidas no ICESP

Idade	n (%)
≤ 35 anos	57 (4,6%)
36-40 anos	84 (6,8%)
41-50 anos	289 (23,3%)
51-60 anos	353 (28,5%)
61-70 anos	244 (19,7%)
71-80 anos	148 (11,9%)
81 ou +	65 (5,2%)

Dessas 1240 pacientes, 22 (1,77%) apresentaram tumores bilaterais. Das que apresentaram tumores unilaterais (n= 1218), a maioria possuía diagnóstico para carcinoma Ductal Invasivo não-especial (CDI), seguido por carcinoma Ductal *in situ* (CDIS). As frequências dos principais tipos histológicos estão expostas na tabela 7.

Tabela 7. Frequência dos tipos histológicos identificados nos pacientes do ICESP

Tipo Histológico	n (%)
Ductal Invasivo	918 (75,37%)
Ductal <i>In Situ</i>	83 (6,81%)
Lobular Invasivo	73 (6%)
Misto	49 (4,02%)
Outros	95 (7,8%)

Dentre os casos de CDI (n=918), a maioria (n = 422; 45,97%) foi classificada como Luminal B pelo método de imunohistoquímica conforme verificado nos laudos do prontuário de cada paciente. O fenótipo menos frequente (n = 71; 7,73%) encontrado foi o HER-2.

Em relação aos fenótipos moleculares determinados por imunohistoquímica, houve uma maior frequência de tumores Luminal B e o fenótipo menos incidente encontrado foi o HER-2, conforme demonstrado na **figura 11**.

Figura 11. Distribuição do número de casos, metástase e óbitos dos fenótipos moleculares de Carcinomas Ductais Invasivos

Os prontuários que não apresentaram informações sobre a imunohistoquímica dos tumores foram ocultados da figura.

4.1.2 Comparação geral das características tumorais entre as pacientes jovens (≤ 35 anos) e de meia-idade (50-69 anos) admitidas no ICESP

A partir dos dados gerais dos tumores das pacientes jovens com ≤ 35 anos ($n=57$) e das pacientes de meia-idade com 50-69 anos ($n = 618$) que foram consultadas no Serviço de Mastologia do ICESP no período de 2 anos, foram separados os casos de CDI (Jovens: $n = 47$ e Meia-idade: $n = 439$) para comparar as principais características clínico-patológicas desses carcinomas, porém não foram observadas diferenças relacionadas com prognóstico (fenótipo molecular, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos, metástase, graus histológico e nuclear), conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 8. Comparação das características clínico-patológicas entre as pacientes jovens e de meia-idade atendidas no ICESP

	n (%) Jovem	n (%) Meia-Idade	p
Idade			
Média	31 anos	58 anos	
Mediana	32 anos (DP: 4,06)	58 anos (DP: 5,6)	
Fenótipo Molecular			
Luminal A	7 (14,89%)	88 (20,05%)	0,838
Luminal B	21 (44,68%)	187 (42,6%)	
Luminal HER-2+	9 (19,15%)	55 (12,53%)	
Triplo Negativo	6 (12,77%)	64 (14,58%)	
HER-2	4 (8,51%)	41 (9,34%)	
NA	0	4 (0,9%)	
Tamanho do Tumor			
T1 e T2	26 (55,32%)	273 (62,18%)	0,358
T3 e T4	21 (44,68%)	158 (36%)	
NA	0 (0%)	8 (1,82%)	
Linfonodos Acometidos			
N0	20 (42,55%)	209 (47,6%)	0,477
N+	27 (57,45%)	221 (50,35%)	
NA	0	9 (2,05%)	
Metástase			
M0	35 (74,47%)	352 (80,18%)	0,695
M1	10 (21,28%)	78 (17,77%)	
NA	2 (4,25%)	9 (2,05%)	
Grau Histológico			
I e II	34 (72,34%)	306 (69,71%)	0,921
III	12 (25,53%)	121 (27,56%)	
NA	1 (2,13%)	12 (2,73%)	
Grau Nuclear			
I e II	15 (31,91%)	158 (36%)	0,850
III	31 (65,96%)	271 (61,73%)	
NA	1 (2,13%)	10 (2,27%)	

NA: Não Avaliado

Teste: χ^2 -quadrado

4.2 AMOSTRAS DE PLASMA SELECIONADAS

Para seleção das pacientes do Grupo Jovem (GJ), foram inseridas no estudo amostras de pacientes com os critérios de inclusão (item 3.2) de três formas:

- **Amostras do Biobanco (n=2):** amostras que já haviam sido coletadas e estavam armazenadas no Biobanco do ICESP;
- **Amostras de pacientes admitidas no período de coleta do estudo (n=13):** das 57 pacientes que foram admitidas no serviço de mastologia com a idade de interesse (≤ 35 anos), 44 não tiveram coleta de amostra solicitada por não terem diagnóstico de Carcinoma Ductal Invasivo, por apresentarem tumores Triplo Negativos ou HER-2, por terem sido submetidas ao tratamento Neoadjuvante antes do momento da coleta, por possuírem forte histórico familiar de casos de câncer de mama ou por apresentarem mutação em BRCA1;
- **Amostras do HCB (n=9):** foram solicitadas para o HCB amostras de plasma de pacientes com características clínico-patológicas similares às características das amostras do ICESP já incluídas no estudo.

Portanto, o n final obtido para o GJ foi de 24 pacientes.

Para amostras do Grupo Meia-Idade (GMI), foram incluídas:

- **Amostras do Biobanco (n=9):** amostras que já haviam sido coletadas e estavam armazenadas no Biobanco do ICESP;
- **Amostras de pacientes admitidas no período de coleta do estudo (n=12):** foram solicitadas as coletas dessas pacientes conforme foram admitidas no serviço.

Portanto, o n final obtido para o GMI foi de 21 pacientes. As principais características clínico-patológicas dos tumores das pacientes selecionadas para o estudo (n= 45) estão expostas na tabela 9.

Tabela 9. Principais características dos tumores das pacientes participantes do estudo

	Grupo Jovem	Grupo Meia-Idade	p
Idade			
Média	31 anos	52 anos	
Mediana	32 anos (DP: 3,5)	56 anos (DP: 5,01)	
Fenótipo Molecular			
Luminal A	6 (25%)	8 (38,1%)	0,098
Luminal B	11 (45,8%)	12 (57,1%)	
Luminal HER-2+	7 (29,2%)	1 (4,8%)	
Estadiamento			
I e II	15 (62,5%)	14 (66,7%)	0,771
III e IV	9 (37,5%)	7 (33,3%)	
Grau Histológico			
I e II	17 (70,8%)	19 (90,5%)	0,1
III	7 (29,2%)	2 (9,5%)	
Grau Nuclear			
I e II	9 (37,5%)	11 (52,4%)	0,316
III	15 (62,5%)	10 (47,6%)	
Teste: x ² -quadrado			

Teste: χ^2 -quadrado

Informações completas de cada paciente estão descritas em Anexo B. Nenhuma das pacientes relatou risco por exposição ocupacional e para nenhuma foi solicitada a realização do teste genético para mutação de BRCA1/BRCA2 por não apresentarem histórico familiar.

4.3 Determinação dos Níveis de Expressão dos miRs por PCR em tempo-real (qPCR)

Foram avaliados os níveis de expressão de dois candidatos (miR-21-5p e miR-425-5p) para normalizadores e de todos os 8 microRNAs-alvo, porém, os **miR-372-3p** e **miR-518a-3p** não foram detectados em nenhuma amostra de plasma avaliada.

Além disso, duas amostras (**3556 PCSS** do GJ e **3961 RSB** do GMI), não apresentaram expressão de nenhum microRNA avaliado. Restaram 23

amostras de pacientes jovens (GJ) e 20 amostras de pacientes de meia idade (GMI) para análise. Quando foram encontrados valores de $Ct > 38$, ou resultados de expressão como “não determinada”, foram feitas as repetições dos experimentos, novamente em triplicata, para confirmar se a expressão daquela amostra ou miR não era realmente detectável. Foram aceitos variações de até 0,3 entre as triplicatas.

4.3.1 Normalização dos Dados da qPCR

4.3.1.1 *Normfinder*

Após a conversão dos valores de Ct para escala linear, os candidatos para normalizadores foram testados com o programa *Normfinder*. O resultado obtido está exposto na tabela 10.

Tabela 10. Resultado *Normfinder*

Candidato	<i>Stability value</i>
miR_21	0,181
miR_425	0,195
miR_9	0,354
miR_106a	0,254
miR_106b	0,222
miR_18b	0,165

Portanto, segundo este método, o melhor microRNA normalizador foi o **miR-18b** (*stability value*: 0,165) e, a melhor combinação de genes normalizadores encontrados foram os **miR-18b** e **miR-21** (*stability value*: 0,120).

4.3.1.2 Normalização pelo método de ΔCt e Desvio Padrão

Nesse método, é determinado qual melhor normalizador a ser utilizado comparando as variações de Ct (ΔCt) encontradas em pares de miRs-candidatos a normalizadores em cada amostra.

Os Cts encontrados nos miRs-candidatos estão expostos na **figura 12**.

Figura 12. Valores de Ct dos miRs candidatos a normalizadores

A partir desses dados de valores de Ct, foram realizadas as combinações possíveis de pares desses candidatos, conforme demonstrado na **Figura 13**.

Figura 13. Combinações analisadas no cálculo de normalizador por ΔCt

Para cada amostra foi realizada o cálculo de ΔCt em todas as combinações (ex.: Ct_{miR-21} da amostra de interesse – $Ct_{miR-425}$ da amostra de interesse). A partir

desses valores, foi calculada a média para cada possível combinação, assim como o Desvio Padrão e sua média, conforme mostrado na **tabela 11**.

Tabela 11. Cálculo de Normalizador pelo método ΔCt

Combinações	Média ΔCt	Desvio Padrão	Média Desvio Padrão
miR-21 <i>versus</i> miR-425	-1,62	1,12	1,284
miR-21 <i>versus</i> miR-9	-7,93	1,38	
miR-21 <i>versus</i> miR-106a	-3,23	1,66	
miR-21 <i>versus</i> miR-106b	-2,64	1,33	
miR-21 <i>versus</i> miR-18b	-6,67	0,93	
miR-425 <i>versus</i> miR-21	1,62	1,12	1,211
miR-425 <i>versus</i> miR-9	-6,32	1,52	
miR-425 <i>versus</i> miR-106a	-1,61	1,24	
miR-425 <i>versus</i> miR-106b	-1,03	1,07	
miR-425 <i>versus</i> miR-18b	-5,05	1,10	
miR-9 <i>versus</i> miR-21	7,93	1,38	1,596
miR-9 <i>versus</i> miR-425	6,32	1,52	
miR-9 <i>versus</i> miR-106a	4,70	1,85	
miR-9 <i>versus</i> miR-106b	5,29	1,73	
miR-9 <i>versus</i> miR-18b	1,26	1,51	
miR-106a <i>versus</i> miR-21	3,23	1,66	1,411
miR-106a <i>versus</i> miR-425	1,61	1,24	
miR-106a <i>versus</i> miR-9	-4,70	1,85	
miR-106a <i>versus</i> miR-106b	0,59	0,88	
miR-106a <i>versus</i> miR-18b	-3,44	1,43	
miR-106b <i>versus</i> miR-21	2,64	1,329	1,217
miR-106b <i>versus</i> miR-425	1,03	1,074	
miR-106b <i>versus</i> miR-9	-5,29	1,727	
miR-106b <i>versus</i> miR-106a	-0,59	0,875	
miR-106b <i>versus</i> miR-18b	-4,03	1,08	
miR-18b <i>versus</i> miR-21	6,67	0,934	1,211
miR-18b <i>versus</i> miR-425	5,05	1,102	
miR-18b <i>versus</i> miR-9	-1,26	1,51	
miR-18b <i>versus</i> miR-106a	3,44	1,431	
miR-18b <i>versus</i> miR-106b	4,03	1,08	

O resultado de cada combinação está representado na **figura 14**.

Figura 14. Análise de pares de miRs candidatos para normalizadores

Portanto, segundo esse método, os miRs que apresentam menor variabilidade e, portanto, são melhores normalizadores, são os miRs **miR-18b** e **miR-425**.

4.3.2 Determinação da quantificação relativa dos microRNAs circulantes em plasma

Foram então, realizados os cálculos de quantificação relativa com as duas possibilidades de combinações de normalizadores:

(A) miR-18b e miR-21

(B) miR-18b e miR-425

Para o cálculo foram utilizadas as médias geométricas dessas duas possibilidades.

Na comparação dos níveis de expressão do miR-9 circulante no plasma entre os dois grupos de idade, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,033$ – Teste de Mann U-Whitney) quando os dados foram normalizados com miR-18b e miR-21 **(A)**, assim como quando os dados foram normalizados com miR-18b e miR-425 **(B)** ($p = 0,015$ - Mann U-Whitney), com uma maior expressão desse miR nas pacientes do GJ, conforme demonstrado na **figura 15**.

Figura 15: Expressão do miR-9 no GJ e no GMI.

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

*: Indica que é estatisticamente significativo pelo teste não-paramétrico Mann U-Whitney.

Como foi encontrado um perfil de expressão diferente desse miR circulante entre os grupos de idade independente da dupla de normalizadores usada, foram realizadas análises de relação dos níveis de expressão com diversas características clínico-patológicas do tumor, como: estadiamento, frequência dos fenótipos moleculares, grau histológico e grau nuclear, para observar se haveria relação de maior expressão desse miR com características

mais agressivas. Porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas conforme demonstrado nas **figuras 16, 17, 18 e 19**.

Figura 16. Relação da expressão de miR-9 com o estadiamento dos tumores

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

Figura 17. Relação da expressão de miR-9 com os fenótipos moleculares dos tumores

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Kruskal-Wallis.

Figura 18. Relação da expressão de miR-9 com o Grau Histológico dos tumores

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

Figura 19. Relação da expressão de miR-9 com o Grau Nuclear dos tumores

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

Os níveis de expressão dos outros miRs comparados entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, conforme demonstrado nas figuras a seguir.

MiR-106a-5p

Figura 20: Expressão do miR-106a no GJ e no GMI.

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

MiR-106b-5p

Figura 21: Expressão do miR-106b no GJ e no GMI.

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; **(B)** Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

MiR-210-3p

Figura 22: Expressão do miR-210 no GJ e no GMI.

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; (B) Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

MiR-33b-5p

Figura 23: Expressão do miR-33b no GJ e no GMI.

(A) Dados normalizados com miR-18b e miR-21; (B) Dados normalizados com miR-18b e miR-425.

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

4.4 Genes alvos do miR-9 e suas vias

Como o miR-9 apresentou diferença de expressão, foi realizada uma consulta ao banco de dados miRWalk 2.0 para avaliar quais genes poderiam

ser regulados por esse miR. Foram apontados 25 genes-alvo do miR-9-5p, conforme demonstrado na **tabela 12**.

Tabela 12. Genes-alvo do miR-9

Gene-alvo do miR-9	Localização	Principais Funções
CCND1	Núcleo	Progressão do ciclo celular
CCNDBP1	Núcleo	Interação com a Ciclina D1
CDH1	Membrana Plasmática	Adesão celular
CDX2	Núcleo	Crescimento celular e diferenciação
CXCR4	Membrana Plasmática	Migração, proliferação e diferenciação
DICER1	Citoplasma	Regulação de expressão protéica (miRs)
EN2	Núcleo	Desenvolvimento do Sistema Nervoso
EP300	Núcleo	Proliferação e diferenciação
ESR1	Núcleo	Codifica receptor de estrógeno
ETS1	Núcleo	Desenvolvimento celular, senescência e morte celular
FOXO3	Núcleo	Morte celular
FOXP1	Núcleo	Regulador de transcrição, supressor de tumor
FSTL3	Extracelular	Hematopoiese
JAK1	Citoplasma	Proliferação, diferenciação, apoptose
MMP2	Extracelular	Modelamento da matriz extracelular
NFKB1	Núcleo	Inflamação
MMP9	Extracelular	Modelamento da matriz extracelular
SDC1	Membrana Plasmática	Sinalização celular e organização do citoesqueleto
NTRK3	Membrana Plasmática	Diferenciação celular
SNAI2	Núcleo	Transição epitélio-mesênquima
SIRT1	Núcleo	Regula silenciamento epigenético
SRF	Núcleo	Proliferação e diferenciação
SOD2	Citoplasma	Apoptose e sobrevivência
VIM	Citoplasma	Estrutura do citoplasma
VEGFA	Extracelular	Angiogênese

A partir dessa lista de 25 genes, foi realizada uma consulta no IPA para determinar em quais vias eles estão envolvidos.

Confirmando os dados do miRWalk, o resultado gerado pelo programa indicou que todos esses genes estão envolvidos com câncer, conforme demonstrado na **figura 24**.

Top Diseases and Bio Functions		
Diseases and Disorders		
Name	p-value range	# Molecules
Cancer	4,02E-04 - 1,18E-17	25
Organismal Injury and Abnormalities	4,03E-04 - 1,18E-17	25
Hematological Disease	3,61E-04 - 4,33E-16	19
Immunological Disease	2,52E-04 - 4,33E-16	20
Endocrine System Disorders	2,64E-04 - 6,37E-16	23

Figura 24. Relação dos genes-alvo com doenças.

Além disso, foi possível observar que esses genes estavam relacionados principalmente com motilidade e desenvolvimento celular, conforme demonstrado na **figura 25**.

Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value range	# Molecules
Cellular Movement	3,08E-04 - 1,76E-17	21
Cellular Development	3,38E-04 - 4,30E-16	23
Cellular Growth and Proliferation	3,38E-04 - 4,30E-16	22
Cell Death and Survival	4,03E-04 - 5,11E-15	21
Cell Cycle	3,08E-04 - 3,30E-14	15

Figura 25. Funções celulares e moleculares relacionadas com os gene-alvo.

Por meio da análise do IPA, foram indicadas quais as vias eram compostas pelos genes que sofriam repressão da tradução pela ação do miR-9 (anexo C). As principais foram: Sinalização da via da ILK (**figura 26**) e Via da transição epitélio-mesênquima (EMT) (**figura 27**), descritas na **tabela 13**.

Tabela 13. Principais vias regulados pelos gene-alvo do miR-9-5p

Vias	Genes envolvidos	Importância
Via ILK	CCND1, CDH1, MMP9, NFKB1, SNAI2, VEGFA, VIM	Proliferação, invasão, sobrevivência, adesão, motilidade, estrutura de citoesqueleto, angiogênese
Via EMT	CDH1, ETS1, JAK1, MMP2, MMP9, NFKB1, SNAI2	Adesão Celular

Figura 26. Via da ILK.

Figura 27. Receptores Tirosina Quinase e EMT.

4.5 Quantificação das Vesículas Extracelulares por Nanosight

Foi realizada a quantificação das vesículas extracelulares em 9 amostras do GJ e 21 amostras do GMI. A quantificação geral das partículas está exposta na **tabela 14**.

Tabela 14. Quantificação das Vesículas Extracelulares

	Grupo de Idade	Contagem das Vesículas Extracelulares
129 CAP	GJ	2,99E+10
340 CSS	GJ	1,86E+10
639 SPS	GMI	1,87E+10
701 MAJ	GMI	1,52E+09
742 KAMS	GMI	7,55E+10
744 TA	GMI	6,30E+10
750 HDFB	GMI	1,10E+10
1364 AMJ	GMI	8,58E+10
1414 MLOGA	GMI	1,48E+10
1428 JSS	GMI	9,80E+09
1851 CSS	GMI	6,64E+10
1886 RBMN	GJ	4,09E+10
1889 SCGB	GJ	3,86E+10
1893 MAS	GMI	1,58E+11
3328 LSF	GJ	1,39E+11
3555 RLN	GJ	1,00E+11
3556 PCSS	GJ	1,65E+11
3937 FIS	GMI	1,86E+11
3939 MCM	GMI	2,09E+11
3940 SR	GJ	1,96E+11
3952 ASB	GMI	1,37E+11
3953 NJB	GMI	9,48E+10
3954 MRS	GMI	1,02E+11
3956 NNSC	GMI	8,43E+10
3957 ECS	GMI	1,45E+11
3958 RAS	GMI	2,03E+11
3961 RSB	GMI	1,45E+11
3966 FPS	GJ	1,03E+13
3967 MCS	GMI	1,51E+13
3968 MAM	GMI	1,76E+13

Os dois grupos de idade apresentaram quantidades de vesículas similares ($p=1,000$), conforme demonstrado na **figura 28**.

Figura 28. Quantificação das vesículas extracelulares dos grupos de idade.
Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney.

Em relação ao tamanho das VEs, foi observada uma distribuição similar entre os dois grupos de idade, conforme demonstrado nas **figuras 29 e 30**.

Figura 29. Distribuição por tamanho das VEs no GJ
Cada cor de coluna representa uma amostra.

Figura 30. Distribuição por tamanho das VEs no GMI

Cada cor de coluna representa uma amostra.

Não foram encontradas diferenças em relação ao tamanho médio, nem nos valores de moda das VEs de plasma de pacientes jovens quando comparadas com plasma de pacientes de meia idade, conforme demonstrado na **figura 31 e 32**.

Figura 31. Tamanho médio das VEs no plasma das pacientes do GJ e do GMI

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney na comparação da média de tamanho das VEs das pacientes do GJ (171,5 nm) *versus* a média de tamanho das VEs das pacientes do GMI (176,2 nm).

Figura 32. Moda do tamanho das VEs no plasma das pacientes do GJ e do GMI

Não houve diferença estatística segundo o teste de Mann U-Whitney na comparação da moda do tamanho das VEs das pacientes do GJ (129,8 nm) *versus* a média de tamanho das VEs das pacientes do GMI (139,9 nm).

4.6 Extração de RNA das Vesículas Extracelulares

Foram testados os níveis de expressão do miR-21 e do miR-16 nas 4 condições descritas anteriormente no item 3.7.

Os níveis do miR-21 encontrados estão expostos na **figura 33** e do miR-16 na **figura 34**.

Figura 33. Expressão do miR-21 em diferentes condições de tratamento.
(1) Amostra de exossomos isolados sem nenhum tratamento; **(2)** Amostras tratadas com RNase A e Proteinase K; **(3)** Amostra tratada com Proteinase K; **(4)** Amostra tratada com Triton 0,3%, RNase A e Proteinase K.

Figura 34. Expressão do miR-16 em diferentes condições de tratamento.
(1) Amostra de exossomos isolados sem nenhum tratamento; **(2)** Amostras tratadas com RNase A e Proteinase K; **(3)** Amostra tratada com Proteinase K; **(4)** Amostra tratada com Triton 0,3%, RNase A e Proteinase K.

4.7 Determinação da Expressão de miRs nas VEs

Foram avaliadas os níveis de expressão dos 6 microRNAs detectados circulantes (miR-9, miR-106a, miR-106b, miR-18b, miR-210 e miR-33b) e também os dois miRs incluídos para possíveis normalizadores (miR-21 e miR-425) em 20 amostras escolhidas de forma randomizada (10 do GJ e 10 do GMI). Porém, nem todos miRs que foram encontrados circulantes foram detectados também no conteúdo das vesículas.

Apenas 3 miRs foram detectados em todas as amostras de VEs analisadas: miR-9, miR-106b e miR-18b. O miR-106a não foi detectado no conteúdo das VEs de nenhuma amostra e os outros miRs apresentaram expressão detectável em menores números de amostras: miR-210: 5%, miR-425: 15%, miR-21: 64,3% e miR-33b: 60%.

As comparações de frequência da expressão dos miRs circulantes com a frequência dos miRs nas VEs estão expostos na **tabela 14** para as amostras do GJ e na **tabela 15** para as amostras do GMI.

Tabela 15. Frequência de expressão dos miRs circulantes *versus* miRs em VEs no GJ

	GJ	
	Circulantes	VEs
Amostras Avaliadas	23	10
miR-21	23 (100%)	3 (30%)
miR-425	23 (100%)	2 (20%)
miR-9	22 (95,6%)	10 (100%)
miR-106a	22 (95,65%)	0
miR-106b	23 (100%)	10 (100%)
miR-18b	23 (100%)	10 (100%)
miR-210	14 (60,8%)	0
miR-33b	8 (34,8%)	8 (80%)

Tabela 16. Frequência de expressão dos miRs circulantes *versus* miRs em VEs no GMI

	GMI	
	Circulantes	VEs
Amostras Avaliadas	20	10
miR-21	20 (100%)	6 (60%)
miR-425	20 (100%)	1 (10%)
miR-9	19 (95%)	10 (100%)
miR-106a	19 (95%)	0
miR-106b	19 (95%)	10 (100%)
miR-18b	20 (100%)	10 (100%)
miR-210	15 (75%)	1 (10%)
miR-33b	6 (30%)	4 (40%)

5 Discussão

O desenvolvimento de câncer de mama em pacientes jovens é uma condição rara, conforme demonstrado nos nossos resultados (frequência de 4,6% dos casos), dado similar encontrado por PINHEIRO et al., 2013. O pequeno número de casos tornou-se uma limitação do atual estudo para conseguir as amostras de plasma necessárias, já que, além do grupo de idade jovem (≤ 35 anos), outros critérios também foram estipulados, como o diagnóstico de carcinomas ductais invasivos luminais (A, B ou HER-2+). Além disso, foram consideradas viáveis apenas as amostras de pacientes que não possuíam histórico familiar de câncer de mama (conforme os critérios da NCCN) para excluir as pacientes que poderiam apresentar alto risco de mutação em BRCA1/2. Outro importante fator de exclusão foi tratamento antes da coleta. Por protocolo institucional, as pacientes eram submetidas à coleta de sangue no momento da cirurgia, o que impossibilitou a inclusão de algumas pacientes que já haviam passado por tratamento neoadjuvante. A coleta antes de qualquer tratamento é importante, pois o perfil de miR se altera após intervenções (LEUNG et al., 2014; MEHRGOU e AKOUCHEKIAN, 2017).

O diagnóstico na idade precoce possui grande impacto na vida dessas mulheres, principalmente relacionados com preservação da fertilidade, lactação, estética e impacto sócio-econômico (HARTMANN, REINER E GERBER, 2011; FU et al., 2017). Além disso, alguns estudos relatam que essas pacientes jovens apresentam um desfecho menos favorável, relacionado com tumores de fenótipos mais agressivos: FREDHOLM et al. (2017) observou uma maior prevalência de tumores Luminal B nas pacientes jovens (< 40 anos), Cancelli et al. (2010) observou que as pacientes jovens (< 35 anos) possuíam menor prevalência de tumores Luminal A (9,2% *versus* 21,2%), prevalência similar de Luminal B (53,7% *versus* 56,7%), maior prevalência de Luminal HER-2+ (15,2% *versus* 9,9%) prevalência similar de tumores HER-2 (5,7% *versus* 4,7%) e maior prevalência do fenótipo triplo negativo (16,2% *versus* 7,5%) quando comparados com tumores de mulheres com idade de 35-50 anos, resultados diferentes do que encontramos nas pacientes avaliadas, onde a frequência dos fenótipos não apresentou diferença ($p = 0,098$) entre os

grupos de idade. Sabiani et al., 2016 apresentou resultados que indicavam que as mulheres jovens possuíam mais tumores Luminal B e menos Luminal A, embora na nossa casuística esse resultado também tenha sido encontrado, esse padrão foi observado igualmente nas pacientes de meia-idade, ou seja, em ambos os grupos os tumores classificados como Luminal B foram mais frequentes que os Luminal A.

Embora ao longo dos anos, estudos demonstraram que essas pacientes também apresentam prognósticos menos favoráveis por apresentarem tumores de maior tamanho e graus mais avançados (COLLEONI, 2002; HAN et al., 2004; GNERLICH et al., 2009; MORRISON et al., 2012; FREDHOLM et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2019), não encontramos essas diferenças na casuística atual. Os tumores dos dois grupos de idade apresentaram estadiamento ($p= 0,771$), grau histológico ($p= 0,1$) e grau nuclear ($p= 0,316$) muito similares. Uma relevante limitação para avaliar aspectos relacionados com prognósticos nesse estudo foi o curto período de acompanhamento, o maior tempo de seguimento foi de apenas 3 anos e 10 meses e fatores importantes para determinar o desfecho da doença e observar se os tumores apresentam comportamentos mais agressivos, como desenvolvimento de metástase à distância e evolução para óbito, ainda não podem ser totalmente avaliados. Mas, ao diagnóstico e nesses anos iniciais de desenvolvimento da doença, a idade não foi um fator determinante para tumores com maior agressividade nessa casuística selecionada. Uma das possibilidades que podem justificar tumores de tamanhos menores nos dois grupos de idade no momento do diagnóstico é a conscientização da importância da detecção precoce da doença. Embora seja recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde que a mamografia de rastreamento seja feita apenas para mulheres de 50-69 anos a cada dois anos, diversas ações nacionais de controle de câncer de mama foram desenvolvidas ao longo dos anos, o que aumentou o acesso a informação para as mulheres. Conforme divulgado em catálogo organizado pelo Ministério da Saúde (2018), desde a década de 70, diversas políticas públicas foram estabelecidas para auxiliar no controle da doença, tendo em 2012 o início de lançamento de campanhas nacionais (por meio de cartazes, entrega de panfletos e outros meios) para

reforço da importância do diagnóstico precoce, inclusive para as pacientes jovens.

Para avaliar as diferenças entre os tumores nas pacientes jovens a nível molecular, alguns estudos avaliaram a expressão de importantes reguladores pós-transcricionais, os microRNAs (PENA-CHILET, 2014; BASTOS et al., 2016; TSAI et al., 2018), porém em todos esses trabalhos, a amostra avaliada foi o tumor e no estudo atual, avaliamos a expressão de miRs no plasma, pois, embora existam grandes desafios para detecção dos miRs nesse tipo de amostra, principalmente relacionado com a pequena quantidade existente (HAMAM et al., 2017), avaliar os miRs circulantes pode ser uma ferramenta importante, já que eles apresentam um grande potencial para uso em diagnóstico e acompanhamento de resposta a terapia, por exemplo (FILIPÓW e LACZMANSKI, 2019) e podem ser usados para suprir algumas limitações importantes da mamografia (ADHAMI et al., 2018), Além de serem estáveis e com obtenção por uma técnica não-invasiva (SCHWARZENBACH et al., 2014; YE et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar se 8 miRs (miR-9-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-18b-5p, miR-210-3p, miR-33b-5p, miR-372-5p e miR-518a-3p) identificados previamente (BASTOS et al., 2016) em tumores também eram circulantes e capazes de diferenciar pacientes jovens (≤ 35 anos) de pacientes de meia-idade (50-69 anos), a expressão desses miRs em plasma foi avaliada por qPCR:

- MiR-106a:

Identificamos esse miR presente no plasma de praticamente todas as amostras, o que indica que ele pode ter participação importante no câncer de mama. Li et al. (2018) demonstrou que esse miR pode ser um potencial biomarcador na doença, já que apresenta uma maior concentração nas pacientes quando comparados com plasma de indivíduos normais, tanto circulantes como presentes em exossomos. Além disso, na literatura, esse miR é associado com um pior prognóstico, sua alta expressão foi relacionado com metástase por ZHAO et al. (2016) e com o fenótipo molecular luminal B (MEHRGOU e AKOUCHEKIAN, 2017). Porém, nossos resultados

demonstraram que os níveis desse miR no plasma não se diferencia entre os grupos de idade (dados normalizados com miR-18b e miR-21: $p= 0,9$ e dados normalizados com miR-18b e miR-425: $p= 0,158$), embora no tumor ele tenha sido encontrado com maior nível de expressão nas pacientes jovens (BASTOS et al., 2016).

-miR-106b:

A presença desse miR circulante já foi observada alterada em alguns tipos de câncer, principalmente no câncer gástrico, sendo apontado como um potencial biomarcador na doença (TSUJIURA et al., 2010). Sua expressão foi detectada em todas as amostras desse estudo, sugerindo um importante papel no carcinoma mamário, assim como descrito por MEHRGOU e AKOUCHEKIAN (2017), que relacionaram sua expressão com o fenótipo molecular Luminal B e por ZHENG et al. (2015), que associaram esse miR com maior risco de recorrência no câncer de mama.

Porém, embora presente em todas amostras de plasma, esse miR não foi diferencialmente expresso entre os grupos de idade (dados normalizados com miR-18b e miR-21: $p= 0,242$ e dados normalizados com miR-18b e miR-425: $p= 0,45$), resultado diferente do encontrado no tumor (BASTOS et al., 2016), onde esse miR apresentou maior nível de expressão nas pacientes jovens e foi relacionado com tumores de estadiamento mais avançados.

- MiR-210:

Este miR é apontado como um biomarcador de carcinoma hepatocelular metastático, (AHMED et al., 2019) e de câncer pancreático (HO et al., 2010). No câncer de mama, ele foi apontado por SHAO et al. (2019) como um potencial marcador para avaliar resistência a quimioterapia e sua elevada expressão foi associada com metástases.

O miR-210 foi encontrado em apenas uma parcela das nossas amostras, nas amostras com níveis de expressão detectáveis (GJ= 14 *versus* GMI= 15) não foi encontrada diferença de expressão no plasma entre os grupos de idade (dados normalizados com miR-18b e miR-21: $p= 1,0$ e dados normalizados com miR-18b e miR-425: $p= 0,533$), embora no tumor, as pacientes jovens tinham

uma maior expressão desse miR, e sua expressão foi relacionada com tumores de maior tamanho, segundo BASTOS et al., 2016.

- MiR-18b:

Nos dados da literatura, esse miR circulante já foi associado com tumores triplo-negativo no soro de pacientes com câncer de mama (SAHLBERG et al., 2015). O miR-18 foi considerado inicialmente, um miR-alvo para análise no plasma, já que em tumores sua expressão foi maior nas pacientes jovens e sua ação associada com menor expressão de ER e fenótipos mais agressivos por BASTOS et al. (2016). Porém, no nosso estudo, foi observada uma expressão constante em todas as amostras e determinado, por duas técnicas diferentes, como um bom normalizador. Foram testados também outros dois miRs (miR-21 e miR-425) como possíveis normalizadores. O miR-21 já tem sua ação bem elucidada no câncer de mama, sendo apontado como um importante oncomiR no câncer de mama (JINLING et al., 2016) e, associado com o miR-18b, foi apontado como um bom normalizador pelo programa *Normfinder*. Outro método para calcular normalizadores - por meio do cálculo de ΔCt e Desvio Padrão (SILVER et al., 2006), também apontou o miR-18b como um miR estável associado com o miR-425, este que já foi indicado por MCDERMOTT, KERIN e MILLER (2013), como um bom controle endógeno em estudos com câncer de mama.

- MiR-33b:

Foi apontado como um potencial biomarcador de osteoartrite (NTOUMOU et al., 2017), porém existem poucos dados na literatura sobre sua ação no câncer. Um estudo de LIN et al. (2015) apontou como um miR pouco expresso em células de câncer de mama. BASTOS et al. (2016) observou uma expressão maior desse miR nas pacientes com câncer de mama e ele foi associado com tumores de maiores tamanhos, porém como um miR circulante, ele foi detectado na minoria das amostras (GJ = 8; GMI = 6) também sem apresentar diferença na expressão entre os grupos de idade nas poucas amostras de plasma analisadas (dados normalizados com miR-18b e miR-21: $p=0,181$ e dados normalizados com miR-18b e miR-425: $p=0,121$).

- miR-372:

O nível de expressão desse miR não foi detectado em nenhuma amostra de plasma no atual estudo, embora EICHELSER et al. (2014) já tenham detectado esse miR presente em amostras de soro de pacientes com câncer de mama.

No tumor, BASTOS et al. (2016), demonstrou uma menor expressão do miR-372 nos tumores pacientes jovens e essa condição foi relacionada com tumores de maior tamanho.

- MiR-518a-3p:

Também não apresentou níveis de expressão detectáveis por qPCR nas amostras de plasma. Não foram encontrados estudos que demonstrem sua expressão em fluídos biológicos de câncer de mama.

BASTOS et al. (2016) identificaram sua expressão aumentada em tumores de pacientes jovens e sua expressão foi relacionada com fenótipos mais agressivos.

Embora as amostras de plasma utilizada no atual estudo sejam de pacientes diferentes dos tumores analisados por BASTOS et al. (2016), as características das doenças e das pacientes foram as mesmas, para que os grupos, embora independentes, fossem o mais parecido possível. Portanto, dois (miR-372 e miR-518a-3p) dos oito miRs não serem encontrados circulantes, pode indicar uma seletividade na liberação de microRNAs circulantes, já que nem todos presentes no tumor foram detectados no plasma, como já foi descrito por Ng et al. (2013), que comparou a diferença de expressão de microRNAs em câncer de mama *versus* normal nos tecidos e também no plasma. Estes autores encontraram apenas 8 microRNAs em comum presentes nos dois tipos de amostras.

-MiR-9

Foi o único miR que apresentou diferente nível de expressão entre os grupos de idade na nossa análise (dados normalizados com miR-18b e miR-21: $p=0,033$ e dados normalizados com miR-18b e miR-425: $p=0,015$). No estudo

de BASTOS et al. (2016) ele mostrou o mesmo resultado no tumor, maior expressão nas pacientes jovens, os autores o relacionaram com tumores de maior tamanho e estadiamentos mais avançados. Esse miR é envolvido principalmente com desenvolvimento e maturação do sistema nervoso, mas também já foi relacionado com diversos tipos de câncer (COOLEN; KATZ; BALLY-CUIF, 2013) e é regulado pela oncoproteína myc (MA et al., 2010). Seu efeito é considerado controverso, em alguns tumores esse miR é apontado como um supressor de tumor e seu nível encontra-se diminuído nos tumores quando comparados com tecido normal, como no câncer de cólon (BANDRES et al., 2009), câncer de pulmão (HELLER et al., 2012) e em leucemias (SENYUK et al., 2013), já em outros tipos tumorais, como em câncer cervical (WILTING et al., 2013) e em tumor cerebral primário (NASS et al., 2009) seus níveis encontram-se aumentados e ele é apontado como um oncomir, capaz de desregular o ciclo celular (KHOSRAVI et al., 2018).

Na análise que realizamos pelo miRWalk, foram apontados alguns genes regulados por esse miR e o principal gene-alvo encontrado foi o CDH1. Resultado concordante com o estudo de Ma et al. (2010), que demonstrou que o miR-9 é capaz de regular negativamente esse gene, reduzindo os níveis de E-caderina, levando a uma maior motilidade e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de invasão das células. Além disso, com a inibição da E-caderina, há a inibição da β -catenina, o que aumenta a produção do VEGF e, conseqüentemente, a angiogênese. Portanto, esse miR parece ter um papel importante no desenvolvimento de metástases. Na nossa casuística, houve uma maior expressão desse miR nas pacientes jovens, porém, o tempo de acompanhamento se torna novamente uma limitação, pois não conseguimos determinar se há ou não maior frequência de invasão nessas pacientes.

Segundo resultados da análise feito pelo IPA, os genes regulados por esse miR, estão envolvidos em importantes vias, como a de sinalização da ILK (do inglês *Integrin linked kinase*), uma via de extrema importância para regular processos fundamentais, como crescimento, proliferação, sobrevivência, motilidade, invasão e angiogênese (MCDONALD, FIELDING, DEDHAR, 2008), indicando que esse miR pode estar relacionado com um pior prognóstico.

Portanto, o miR-9 parece ter grande influência e importância na progressão do tumor mamário, sendo necessário uma observação a longo prazo do seu real efeito sobre essas pacientes, já que sua principal ação observada é relacionada com invasão.

Não foram identificados trabalhos na literatura que comparem os níveis desse miR **circulante** conforme idade das pacientes com câncer de mama, porém um trabalho demonstrou que os níveis desse miR em condições fisiológicas e não relacionados com o câncer, aumenta com a idade, reforçando que uma menor expressão do miR-9 encontrada nas pacientes de meia-idade não é em consequência do envelhecimento (BUDZINSKA et al., 2016).

O miR-9 foi encontrado tanto na população de miRs circulantes associados com proteínas, como também dentro de vesículas extracelulares, podendo influenciar as células receptoras (FALCONE, FELSANI e D'AGNANO, 2015).

Em relação aos demais miRs, observamos que nem todos encontrados circulantes (associados com proteínas e complexos protéicos), estavam também sendo transportados por vesículas extracelulares. Isso pode ser explicado por uma hipótese sugerida por Arroyo et al. (2011), que identificou dois miRs como exclusivamente transportados por complexos protéicos, enquanto outro (let-7a) foi encontrado somente em vesículas, porém não circulante associado com proteínas. Ou seja, existem duas populações diferentes de miRs circulantes. Uma delas contidas e protegidas da degradação de RNases presentes no plasma por vesículas (10%) e outra população associada com proteínas (Ago2, HDL, LDL), porém, acredita-se que essa população associada com proteínas seja menos específica, resultando da atividade fisiológica celular e não necessariamente ligada à um mecanismo da célula tumoral (FALCONE, FELSANI e D'AGNANO, 2015).

Os próximos passos do estudo incluem aumentar o número de pacientes avaliadas, incluir controles sem doença de amostras de plasma, já que existem miRs circulantes que foram detectados em todas as amostras, podendo ser potenciais biomarcadores da doença de maneira geral, independente da idade.

6 Conclusão

Por meio dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O perfil de pacientes do ICESP é similar ao descrito na literatura, com baixa incidência de tumores de mama em pacientes jovens (≤ 35 anos). Na comparação dessas pacientes de menor idade com as pacientes mais velhas, não foram encontradas diferenças clínico-patológicas.
- Dos oito miRs avaliados nos dois grupos de idade, seis (miR-9-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-18b-5p, miR-210-3p, miR-33b-5p) foram detectados circulantes no plasma. E um deles (miR-18b-5p) associado com miR-21 e miR-425, foi apontado como um possível normalizador na técnica de qPCR para determinação de expressão de miRs circulantes de pacientes com câncer de mama.
- Apenas o miR-9-5p apresentou diferenças de expressão no plasma na comparação dos dois grupos de idade, com um maior nível de expressão detectado nas pacientes jovens, similar ao resultado observado em estudo anterior avaliando tumores. Por análises de bioinformática, foi possível avaliar que esse miR regula importantes genes relacionados com migração e metástase, incluindo CDH1, MMP2, VIM.
- Tanto os tumores de pacientes jovens quanto os de meia-idade parecem secretar vesículas em quantidades semelhantes. Porém, nem todos os miRs são enviados ao meio extracelular por VEs. Apenas o miR-9, miR-106b e miR-18b apresentaram expressão detectável nas amostras extraídas de vesículas em todas as amostras avaliadas ($n = 20$).

7 Referências

- ADHAMI, M. et al. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. **Breast Cancer**, v. 25; p. 198-205, 2018.
- AHMED, E. K. et al. Circulating miR-210 and miR-1246 as Potencial Biomarkers for Differentiating Hepatocellular Carcinoma from Metastatic Tumors in the Liver. **J Med Biochem.**, v. 38 (2), p. 109-117, 2019.
- ARPINO, G.; MILANO, M. PLACIDO, S. Features of aggressive breast cancer. **The Breast**, v. 24(5), p. 594-600, 2015.
- ARROYO, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Pnas**, v. 108 (12), p. 5003-5008, 2011.
- BANDRES, E. et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 125 (11), p. 2737-2743, 2009.
- BARONI, S.; et al. Exosome-mediated delivery of mir-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. **Cell Death Dis.**, v. 7 (7) ,2016.
- BASTOS, E.P. et al. A Set of miRNAs, Their Gene and Protein Targets and Stromal Genes Distinguish Early from Late Onset ER Positive Breast Cancer. **PLoS One**, v.11(5), 2016.
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. **Theranostics**, v. 5, p. 1122-1143, 2015.
- BUDZINSKA, M. et al. MiR-96, miR-145 and miR-9 expression increases, and IGF-1R and FOXO1 expression decreases in peripheral blood mononuclear cells of aging humans. **BMC Geriatrics**, v. 16, p. 1-9, 2016.
- CANCELLO, G., et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. **Ann Oncol**, v. 10, p. 1974-1981, 2010.
- CANCELLO et al. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: How much is “very young”? **The Breast**, v. 22, p. 1046-1051, 2013.
- CECILIO A.P. et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 43-49, 2015.
- CHEANG M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI**, v. 101 (10), p. 736-750, 2009.

CHEN, W., X. .; et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of micrnas. **PLoS ONE**, v.9, 2014.

CHENG, G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 81, p. 75-93, 2015.

COLLEONI, M. et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 273–279, 2002.

COOLEN, M.; KATZ, S.; BALLY-CUIF, L. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 1-11, 2013.

CRESCITELLI R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **J Extracell Vesicles**, v. 12, 2013.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5(10), p. 2929–2943, 2015.

DWEEP, H. et al. miR-Walk Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. **J Biomedical Informatics**, v. 44 , p. 839–847, 2011.

DWEEP, H et al. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions, **Nature Methods**, v. 12(8), p. 697-697, 2015.

EICHELSER, C. et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 5 (20), p. 9650-9663, 2014.

EROLE, P. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 698-707, 2012.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F.J. OncomiRs – microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews | Cancer**, v. 6, p. 259-269, 2006.

FALCONE, G., FELSANI, A., D’AGNANO, I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34:32, p. 1-10, 2015.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v.5, p. 77-106, 2018.

FILIPÓW, S. e LACZMANSKI, L. Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response. **Frontiers in Genetics**, v. 10 (169), p. 1-7, 2019.

FREDHOLM H. et al. Long-term outcome in young women with breast cancer: a population-based study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 160, p. 131-143, 2016.

FREDHOLM H. et al. Breast cancer in young women and prognosis: How important are proliferation markers? **European Journal of Cancer**, v. 84. p. 278-289, 2017.

FU, J. et al. How Young Is Too Young in Breast Cancer? – Young Breast Cancer Is Not a Unique Biological Subtype. **Clinical Breast Cancer**, v. 18, p. 25-39, 2017.

GARZON, R.; CALIN, G.A.; CROCE, C.M. MicroRNAs in Cancer. **The Annual Review of Pathology**, v. 60, p. 167-79, 2009.

GNERLICH, J. L. et al. Elevated Breast Cancer Mortality in Women Younger than Age 40 Years Compared with Older Women Is Attributed to Poorer Survival in Early-Stage Disease. **J Am Coll Surg**, v. 208, p. 341-347, 2009.

GYÖRGY, B. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci.**, v. 68 (16), p. 2667-88, 2011.

HA, M.; KIM, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 15 (8), p. 509-524, 2014.

HAMAM, R. et al. Circulating micrRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. **Cell Death & Disease**, v. 8, 2017.

HAN, W. et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. **BMC cancer**, v. 4, p. 1-8, 2004.

HAN, W.; KANG, S.Y. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 119 (1), p.193-200, 2010.

HARTMANN, S., REIMER, T., GERBER, B. Management of early invasive breast cancer in very young women (<35 years). **Clin Breast Cancer**, v. 11 (4), p. 196-203, 2011.

HEEGARD, N. H. et al. Circulating micro-RNA expressions profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. **Int. J. Cancer**, v. 130, p. 1378-1386, 2012.

HELLER, G., et al. Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. **Clin. Cancer Res.** v. 18, p. 1619–1629, 2012.

HO, A.S. et al. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. **Transl Oncol**, v. 3, p. 109–113, 2010.

HWANG, H., W.; MENDELL, J. T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. **Br. J Cancer**, v. 94(6), p. 776-780, 2006.

ISIK, M.; KORSWAGEN, H. C.; BEREZIKOV, E. Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Silence**, v. 1, p. 1-9, 2010.

JINLING, W. Prognostic value of circulating microRNA-21 for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Artif Cells Nanomed Biotechnol.**, v. 45 (6), p. 1-6, 2017.

KHOSRAVI, A. et al. The impact of Mir-9 regulation in normal and malignant hematopoiesis. **Oncol Rev.**, v. 12 (1), 2018.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews/Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 376-385, 2005.

KOMATSU, S. et al. Prognostic impact of circulating miR-21 in the plasma of patients with gastric carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 33, p. 271-276, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER J. C. **Robbins & Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças**.

LAKHANI, S. R. et al. WHO Classification of Tumours of the Breast, v. 4, 2012.

LANIGAN F.; et al. Molecular links between mammary gland development and breast cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3161-3184, 2007.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843-854, 1993.

LEE, R. J. et al. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. **International Journal of Surgical Oncology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

LEUNG, C. et al. MicroRNA expression profiles in human breast cancer cells after multifraction and single-dose radiation treatment. **Oncology Reports**, v. 31, p. 2147-2156, 2014.

LI, M. et al. Circulating microRNAs from the miR-106a-363 cluster on chromosome X as novel diagnostic biomarkers for breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 170, p. 257-270, 2018.

LIN, Y. et al. MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

MA, L. Et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 12(3), p. 247-256, 2010.

MACIAS, H.; HINCK L. Mammary Gland Development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v.1 (4), p. 533-557, 2012.

MANDUJANO-TINOCO, E. A. ET AL. New emerging roles of microRNAs in breast câncer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 171, p. 247-259, 2018.

MAO, L.; et al. Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering micrnas. **Tumour Biol.**, v. 37, p. 5247–5256, 2016.

MARSHALL, E. Dare to do less. **Science**, v. 343, p. 1454-1456, 2014.

MARTÍNEZ, M. T. et al. Breast Cancer in Very Young Patients in a Spanish Cohort: Age as an Independent Bad Prognostic Indicator. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 13, p. 1-10, 2019.

MCDERMOTT, A.M., KERIN, M. J. MILLER, N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. **PloS One**, v. 8 (12), 2013.

MCDONALD, P. C.; FIELDING, A. B.; DEDHAR, S. Integrin-linked kinase – essential roles in physiology. **Journal of Cell Science**, v. 121, p. 3121-3132, 2008.

MEHRGOU, A. e AKOUCHEKIAN, M. herapeutic impacts of microRNAs in breast cancer by their roles in regulating processes involved in this disease. **J Res Med Sci.**, v. 22, 2017.

MINCIACCHI, V.R.; FREEMAN, M.R.; VIZIO, D.D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, p. 41-51, 2015.

Ministério da Saúde. A mulher e o câncer de mama no Brasil. 3ª edição revisada e atualizada, 2018.

MELO, S. A. et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. **Cancer cell**, v. 26(5), p. 707-721, 2014.

MORHAYIM, J., BARONCELLI, M., VAN LEEUWEN, J. P. Extracellular vesicles: specialized bone messengers. **Arch Biochem Biophys.**, v. 1, p. 38-45, 2014.

MORRISON, D.H. et al. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 1-6, 2012.

NASS D. et al. MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumours and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumours. **Brain Pathol**, v. 19, p. 375–383, 2009.

NG, E.K. et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. **PLoS One**, v. 8 (1), 2013.

NTOUMOU, E. et al., Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. **Clinical Epigenetics**, v. 9, p. , 2017.

OLENA, A.F.; PATTON, J.G. Genomic Organization of microRNAs. **J Cell Physiol**, v. 222(3), p. 540-545, 2010.

PATNAIK, S. K. et al. MicroRNA expression profiles of whole blood in lung adenocarcinoma. **Plos One**, v. 7, 2012.

PEÑA-CHILET, M. et al. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, p. 529, 2014.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PIMENTEL, F. et al. Technology in MicroRNA Profiling: Circulating MicroRNAs as Noninvasive Cancer Biomarkers in Breast Cancer. **J Lab Autom.**, v. 5, p. 574-588, 2015.

PINHEIRO A.B. et al. Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Análise de 12.689 Casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59(3), p. 351-359, 2013.

POLYAK, K. Breast câncer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 3155-3163, 2007.

PRAT, A. et al. Prognostic Significance of Progesterone Receptor-Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31(2), p. 203-209, 2013.

PRICE C.; CHEN, J. MicroRNAs in cancer biology and therapy: Current status and perspectives. **Genes & Diseases**, v. 1, p. 53-63, 2014.

ROTH C. et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v.12(6), 2010.

SAHLBERG, K. et al. A Serum MicroRNA Signature Predicts Tumor Relapse and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Patients. **Clin Cancer Res**, v. 21, p. 1207-1214, 2015.

SABIANI L. et al. Breast cancer in young women: Pathologic features and molecular phenotype. **The Breast**, v. 29, p. 109-116, 2016.

SENYUK, V. et al. Critical role of miR-9 in myelopoiesis and EVI1-induced leukemogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 110, p. 5594–5599, 2013.

SCHWARZENBACH H. et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 11(3), p. 145-56, 2014.

SCHOONEVELD, E. et al. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Res.**, v. 17, 2015.

SHAO, B. et al. Plasma microRNAs Predict Chemoresistance in Patients With Metastatic Breast Cancer. **Technol Cancer Res Treat**, v. 18, p. 1-9, 2019.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7 (33), p.1-9, 2006.

SOHEL, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. **Achievements in the Life Scienceds**, v. 10, p. 175-186, 2016.

SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of microRNAs in Cancer. **Cancer Res.**, v. 76(13), p. 3666-3670, 2016.

SWELLAM, M. et al. Potential diagnostic role of circulating miRNAs in breast cancer: Implications on clinicopathological characters. **Clinical Biochemistry**, v. 56, p. 47-56, 2018.

TKACH, M., THÉRY, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. **Cell.**, v. 164(6), p. 1226-1232, 2016.

TSAI H. et al. Differential microRNA expression in breast cancer with different onset age. **Plos One**, v. 13(1), p. 1-19, 2018.

TSUJIURA, M. et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancer. **Br. J. Cancer**, v. 102, p. 1174-1179, 2010.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol.**, v. 9(6), p. 654-659, 2007.

VAN DER POL, E., et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. **Pharmacol Rev.**, v. 64(3), p. 676-705, 2012.

VILLARREAL-GARZA, C. et al. Breast Cancer in Young Women in Latin America: An Unmet, Growing Burden. **The Oncologist**, p. 26-34, 2013.

WEI, Y.; et al. Shikonin inhibits the proliferation of human breast cancer cells by reducing tumor-derived exosomes. **Molecules**, v.21, 2016.

WHITESIDE, T. L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. **Expert Rev Mol Diagn.**, v. 15(10), p. 1293-310, 2015.

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**, v. 75, p. 855-862, 1993.

WILTING, S. et al. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. **Oncogene**, v. 32, p. 106–116, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 2003.

YE, S. et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. **Oncotarget**, v. 5(14), p. 5439-5452, 2014.

YERSAL, O; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5(3), p. 412-424, 2014.

YOON, Y.J.; KIM, O.Y.; GHO, Y.S. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB Rep.**, v. 47(10), p. 531-539, 2014.

ZHAO G. et al. Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer. **BMC Cancer**, v. 18, p.676, 2018.

ZHAO Q. et al. A direct quantification method for measuring plasma MicroRNAs identified potential biomarkers for detecting metastatic breast cancer. **Oncotarget**, v. 7(16), p. 21865-21874, 2016.

ZHANG, K. et al. Identification of microRNA biomarkers in the blood of breast cancer patients based on microRNA profiling. **Gene**, v. 619, p. 10-20, 2017.

ZHENG, G. et al. Serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of colorectal adenocarcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 111, p. 1985-1992, 2014.

ZHENG, R. et al. Prognostic value of miR-106b expression in breast cancer patients. **J Surg Res**, v. 195 (1), p. 158-165, 2015.

Anexos

(A) Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - nº 503/15

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/03/2016, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 503/15 intitulado: **“PROJETO: DETERMINAÇÃO DE MICRORNAS CIRCULANTES EM PLASMA DE PACIENTES JOVENS E DE MEIA IDADE COM CÂNCER DE MAMA”** apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA E ONCOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Maria Mitzi Brentani

Pesquisador (a) Executante: Amanda Duran

CEP-FMUSP, 10 de Março de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

(B) Características das pacientes selecionadas para o estudo

Jovens (GJ):

Identificação	Instituição	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	cTNM	Metástase	Estadio	Grau Histológico	Grau Nuclear	RE	RP	HER-2	FISH	Ki67	Fenótipo Molecular
HB 1605	HCB	34	54,15	1,61 m	T2N0M0	Não	II A	3	3	95%	Negativo	Positivo (3+)	Não realizado	80%	Luminal HER-2
HB 1500	HCB	31	56,1	149	T3N0M0	Não	II B	3	3	100%	Negativo	Positivo (3+)	Não realizado	80%	Luminal HER-2
HB 1610	HCB	34	61,5	163	T1N1M0	Não	II A	1	2	80%	90%	Negativo (+)	Não realizado	7%	Luminal A
HB 1517	HCB	27	62	170	T2N0M0	Não	I A	3	3	Negativo	20%	Negativo (-)	Não realizado	90%	Luminal B
HB 1436	HCB	31	48,8	155	T2N1M0	Não	II B	1	3	90%	5%	Negativo (+)	Não realizado	40%	Luminal B
HB 1516	HCB	31	66,2	1,71	T2N0M0	Não	II A	3	3	90%	80%	Negativo (-)	Não realizado	40%	Luminal B
HB 1704	HCB	30	62,1	159	T4N1M0	Não	III B	3	3	60%	10%	Negativo (-)	Não realizado	90%	Luminal B
HB 1708	HCB	31	95,3	188	T3N1M0	Não	III A	2	2	90%	90%	Positivo (2+)	Positivo	20%	Luminal HER-2
HB 1502	HCB	21	51	157	T1N0M0	Não	I	2	2	100%	70%	Negativo (+)	Não realizado	10%	Luminal A
129 CAP	ICESP	34	57	159,5	T2N0	Ossos, fígado e pulmão	IV	3	3	80%	80%	Negativo	Não realizado	30%	Luminal B
340 CSS	ICESP	35	73,5	163	T3N0M0	Não	II B	3	3	90%	90%	Negativo	Não realizado	70%	Luminal B

Identificação	Instituição	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	cTNM	Metástase	Estadio	Grau Histológico	Grau Nuclear	RE	RP	HER-2	FISH	Ki67	Fenótipo Molecular
1886 RBMN	ICESP	34	84	173	T2N3M1	Pulmão	IV	2	3	100%	100%	Negativo	Não realizado	10%	Luminal A
1889 SCGB	ICESP	28	64,8	153,5	T2N0M0	Não	II A	2	2	100%	20%	Negativo	Não realizado	20%	Luminal B
3328 LSF	ICESP	33	77,2	154	T2N0M0	Não	II A	2	3	90%	40%	Positivo	Positivo	20%	Luminal HER-2
3556 PCSS	ICESP	35	70	165	T1N0M0	Não	I	2	2	100%	90%	Negativo	Não realizado	30%	Luminal B
3940 SR	ICESP	34	79,5	166	T1N0M0	Não	I	1	1	100%	100%	Negativo	Não realizado	5%	Luminal A
3955 RLN	ICESP	27	76	160	T2N0M0	Não	II A	2	3	100	20	Neagtivo	Não realizado	10%	Luminal A
3966 FPS	ICESP	26	101,1	163	T3N1M0	Não	III A	2	3	10%	10%	Positivo	Positivo	50%	Luminal HER-2
3969 CFS	ICESP	29	79,75	166,5	T2N0M0	Não	II A	1	1	100%	80%	Negativo	Não realizado	13%	Luminal A
3970 SF	ICESP	34	91,6	162	T1N0M0	Não	II A	2	2	100%	100%	Positivo	Positivo	25%	Luminal HER-2
3978 PRS	ICESP	34	107,6	157	T4N1M0	Não	III B	2	3	90%	30%	Negativo	Não realizado	60%	Luminal B
4734 LBO	ICESP	33	61,8	162	T3N1M0	Não	III A	2	3	95%	95%	Positivo	Positivo	40%	Luminal HER-2
4744 CNC	ICESP	28	88	162	T3N1M0	Ossos	III A	2	2	90%	60%	Negativo	Não realizado	80%	Luminal B
4748 CGO	ICESP	34	55,7	152	T3N1M0	Não	III A	2	3	90%	80%	Duvidoso	Negativo	35%	Luminal B

Meia-Idade (GMI):

Identificação	Instituição	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	cTNM	Metástase	Estadio	Grau Histológico	Grau Nuclear	RE	RP	HER-2	FISH	Ki67	Fenótipo Molecular
639 SPS	ICESP	54	77	147	T2N1M0	Ossos e pulmão	IV	2	2	95%	20%	Negativo	Não realizado	15-20%	Luminal B
701 MAJ	ICESP	56	53,5	153	T2N1M0	Não	II B	3	3	100%	90%	Negativo	Não realizado	20%	Luminal B
742 KAMS	ICESP	51	78	166	T2N0M0	Não	II A	3	3	95%	80%	Negativo	Não realizado	30%	Luminal B
744 TA	ICESP	63	46,4	155	T4N1M0	Não	III B	2	3	100%	20%	Negativo	Não realizado	20%	Luminal B
750 HDFB	ICESP	58	58	158	T1N0M0	Não	I	1	2	100%	Negativo	Negativo	Não realizado	10%	Luminal A
1364 AMJ	ICESP	54	74	159	T1N0M0	Não	I	1	3	90%	80%	Negativo	Não realizado	5%	Luminal A
1414 MLOGA	ICESP	64	63,2	147	T1N0M0	Não	II A	2	3	100%	95%	Negativo	Não realizado	30%	Luminal B
1428 JSS	ICESP	57	62	152,5	T2N0M0	Não	II A	2	2	90%	80%	Negativo	Não realizado	25%	Luminal B
1851 CSS	ICESP	50	58	145,5	T2N1M0	Não	II B	2	2	100%	40%	Negativo	Não realizado	8%	Luminal A
1893 MAS	ICESP	64	65	151	T1N0M0	Não	I	1	2	100%	90%	Negativo	Negativo	30%	Luminal B

Identificação	Instituição	Idade	Peso (kg)	Altura (cm)	cTNM	Metástase	Estadio	Grau Histológico	Grau Nuclear	RE	RP	HER-2	FISH	Ki67	Fenótipo Molecular
3937 FIS	ICESP	64	60,7	158	T1N0M0	Linfonodos mandibulares	IV	1	2	100%	80%	Negativo	Não realizado	25%	Luminal B
3939 MCM	ICESP	59	59,3	165	T1N0M0	Não	I	1	2	95%	95%	Negativo	Não realizado	5%	Luminal A
3952 ASB	ICESP	51	50	149	T1N0M0	Não	I	2	2	60%	40%	Negativo	Não realizado	10%	Luminal A
3953 NJB	ICESP	51	82	167,5	T2N0M0	Não	II A	2	3	90-100%	90%	Negativo	Não realizado	50%	Luminal B
3954 MRS	ICESP	54	49	152	T2N1M0	Não	III A	2	3	90%	50-60%	Negativo	Não realizado	5%	Luminal A
3956 NNSC	ICESP	52	65,6	157	T2N0M0	Não	II A	1	1	100%	5%	Negativo	Não realizado	5%	Luminal A
3957 ECS	ICESP	59	81	160	T4N1M0	Não	III B	2	3	70%	Negativo	Positivo	Não realizado	70%	Luminal HER-2
3958 RAS	ICESP	61	94,1	157	T1N0M0	Não	I	2	3	80%	30%	Negativo	Não realizado	20%	Luminal B
3961 RSB	ICESP	50	90,1	163,5	T2N1M0	Não	III A	2	2	100%	50%	Negativo	Não realizado	25%	Luminal B
3967 MCS	ICESP	53	75,4	163	T2N0M0	Não	III A	1	1	100%	70%	Negativo	Não realizado	10%	Luminal A
3968 MAM	ICESP	62	73,8	159	T2N0M0	Não	II A	2	3	+	+	Negativo	Não realizado	30%	Luminal B

(C) Genes-alvo do miR-9-5p: